

УДК 577.112:577.215

Влияние различных частей эктодомена рецептора IRR на его рН-чувствительность (биоинформатический подход)

И. Е. Деев*, Н. В. Попова, А. Г. Петренко

Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: deyevie@gmail.com

Поступила в редакцию 09.12.2014

РЕФЕРАТ Рецептор, подобный инсулиновому рецептору (IRR) принадлежит к суперсемейству рецепторных тирозинкиназ. IRR является близким структурным гомологом рецепторов инсулина и инсулиноподобного фактора роста, однако не связывается с их лигандами. IRR, как показано нами ранее, активируется при повышении рН внеклеточной жидкости (> 7.9) и регулирует экскрецию избыточной щелочи в организме. Проведен биоинформатический анализ рН-сенсорного потенциала всех трех членов семейства рецептора инсулина различных видов животных (от лягушки до человека), а также их химер с перестановкой отдельных доменов внеклеточной части. С использованием программы AcalPred показано, что семейство рецептора инсулина делится на белки, активность которых максимальна в кислой среде (все ортологи рецепторов инсулина и инсулиноподобного фактора роста, за исключением одного ортолога IGF-IR из *Xenopus laevis*) или в щелочной среде (все ортологи IRR). Предсказано также, что на рН-чувствительность рецептора IRR наиболее существенно будет влиять замена доменов L1 и C в его внеклеточной части, а также второго и третьего фибронектиновых повторов. Замена домена L2 будет, предположительно, наименее чувствительной для активации IRR при щелочных значениях рН. Для проверки предсказаний *in silico* получены три конструкции с заменой первых доменов L1C рецептора IRR, третьего домена L2 и всех трех доменов L1CL2 на аналогичные участки рецептора инсулиноподобного фактора роста. Установлено, что замена доменов L1C и трех доменов L1CL2 уменьшает способность рецептора к активации при щелочных рН, что приводит к увеличению полумаксимальной эффективной концентрации почти в 2 раза, а замена домена L2 увеличивает полумаксимальную эффективную концентрацию на 40%. Таким образом, наши данные свидетельствуют о высоком предсказательном потенциале алгоритма AcalPred не только для рН-чувствительных ферментов, но и для рН-регулируемых рецепторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рецептор, фосфорилирование, щелочные значения рН.

ВВЕДЕНИЕ

Семейство рецептора инсулина (IR) состоит из собственно IR, рецептора инсулиноподобного фактора роста (IGF-IR) и рецептора, подобного IR (insulin receptor-related receptor, IRR). Все три рецептора являются высокоомологичными рецепторными тирозинкиназами с одним трансмембранным сегментом, существующими в виде гомологичных димеров, соединенных цистиновыми мостиками [1, 2]. Этим члены семейства IR отличаются от других тирозинкиназных рецепторов, которые образуют нековалентные димеры только при активации. При созревании оба мономера подвергаются протеолизу в примембранной зоне внеклеточной части. В результате молекула

рецептора состоит из двух пар ковалентно связанных α - и β -субъединиц.

Во внеклеточной N-концевой части α -субъединицы у всех трех рецепторов находятся домены L1 и L2 (богатые лейцином), между которыми расположен домен C (фурин-подобный богатый цистеином). Далее следуют три фибронектиновых повтора FnIII-1, FnIII-2 и FnIII-3 [3]. Тирозинкиназный домен расположен в цитоплазматической части β -субъединицы. Степень гомологии между IGF-IR и IRR несколько выше, чем между IR и IRR [2], поэтому считается, что дупликация и разделение генов, кодирующих IGF-IR и IRR, произошли эволюционно позднее, чем отделение гена рецептора инсулина [2].

Поскольку рецепторы уже предимеризованы, связывание пептидного лиганда с внеклеточной частью IR или IGF-IR вызывает конформационные изменения, которые приводят к автофосфорилированию остатков тирозина, расположенных в цитоплазматическом тирозинкиназном домене. У IRR, в отличие от его гомологов, не найдено лигандов пептидно-белковой природы. В то же время нами установлено, что IRR активируется, когда pH внеклеточной жидкости превышает 7.9 [4, 5]. Эксперименты *in vivo* на мышах с нокаутом гена IRR показали, что этот рецептор вовлечен в регуляцию экскреции почками избыточной щелочи в виде бикарбоната [6, 7]. Картирование участков, определяющих pH-чувствительность IRR, показало, что за активацию рецептора отвечают несколько внеклеточных доменов [5, 8], и это обеспечивает положительную кооперативность активации (коэффициент Хилла около 2.4) [5, 9].

Очевидный фундаментальный интерес представляет вопрос, чем определяются столь разительные отличия функций рецепторов IR и IGF-IR, с одной стороны, и IRR, с другой. В представленной работе мы провели сравнительный анализ pH-чувствительности рецептора IRR и других рецепторов из семейства рецептора инсулина с использованием биоинформатического подхода. Применение программы AcalPred [10], разработанной для предсказания значений pH (кислых или щелочных), оптимальных для работы ферментов на основании их первичной структуры, позволило разделить семейство IR на два типа: «кислотно-зависимые» белки (практически все ортологи IR и IGF-IR) и «основно-зависимые» белки (все ортологи IRR). Этот подход позволил оценить относительный вклад отдельных доменов внеклеточной части IRR, а предсказанные свойства химер IRR и рецептора IGF-IR были проверены *in vitro* путем определения их pH-чувствительности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Последовательности рецепторов инсулинового семейства

Все последовательности эктодоменов рецепторов инсулинового семейства *Bos taurus* (BosTau), *Canis familiaris* (CanFam), *Cavia porcellus* (CavPor), *Coturnix japonica* (CotJap), *Danio rerio* (DanRer), *Equus caballus* (EquCab), *Felis catus* (FelCat), *Gallus gallus* (GalGal), *Gasterosteus aculeatus* (GasAcu), *Homo sapiens* (HomSap), *Macaca mulatta* (MacMul), *Microcebus murinus* (MicMur), *Monodelphis domestica* (MonDom), *Mus musculus* (MusMus), *Ochotonas princeps* (OchPri), *Oryctolagus cuniculus* (OryCun), *Pan troglodytes*

(PanTro), *Rattus norvegicus* (RatNor), *Scophthalmus maximus* (ScoMax), *Sus scrofa* (SusScr) и *Xenopus laevis* (XenLae) взяты из сопровождающего материала этой статьи [11]. Так как у *Danio rerio* гены рецепторов IR и IGF-IR дублированы, к ним добавлены обозначения a или b.

Получение химерных рецепторов

Последовательности, кодирующие химерные человеческие рецепторы, получали полимеразной цепной реакцией с использованием следующих праймеров: для L1C(IGF-IR) IRR-НА 5'-CATCCCTTGTGAAGGTCCTTGCCCTAAAGAGTGCAAGGTAGGC и 5'-cccGGtACcTGTcACCTCCTCCAGTCGGTA, затем 5'-gggGGTACCGAATTCATGAAGTCTGGCTCCGGAGGAG; для L2(IGF-IR) IRR-НА 5'-CACAAGTGCGAGGGGCTGTGCCCGAAGGTCTGTGAGGAAGAAA и 5'-cccGGTACCCGTCACCTCCTCCATGCGGTAА, затем 5'-gggGGTACCGAATTCATGGCAGTGCCTAGTCTGTGG. Правильность полученных конструкций проверяли секвенированием.

Трансфекция эукариотических клеток и активация рецептора

Клетки HEK293 растили на среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка, 1% пенициллина/стрептомицина и 2 мМ L-глутамин при стандартных условиях (37°C и 5% CO₂). Клетки трансфицировали плазмидами pCDNA3.1, кодирующими IRR-НА или химерные рецепторы. Для трансфекции использовали Унифектин-56 (UnifectGroup) согласно рекомендациям производителя. Через 28–40 ч после трансфекции клетки оставляли в бессывороточной ростовой среде на 2–3 ч при стандартных условиях. Далее для проверки активации рецепторов и получения кривых активации клетки HEK293, экспрессирующие рецепторы, после «голодания» в бессывороточной среде инкубировали в фосфатно-солевом буфере с 60 мМ Трис-НСl с требуемым значением pH в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем буфер отбирали и клетки незамедлительно лизировали в 1×буфере для электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии SDS.

Вестерн-блотинг и построение кривых активации

Электрофорез в 8% ПААГ в присутствии SDS и последующий Вестерн-блот-анализ проводили по стандартному протоколу как описано в [12]. Общее количество рецепторов определяли с использованием кроличьей сыворотки к цитоплазматической части IRR (anti-IR/IRR), а для выявления фосфорилированной формы рецептора применяли кроличью сыворотку к фосфорилированному IRR (anti-pIR/IRR).

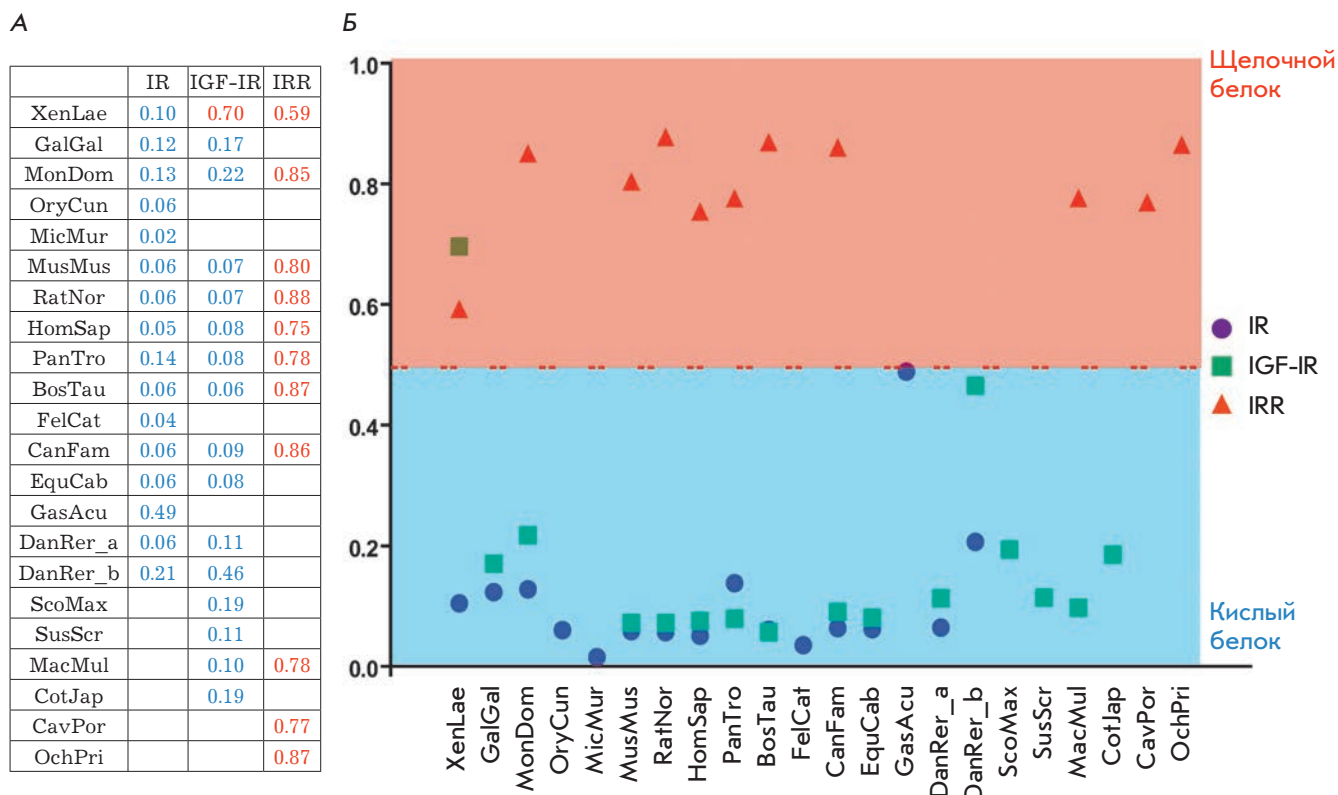


Рис. 1. А — результат анализа последовательностей эктодоменов рецепторов семейства рецептора инсулина с использованием программы AcalPred. В таблице приведены значения относительной вероятности активации при щелочном значении рН эктодоменов рецепторов этого семейства из различных видов животных. Полное название видов указано в «Экспериментальной части». Б — графическое представление описанных выше вероятностей. Красной линией выделена условная граница по значению предсказания – 0.5. Белки с предсказанной вероятностью «щелочной» чувствительности более 0.5 показаны как «щелочные» (находятся в красной зоне), а белки с вероятностью менее 0.5 – как «кислые» (находятся в синей зоне)

Антитела к IRR получены и охарактеризованы в нашей лаборатории [5]. В качестве вторичных антител использовали антитела козы против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с HRP (Jackson ImmunoResearch). Полученные блоты сканировали, специфичные сигналы обрабатывали с помощью программы ImageJ. Сигнал от антител к фосфорилированному IRR нормировали по сигналу от антитела против С-концевой части рецептора IRR. Далее нормированные сигналы для каждого рН ($n \geq 3$) обрабатывали в программе GraphPad Prism 5 с использованием интерполяции уравнения Хилла (One site – Specific binding with Hill slope-анализ). В результате анализа интерполяции программа GraphPad Prism 5 рассчитывала значения для коэффициента Хилла и полумаксимальной эффективной концентрации гидроксильных ионов для кривой активации химерных белков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рецепторная тирозинкиназа IRR обладает уникальной способностью активироваться при защелачивании внеклеточной среды. Это свойство разительно отличает IRR как от других членов семейства рецептора инсулина, так и от большинства тирозинкиназных рецепторов, которые активируются пептидами или белками. Мы задались вопросом о возможности предсказания этого необычного свойства рецептора IRR с помощью современных биоинформатических подходов. Недавно была описана программа AcalPred, первоначально предназначенная для предсказания значений рН, оптимальных для работы фермента (кислых или щелочных) по его последовательности. На данный момент эта программа доступна в сети Интернет и представляется наиболее надежной из описанных ранее алгоритмов предсказания значений рН, оптимальных для ра-

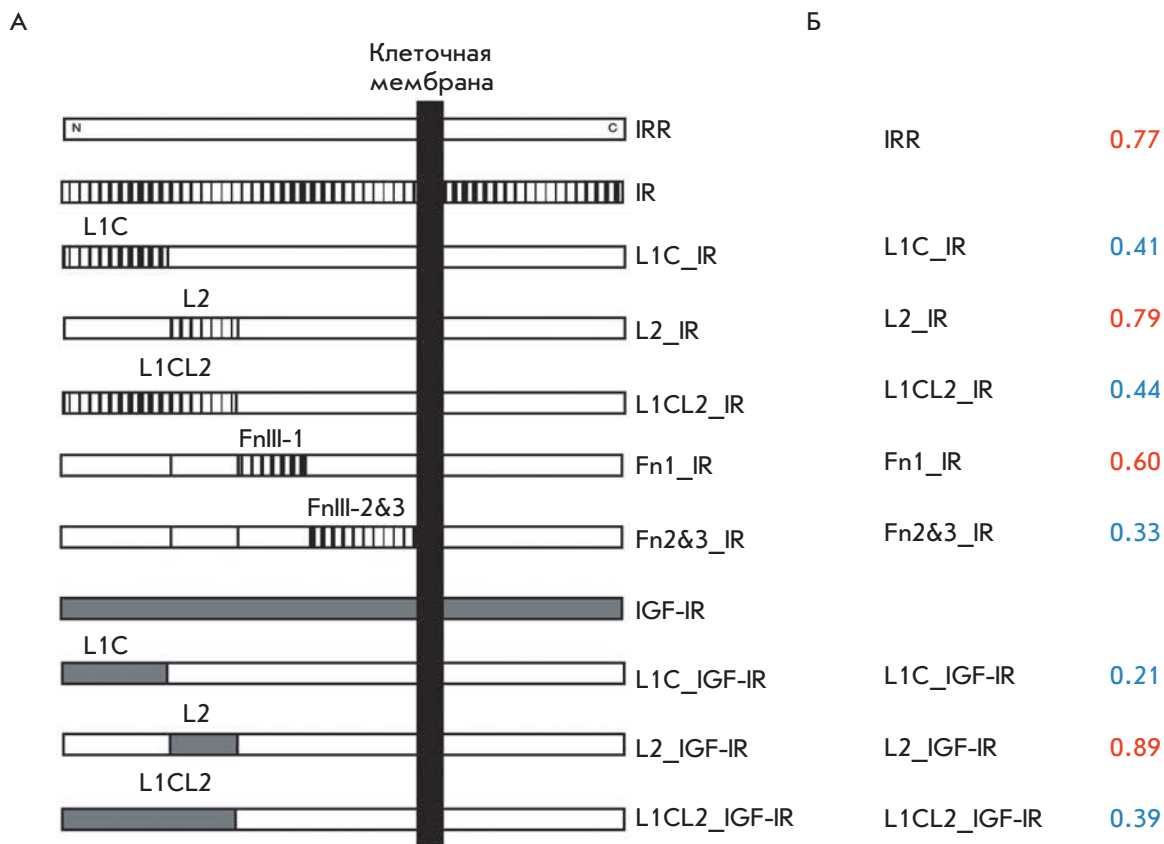


Рис. 2. А – схематическое изображение химерных белков. Белым показаны домены IRR, полосатым – домены IR и серым – домены IGF-IR. L1 и L2 – L-домены, С – фурин-подобный богатый цистеином домен, FnIII-1 и FnIII-2, -3 – обозначение первого или второго и третьего фибронектинового повтора. Б – результат анализа последовательностей эктодоменов химерных рецепторов с использованием программы AcalPred. В таблице приведены значения относительной вероятности предсказания эктодомена как «щелочного» белка. Значения предсказания более 0.5 отмечены красным цветом («щелочные» белки), а менее 0.5 – синим («кислые» белки)

боты фермента [10]. В результате работы программы определена относительная вероятность того, что белок «предпочитает» работать или в щелочной, или в кислой среде, причем суммарная вероятность равна 1. Этот алгоритм создан для растворимых ферментов, поэтому мы взяли последовательности эктодоменов рецепторов семейства IR примерно 20 различных организмов – от лягушки до человека (полные названия организмов и их сокращения приведены в «Экспериментальной части»), и проанализировали их с использованием программы AcalPred. В качестве примера приведен результат анализа эктодоменов семейства рецептора инсулина человека. Так, IR человека был с относительной вероятностью 0.95 классифицирован как «кислый» белок и с вероятностью 0.05 как «щелочной». IGF-IR человека с вероятностью 0.92 принадлежит к «кислым» белкам и с вероятностью 0.08 – к «щелочным», тогда как IRR человека с вероятностью 0.25 отно-

сится к «кислым» белкам и с вероятностью 0.75 – к «щелочным».

Оценка вероятности того, что белок относится к «щелочным», для остальных эктодоменов из различных организмов приведена на рис. 1А. Графическая интерпретация этой таблицы с разделением по вероятности 0.5 (над линией – «щелочной» белок, а ниже линии – «кислый») для этих данных показана на рис. 1Б. Интересно, что семейство рецептора инсулина делится на два класса: а) IR и IGF-IR (кроме IGF-IR лягушки), предположительно, «кислые» белки; б) ортологи IRR, являющиеся «щелочными» белками. Данные результаты свидетельствуют о том, что программа AcalPred может иметь более широкое применение, чем анализ рН-зависимости ферментов, и использоваться для предсказания щелочной активации и регуляции тирозинкиназных рецепторов. В частности, не исключено, что рецептор IGF-IR лягушки, с вероятностью 0.70 отнесенный

к «щелочным» белкам, потенциально может быть сенсором слабощелочной среды.

С целью дальнейшей оценки применимости программы AcalPred к анализу рН-сенсорных свойств рецепторных тирозинкиназ мы сравнили экспериментально определенные свойства ранее полученных химерных белков IR и IRR человека с замещением отдельных доменов внеклеточной части (рис. 2А) [8, 9, 13]. Химерные последовательности были получены в результате замены первых двух доменов L1C, третьего домена L2, всех трех доменов L1CL2, первого фибронектинового повтора FnIII-1 или второго и третьего фибронектиновых повторов в эктодомене IRR на аналогичные участки рецептора IR.

Анализ этих последовательностей программой AcalPred показал, что замена первых двух доменов L1C или второго и третьего фибронектиновых повторов FnIII-2 и FnIII-3 наиболее критична для «щелочности» белка (рис. 2Б). Замена первого фибронектинового повтора FnIII-1 влияет не так сильно, а замена третьего домена L2 не ухудшает предполагаемую чувствительность к щелочным рН (рис. 2Б). Эти данные, в целом, согласуются с нашими экспериментальными результатами. Так, показано, что наиболее критичны замены в области первых двух доменов L1C или второго и третьего фибронектиновых повторов – FnIII-2 и FnIII-3, которые, как мы полагаем, образуют основной сайт рН-чувствительности у рецептора IRR [13]. Замена в IRR домена L2 на аналогичную последовательность из IR оказывала небольшое, но, тем не менее, заметное влияние на чувствительность IRR к щелочным рН [9], в то время как AcalPred не предсказывала изменений. Замена же первого фибронектинового повтора FnIII-1 на аналогичный фрагмент IR приводила к большему, чем замена домена L2, эффекту, сопоставимому с эффектом от замены L1C, но при этом более слабому, чем от замены второго и третьего фибронектиновых повторов FnIII-2 и FnIII-3 [9, 13], что согласовывалось с предсказанием программы. Можно заключить, что в случае анализа химерных рецепторов программа AcalPred обладает предсказательной силой, но при этом следует иметь в виду, что выходящие параметры описывают вероятность, а не дают точной оценки величины рН-зависимости, т.е. получаемые результаты имеют скорее качественный, чем количественный характер.

Эволюционно IRR имеет большее структурное сходство с рецептором IGF-IR, чем с рецептором инсулина. Поэтому, помимо анализа рецептора IRR, в котором домены L1CL2 заменены аналогичными участками рецептора IGF-IR [8], мы дополнительно получили еще два химерных белка, в которых домены L1C или L2 IRR были заменены соответ-

ствующими доменами рецептора IGF-IR (рис. 2А). Полученные белки экспрессировали в эукариотических клетках НЕК293. Далее мы проверили ответ полученных рецепторов на повышение рН внеклеточной среды. Для этого эукариотические клетки, в которых экспрессировали химерные рецепторы, обрабатывали буфером с рН 7.3 или 9.0. Так же как и IRR, химеры L1C_IGF-IR, L1CL2_IGF-IR и L2_IGF-IR активировались в ответ на воздействие щелочных рН (рис. 3А).

Была построена кривая зависимости степени активации каждого химерного рецептора от рН в диапазоне от 7.3 до 9.4. Кривые активации получены для всех трех химерных белков L1C_IGF-IR, L1CL2_IGF-IR и L2_IGF-IR (рис. 3Б). Для каждого рецептора рассчитаны коэффициент Хилла (H) и полумаксимальная эффективная концентрация гидроксильных ионов (EC_{50}) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 5, которые позволяют оценить рН-чувствительность различных химерных рецепторов и кооперативность их взаимодействия с агонистом. Анализ кривых показал, что при замене двух доменов L1C или одного домена L2 коэффициент Хилла существенно не изменяется. Так, в случае L1C_IGF-IR коэффициент Хилла составил 2.4 ± 0.6 , для L2_IGF-IR – 2.5 ± 0.4 , тогда как у IRR он равен 2.4 ± 0.4 . При этом величина EC_{50} возрастает более чем в 2 раза при замене доменов L1C и приблизительно на 40% при замене L2 (рис. 3Б и таблица). Наиболее сильным эффектом был при замене всех трех доменов L1CL2 в химерной конструкции: в этом случае коэффициент Хилла снижается до 1.6 ± 0.3 , а EC_{50} возрастает более чем в 2 раза – до 9.8 ± 2.6 мкМ, почти так же, как у химеры с заменой первых двух доменов L1C (таблица) [8]. Возможно, такое падение коэффициента Хилла связано с изменением структуры и взаимного расположения сайтов рН-чувствительности внутри экто-

Значения коэффициента Хилла и полумаксимальной эффективной концентрации для обозначенных рецепторов

Рецептор	Коэффициент Хилла, H	Полумаксимальная эффективная концентрация, EC_{50} , мкМ
IRR	2.4 ± 0.4	4.1 ± 0.4
L1C_IGF-IR	2.4 ± 0.6	9.9 ± 1.5
L2_IGF-IR	2.5 ± 0.4	5.8 ± 0.5
L1CL2_IGF-IR	1.6 ± 0.3	9.8 ± 2.6

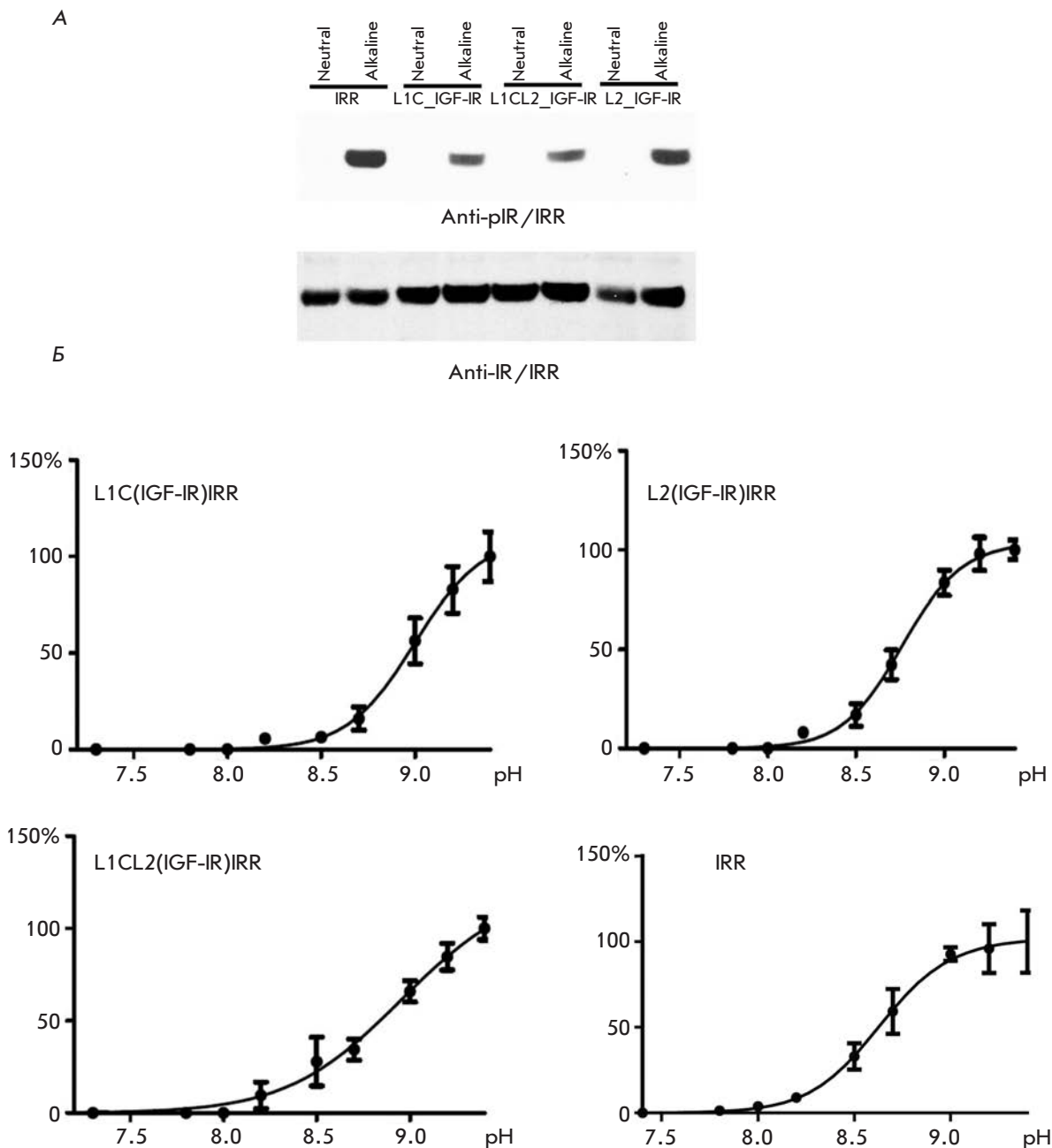


Рис. 3. А — активация химерных рецепторов при щелочных рН. Клетки НЕК293, экспрессирующие химерные белки, обрабатывали буфером с рН 7.3 или 9.0, затем лизировали, белки разделяли в ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану для проведения Вестерн-блот-анализа. β -субъединицы рецепторов выявляли антителами к С-концевой части IRR, а фосфорилированный рецептор — антителами к фосфорилированной форме IRR. Б — кривые активации IRR и химерных рецепторов. Клетки НЕК293, экспрессирующие химерные белки, обрабатывали буфером с рН в диапазоне от 7.3 до 9.4 (7.3; 7.8; 8.0; 8.2; 8.5; 8.7; 9.0; 9.2; 9.4), лизировали, белки разделяли в ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану для проведения Вестерн-блот-анализа. β -субъединицы рецепторов выявляли антителами к С-концевой части IRR, а фосфорилированный рецептор — антителами к фосфорилированной форме IRR. Количество фосфорилированного рецептора нормировали по общему количеству рецептора (сигнал от β -субъединицы рецептора). Сигналы, нормированные для каждого значения рН ($n \geq 3$), обрабатывали в программе GraphPad Prism 5 с использованием интерполяции уравнения Хилла. Каждая точка оси Y показывает сигналы от активации рецепторов (%) относительно максимальной средней активации при рН 9.4, принятой за 100%

домена при замене первых трех доменов. Интересно, что замена доменов L1C или L2 в химерных рецепторах IRR соответствующими доменами рецептора инсулина приводила к более серьезным негативным изменениям, чем введение доменов из IGF-IR [9]. Таким образом, наибольший отрицательный эффект наблюдался при замене частей L1C, а наименьший – при замене домена L2.

ВЫВОДЫ

В этой работе мы применили биоинформатический подход к анализу рН-чувствительности рецептора IRR. Алгоритм программы AcalPred, разработанный для предсказания оптимума рН для активности растворимых ферментов, оказался применимым

и для описания рН-зависимых свойств членов семейства рецептора инсулина. Более того, с помощью этой программы можно предсказывать вклад отдельных структурных фрагментов рецептора в его рН-сенсорную функцию. Надо отметить, что с помощью данной программы можно получить в основном качественный результат, а ее количественные выводы не всегда точны. ●

*Работа поддержана РНФ (14-14-01195),
Президиумом РАН «Молекулярная и клеточная
биология» и «Фундаментальные науки –
медицине», РФФИ (гранты № 13-04-01359А,
14-04-01736А, 12-04-91054, 13-04-90481).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kurachi H., Jobo K., Ohta M., Kawasaki T., Itoh N. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992. V. 187. P. 934–939.
2. Hernandez-Sanchez C., Mansilla A., de Pablo F., Zardoya R. // *Mol. Biol. Evolution.* 2008. V. 25. P. 1043–1053.
3. De Meyts P. // *Trends Biochem. Sci.* 2008. V. 33. P. 376–384.
4. Deev I.E., Vasilenko K.P., Kurmangaliev E., Serova O.V., Popova N.V., Galagan Y.S., Burova E.B., Zozulya S.A., Nikol'skii N.N., Petrenko A.G. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2006. V. 408. P. 184–187.
5. 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., et al. // *Cell Metabolism.* 2011. V. 13. P. 679–689.
6. Deyev I.E., Rzhovsky D.I., Berchatova A.A., Serova O.V., Popova N.V., Murashev A.N., Petrenko A.G. // *Acta Naturae.* 2011. V. 3. P. 114–117.
7. Petrenko A.G., Zozulya S.A., Deyev I.E., Eladari D. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1834. P. 2170–2175.
8. Popova N.V., Deyev I.E., Petrenko A.G. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2013. V. 450. P. 160–163.
9. Deyev I.E., Mitrofanova A.V., Zhevlenev E.S., Radionov N., Berchatova A.A., Popova N.V., Serova O.V., Petrenko A.G. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 33884–33893.
10. Lin H., Chen W., Ding H. // *PLoS One.* 2013. V. 8. e75726.
11. Renteria M.E., Gandhi N.S., Vinuesa P., Helmerhorst E., Mancera R.L. // *PLoS One.* 2008. V. 3. e3667.
12. Deyev I.E., Petrenko A.G. // *Biochimie.* 2010. V. 92. P. 418–422.
13. Deyev I.E., Chachina N.A., Shayahmetova D.M., Serova O.V., Petrenko A.G. // *Biochimie.* 2015. V. 92. P. 1–9.