

Аминокислотный остаток D90 АТФ-связывающего сайта необходим для функционирования фагового шаперонина ОВР

Научный руководитель – Поздышев Денис Валерьевич

Кирпиченко Мария Валерьевна

Студент (специалист)

Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова,
Москва, Россия

E-mail: kirpichenkomara@yandex.ru

Шаперонины играют ключевую роль в жизнедеятельности клетки. В их функции входит поддержание корректного фолдинга синтезированных полипептидных цепей и предотвращение денатурации белков в условиях стресса АТФ-зависимым способом. Также шаперонины могут способствовать формированию и поддержанию антибиотикорезистентности патогенных бактерий, в связи с чем исследование структуры, механизма функционирования и регуляции активности шаперонинов имеет и практическую значимость.

Одной из наименее изученных групп шаперонинов является группа GroEL-подобных шаперонинов, кодируемых бактериофагами. Фаговый шаперонин ОВР в отличие от бактериального GroEL является однокольцевым и функционирует без кошаперонина. Шаперонин ОВР является олигомером, состоящим из семи структурно схожих, выстроенных в форме тороида субъединиц. В структуре его субъединиц, как и для GroEL, можно выделить три домена: экваториальный, апикальный и промежуточный.

Структурные и функциональные особенности АТФ-связывающего сайта шаперонина ОВР не изучены в полной мере. Целью данной работы является идентификация функционально значимых аминокислотных остатков АТФ-связывающего сайта шаперонина ОВР.

Для этого было проведено сравнение структур АТФ-связывающих карманов двух шаперонинов – ОВР и GroEL – при их взаимодействии с АТФ. Для проведения молекулярного докинга использовали структуры 6HDD (ОВР) и 8BL2 (GroEL). Докинг в программе Maestro показал, что молекула АТФ ориентируется в карман экваториального домена ОВР, так же, как и в GroEL. Аминокислотные остатки ОВР, контактирующие с АТФ, в большинстве случаев соответствуют контактирующим аминокислотным остаткам GroEL в гомологичных позициях. Особенно интересно взаимодействие АТФ с высококонсервативным участком D90-T94 ОВР. Известно, что мутации D87 в этом участке GroEL приводили к ингибированию его АТФазной активности [1]. Т.к. в шаперонине ОВР аминокислотный остаток D90 образует с молекулой АТФ водородные связи, его мутации также могут оказаться значимыми для АТФазной активности шаперонина. Для проверки этого предположения отрицательно заряженный остаток аспарагиновой кислоты был заменен на незаряженный остаток аспарагина. Рекомбинантные шаперонины ОВР дикого типа, а также ОВР с мутацией D90N были наработаны и очищены с помощью штаммов-продуцентов *E. coli*. Нативным электрофорезом было показано, что мутация не повлияла на формирование олигомера. Оценка АТФазной активности методом колориметрического анализа с использованием малахитового зеленого показала, что АТФазная активность шаперонина с мутацией D90N составляет 1,54 Рi нмоль/мг/мин, что почти на два порядка ниже активности ОВР дикого типа (119,4 Рi нмоль/мг/мин).

Таким образом, аминокислотный остаток D90 шаперонина ОВР играет важную роль в гидролизе АТФ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (№ 23-74-00021).

Источники и литература

- 1) Fenton WA, Kashi Y, Furtak K et al. Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release // Nature. 1994 Oct 13. 371(6498):614-619.