Кристаллизация фрагмента тирозиновой киназы EPHA2 в комплексе с 4-фенил-2-гидроксифенолом

Липкин А.В., Осипов Е.М., Ярош А.Г., Ракитина Т.В.

Федеральное государственное учреждение Российский научный центр "Курчатовский Институт", Институт Кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН, Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Семейство тирозиновых киназ (ТК) включает в себя около девяноста ферментов, которые катализируют перенос концевого фосфата от молекулы АТФ на остаток тирозина белка-субстрата. Основной биологической ролью ТК является регуляция межклеточных взаимодействий в многоклеточном организме путём приёма и передачи сигналов от внеклеточных лигандов (рецепторные тирозиновые киназы) и участия в цепочке последовательных фосфорилирований цитоплазматических или ядерных субстратов (нерецепторные тирозиновые киназы). Так как тирозиновые киназы регулируют наиболее важные аспекты жизнедеятельности клетки (рост, дифференцировку, адгезию, апоптоз) нарушение их нормального функционирования, происходящее в результате точечных мутаций, геномных перестроек или сверхэкспрессии, приводит к развитию многочисленных патологий, включая наследственные заболевания, диабет, рак. Поэтому большинство тирозиновых киназ признаны перспективными фармакологическими мишенями. Существует ряд методов ингибирования ТК. Наиболее разработанные подходы основаны на использование гуманизированных антагонистических антител, направленных против рецепторных ТК, или ингибиторов белка теплового шока 90 кДа (HSP90), способных дестабилизировать мутантные формы ТК. В последние годы особый интерес исследователей привлекли низкомолекулярные химические ингибиторы, конкурирующие с молекулами АТФ или субстрата за связывание с активными центрами киназ.

Ранее, с целью поиска и разработки новых ингибиторов ТК, нами была создана белковая панель тирозиновых киназ и проведён биохимический скрининг коллекции низкомолекулярных органических соединений (1), а также была изучена способность шести 4-замещённых-2-гидроксифенолов ингибировать активность ряда тирозиновых киназ (2).

Для определения механизма взаимодействия 4-замещённых-2-гидроксифенолов с активными центрами киназных мишеней было решено использовать методы кристаллизации и рентгеноструктурного анализа бинарного ингибиторного комплекса, состоящего из рецепторной ТК EphA2 и 4-фенил-2-гидроксифенола, способного ингибировать данную киназу с коэффициентом ингибирования 0.75 мкм. В работе был использован рекомбинантный препарат цитоплазматического фрагмента EphA2 человека, экспрессированный в клетках насекомых SF9, и содержащий на N-конце 6 остатков гистидина, необходимых для выделения белка методом металлохелатной хроматографии. Последующая аминокислотная последовательность совпадала с остатками 562-976 EphA2 человека и содержала киназный домен, SAM домен и PDZ связывающий мотив полноразмерной киназы. Присутствие в последовательности SAM домена и PDZ связывающего мотива отличала используемый нами белок от ранее выделенных и структурно охарактеризованных цитоплазматических фрагментов EphA2 человека.

Очищенный в результате комбинации металлохелатной хроматографии и гель-фильтрации белок был практически монодисперсным и пригодным для кристаллизации. Однако попытки сконцентрировать полученный препарат до концентраций выше 2 мг/мл приводили к агрегации. Поэтому для получения кристаллов фермента и бинарного комплекса киназы с 1 мм 4-фенил-2-гидроксифенолом было решено использовать метод противодиффузии в капилляре, что позволяло вводить в кристаллизационный эксперимент большее количество белка, чем при использовании метода диффузии в парах. Был проведён широкий скрининг условий кристаллизации при комнатной и пониженной температурах, а также в условиях микрогравитации, а также оптимизация первичных условий. Пригодные для рентгеноструктурного анализа монокристаллы, выросли через 4 месяца в условиях 100 мм Трис HC1 pH 8.5, 25% ПЭГ 3350, 200 мм ацетат аммония. Предварительный рентгеноструктурный анализ полученных кристаллов дал следующие параметры кристаллической ячейки: пространственная группа симметрии P3(2)21, размеры ячейки a=б=172.13 A, c=241.62 A.

Работа выполнена при поддержке гранта № 02.512.1.2051.

Публикации

1. Ракитина Т.В., и др. Панель тирозиновых киназ как инструмент для разработки противораковых препаратов. Acta Naturae 2009, №3

2. Ракитина Т.В., и др. Изучение биологической активности 4-замещённых-2-гидроксифенолов. Современные проблемы науки и образования 2009, №6