Поиск функциональных партнеров нуклеозиддифосфаткиназы сетчатки быка.

Какуев Д. Л,, Зураева А. Т., Каращук Г. Н., Костанян И. А., Соловьева О. В.
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

В рамках комплексного исследования белков, принимающих участие в передаче зрительного сигнала, проводился поиск функциональных партнеров NDP-киназы А сетчатки быка методом двух-гибридной системы MATCHMAKER GAL4 фирмы Clontech.

Нуклеозиддифосфаткиназа (NDP-киназа, ATP:NDP фосфотрансфераза, КФ 2.7.4.6.) катализирует реакцию переноса концевого фосфата с нуклеозид-5'-трифосфатов на нуклеозид-5'-дифосфаты.

В сетчатке NDP-киназа является основным ферментом, катализирующим синтез внукреклеточного GTP, субстрата трансдуцина и гуанилатциклазы, который контролирует процессы возбуждения и десенситизации зрительных клеток.

Для обнаружения белков – функциональных партнеров NDP-киназы, клетки дрожжевого штамма Y190 последовательно трансформировали кДНК NDP-киназы А в составе вектора pGBT9, а затем банком кДНК сетчатки в составе плазмиды pGAD10. Представительность библиотеки составила 3 млн. колоний. Клетки растили на твердой селективной среде SD без Leu/Thr/His. Для подавления фонового роста клеток на среде без His использовали 3-amino-1,2,4,-triazole (3-AT) в конечной концентрации 25-45mM. Отбор колоний проводили по мере их появления с 1 по 10 день инкубации. Взаимодействие подтверждали в тесте на бело-голубую селекцию. Было отобрано более 100 положительных клонов. Для селекции плазмиды pGAD10, содержащей кДНК, которые кодируют белки – потенциальные партнеры NDP-киназы, использовали клетки E.coli ауксотрофного штамма КС8.

Поскольку NDP-киназы являются олигомерными белками, состоящими из 6 мономеров, было резонно предположить, что большое количество взаимодействий составят собственные взаимодействия (NDP-киназа/NDP-киназа). Поэтому проводили предварительный скрининг выделенных плазмид с помощью PCR по специфическим праймерам на NDP-киназу А. Группа собственных взаимодействий составила 18 клонов.

Кроме того, из сетчатки ранее была выделена NDP-киназа В, известная как транскрипционный фактор. Скрининг с помощью PCR по специфическим праймерам на NDP-киназу В составил вторую группу взаимодействий из 8 клонов.

PCR по универсальным праймерам на pGAD10 позволила выделить группу ложных сигналов, не содержащих кДНК, которая составила 11 клонов.

Секвенирование оставшихся плазмид расширило группу ложных сигналов до 68 за счет: 17 клонов с обратно ориентированными кДНК, 24 кДНК в неправильной рамке считывания, а также 16 некодирующих последовательностей. Анализ 6 последовательностей требует уточнений.

Обнаружены взаимодействия NDP-киназы А сетчатки быка с:

1. NDP-киназой В – фактором транскрипции c-myc онкогена.
2. легкой цепью динеина типа 1 (dynein light chain roadbkock-type 1). Динеины – многосубъединичные белки цитоплазмы, осуществляющие доставку различных „грузов" к микротрубочкам.
3. митохондриальным цитохромом С-оксидазой 2 (cytochrome c oxidase subunit II) – компонентом реакции окислительного фосфорилирования, протекающей в митохондриях.
4. Rom-1 – специфическим для фоторецепторных клеток мембранным белком. Rom-1 принимает участие в морфогенезе дисков наружных сегментов палочек сетчатки в комплексе с белком периферином (perioherin/rds). Этот комплекс состоит из двух молекул perioherin/rds и двух субъединиц rom-1, которые взаимодействуют друг с другом с образованием тетрамера. Функциональные свойства rom-1 плохо изучены.

Изучение функциональной роли взаимодействия NDP-киназы А и rom-1 – предмет наших дальнейших исследований.