

Секция «Биоинженерия и биоинформатика»

Реконструкция N-концевого фрагмента рекомбинантного CAP-белка, участвующего в обновлении актинового цитоскелета клетки

Шаров Григорий Германович

Студент

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический
факультет, Москва, Россия

E-mail: sharov.grigory@gmail.com

Последние несколько лет продолжают исследования и открытия новых актин-связывающих белков, играющих важнейшую роль в работе цитоскелета эукариотической клетки. Именно они обеспечивают быструю организацию актиновых филаментов, способствуя образованию фибриллярного F-актина из глобулярного G-актина. На данный момент известно более 160 актин-связывающих белков. Один из них, CAP (cyclase associated protein), открыт в 1990 году и до сих пор неизвестен точный механизм его работы. Сложность заключается в том, что CAP-белок образует высокомолекулярный комплекс, а точнее наномашину, стимулирующую сборку и разборку филаментов актина. Рентгеноструктурный анализ и ЯМР-спектроскопия не могут дать ответ на вопрос о его строении. В этом случае представляется возможным изучение структуры комплекса с помощью метода электронной микроскопии биомакромолекул, использованного в данной работе.

Целью работы являлось получение трехмерной реконструкции N-концевого фрагмента CAP, ответственного за олигомеризацию и образование высокомолекулярного комплекса.

Белок N-концевого фрагмента экспрессировали в *E. coli*, очищали с помощью аффинной хроматографии. Для получения объемной структуры использовались микрофотографии, полученные на ТЭМ FEI CM-12 (120кВ, x60000), обработанные 2% уранил ацетатом для негативного контрастирования. Для последующей обработки всех изображений использовались программы Signature, Chimera, IMAGIC, FReAlign.

Реконструкция N-концевого фрагмента с His-тагом представляет собой комплекс N-концевых доменов CAP, имеющий чашевидную форму с шестью подвижными лепестками. В чаше расположен венчик, образованный свободным концом His-тага. Молекулярная масса комплекса с учетом His-тага составляет около 240кДа.

Дальнейший анализ комплексов N-концевых доменов CAP, очищенных с помощью GST-тага, позволил получить трехмерную реконструкцию комплекса с лучшим разрешением. Общая молекулярная масса комплекса с GST тагом составляет около 350кДа. Полученный комплекс образовывал пентамер (по-видимому, из-за стерических взаимодействий, обусловленных большими размерами GST-тага). При сравнении двух реконструкций было показано, что больший домен соответствует N-CAP, в то время как верхняя часть, как мы полагаем, образована остатками GST. Интерпретация полученных результатов проводилась с использованием докинга мономеров N-CAP и GST. Показано, что докинг для кристаллической структуры N-CAP более точен в большую часть трехмерной реконструкции.

Работа поддержана грантами РФФИ (08-04-91125) и CRDF (RUB1-2918-MO-07).