

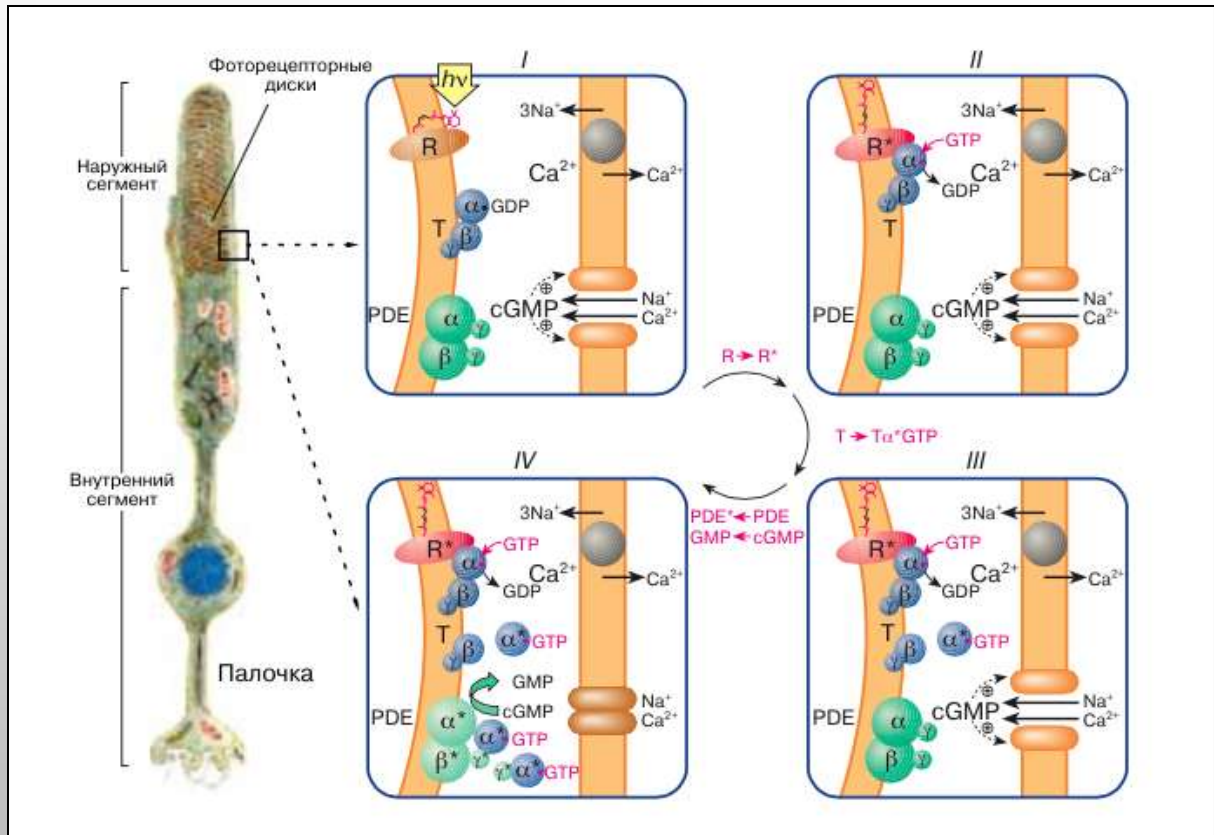
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белоозерского МГУ

Галкин Семен

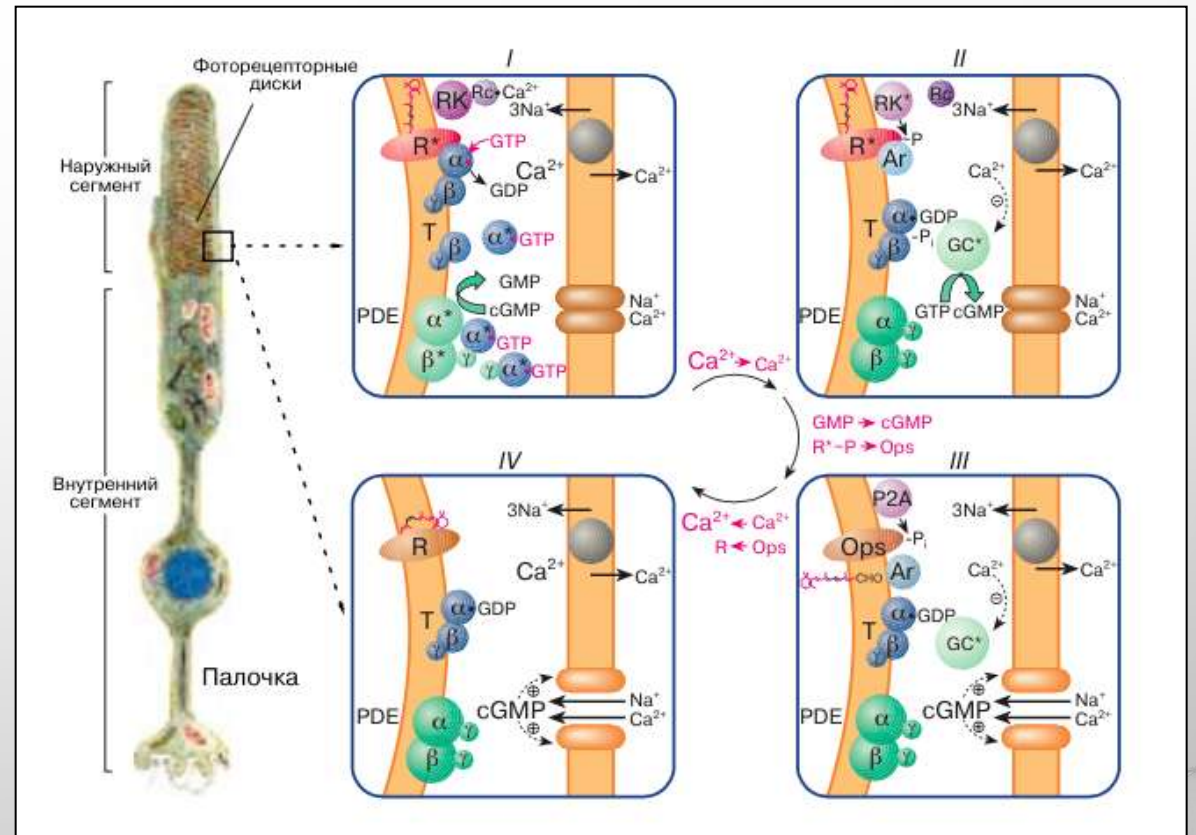
ФОТОРЕЦЕПТОРНЫЙ Ca^{2+} -СЕНСОР РЕКОВЕРИН: РОЛЬ N-КОНЦЕВОГО
МИРИСТОИЛИРОВАНИЯ В МЕХАНИЗМЕ Ca^{2+} -ЗАВИСИМОЙ МЕМБРАННОЙ
АССОЦИАЦИИ

Научные руководители:
ведущий научный
сотрудник,
к.х.н. Е. Ю. Зерний,
аспирант В.Е. Башкеева

Активация и выключение зрительного каскада

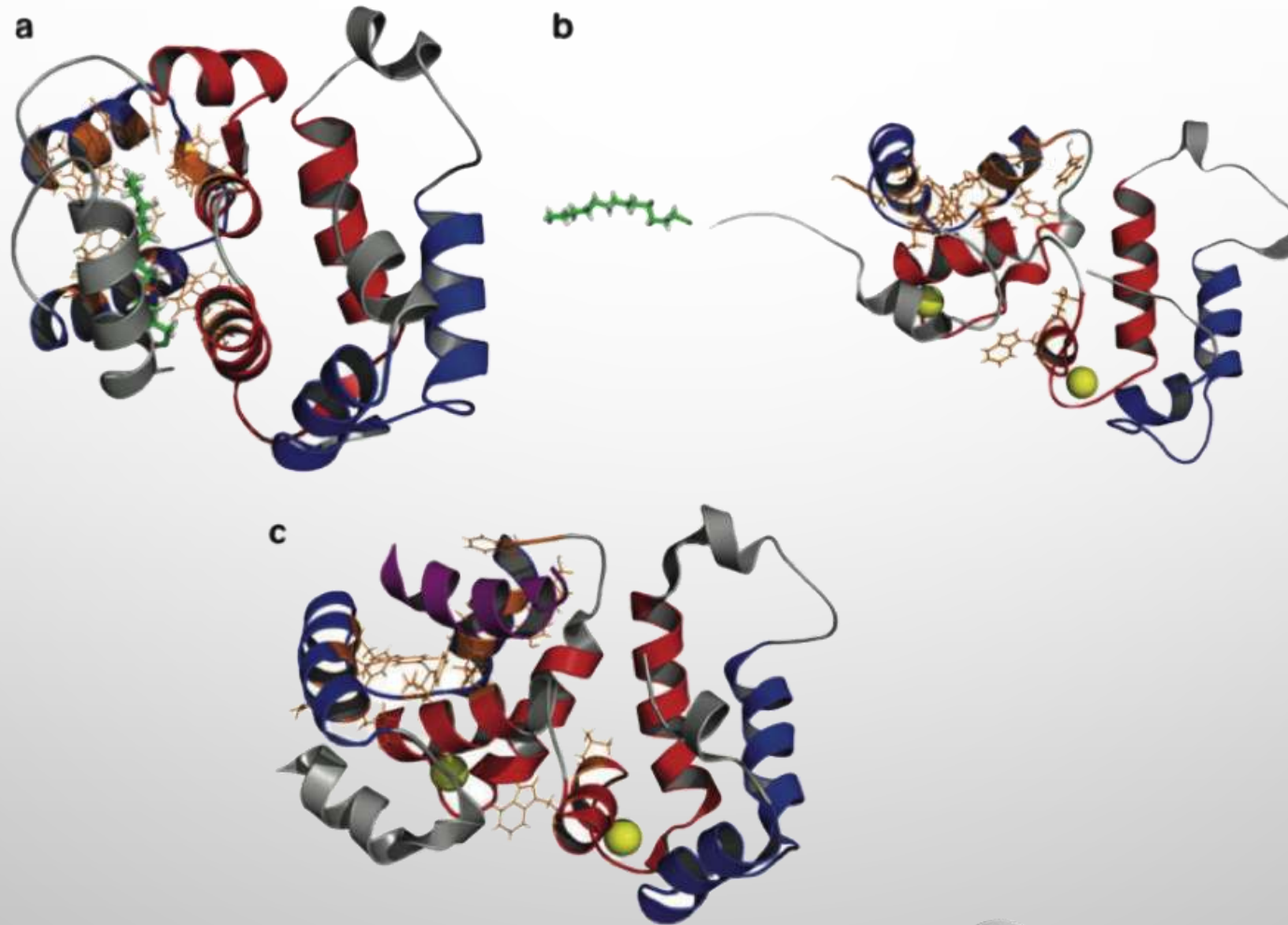


Активация



Выключение

РеCOVERИН



(a) Ca^{2+} свободный реCOVERИН. (b) РеCOVERИН в Ca^{2+} связанной форме. (c) РеCOVERИН, связанный с 1-25 пептидом родопсинкиназы.

Цели и задачи работы

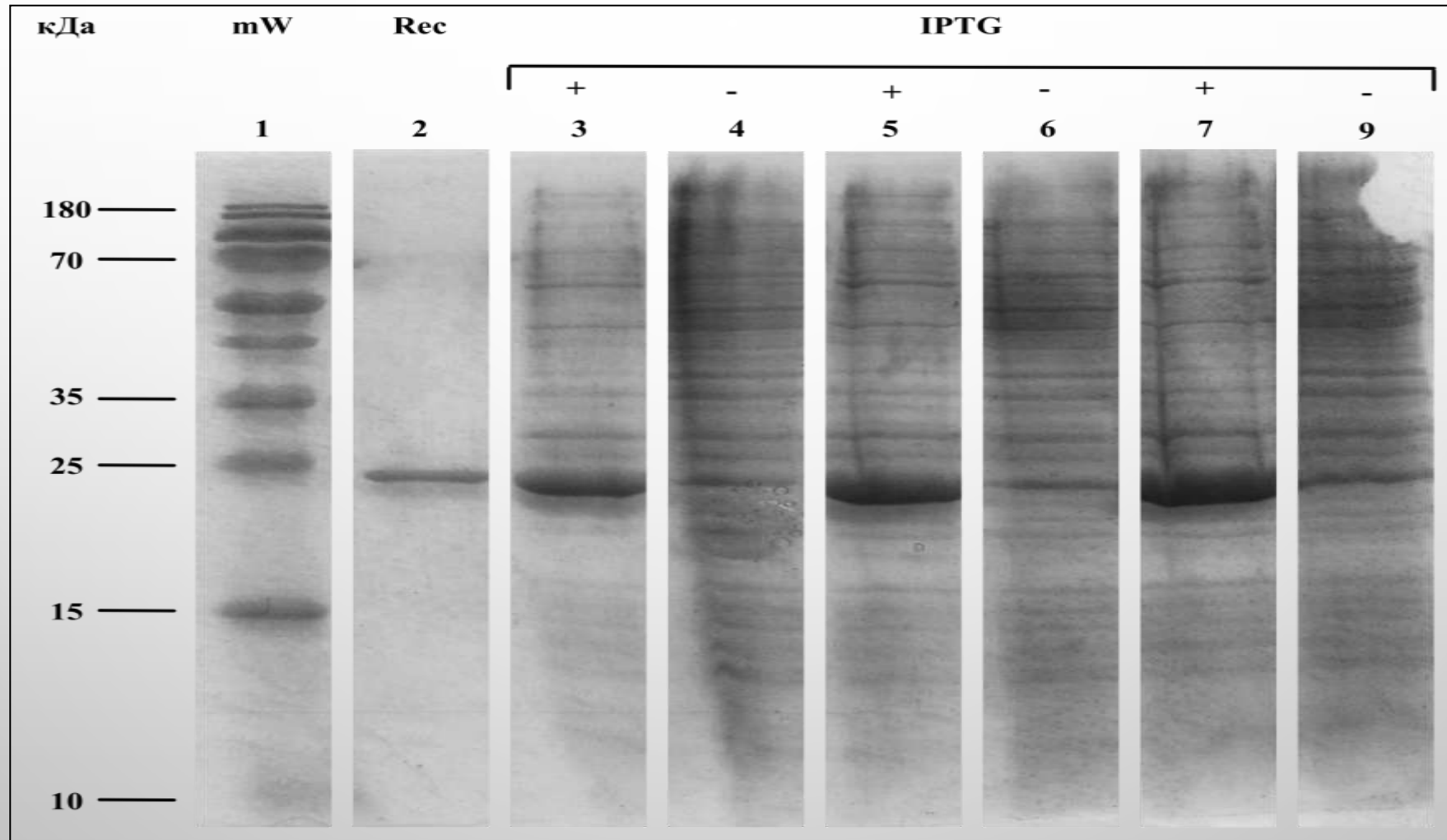
Цели:

1. Получение рекомбинантных форм реоверина, содержащих или не содержащих миристоильную группу .
2. Подтверждение роли миристоильной группы в механизме взаимодействия реоверина с фоторецепторными мембранами.

Задачи:

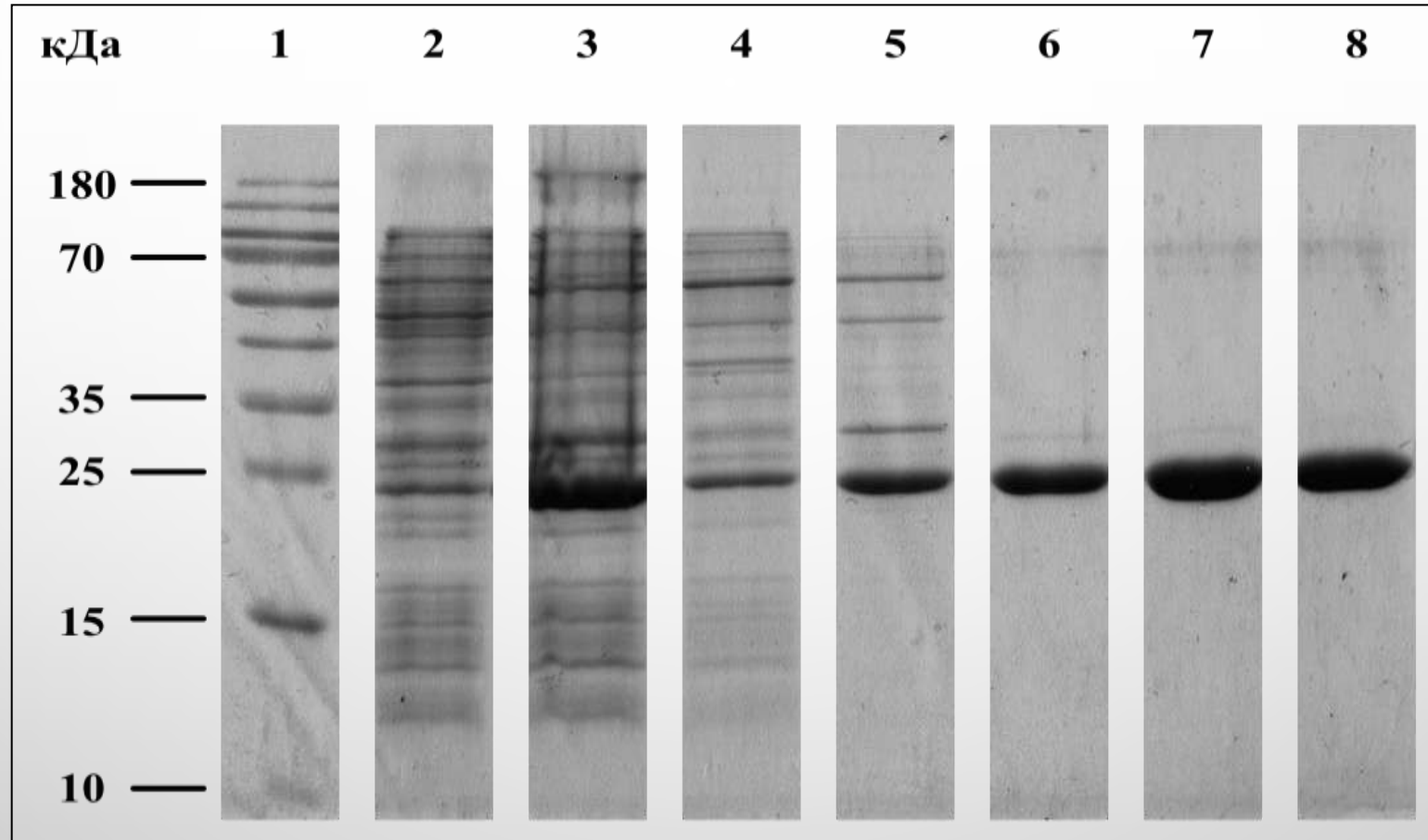
1. Получение бактериальных штаммов-продуцентов реоверина и N-миристоилтрансферазы *Saccharomyces cerevisiae* и подбор условий экспрессии рекомбинантных форм реоверина, обладающих различной степенью миристоилирования.
2. Выделение и очистка рекомбинантных форм реоверина, обладающих различной степенью миристоилирования, из клеточных лизатов.
3. Верификация наличия реоверина в полученных препаратах с использованием поликлональных (моноспецифических) антител против этого белка.
4. Определение степени миристоилирования полученных рекомбинантных форм реоверина.
5. Исследование взаимодействия полученных форм реоверина с мембранами НСП, отмытыми мочевиной.

Экспрессия рековерина



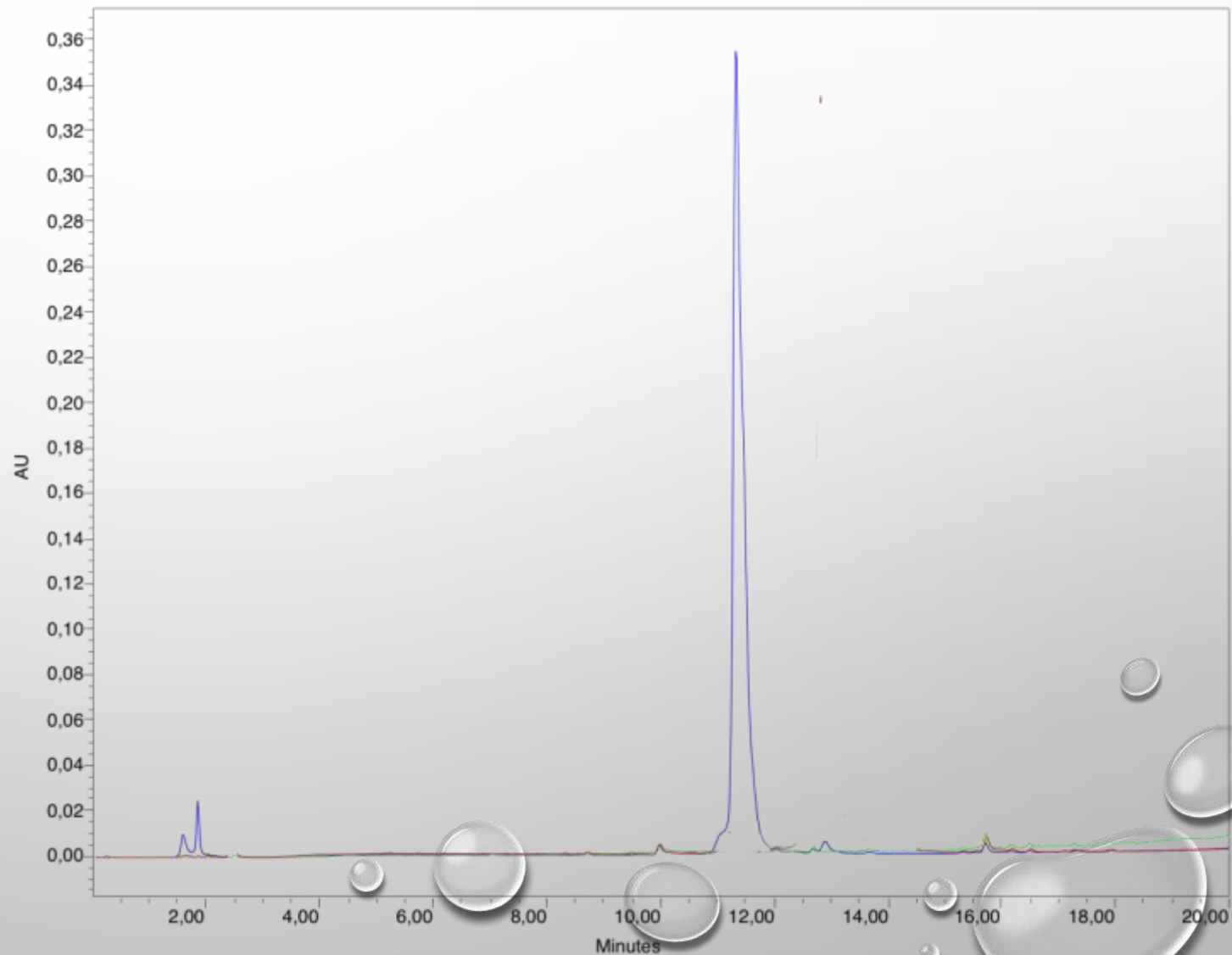
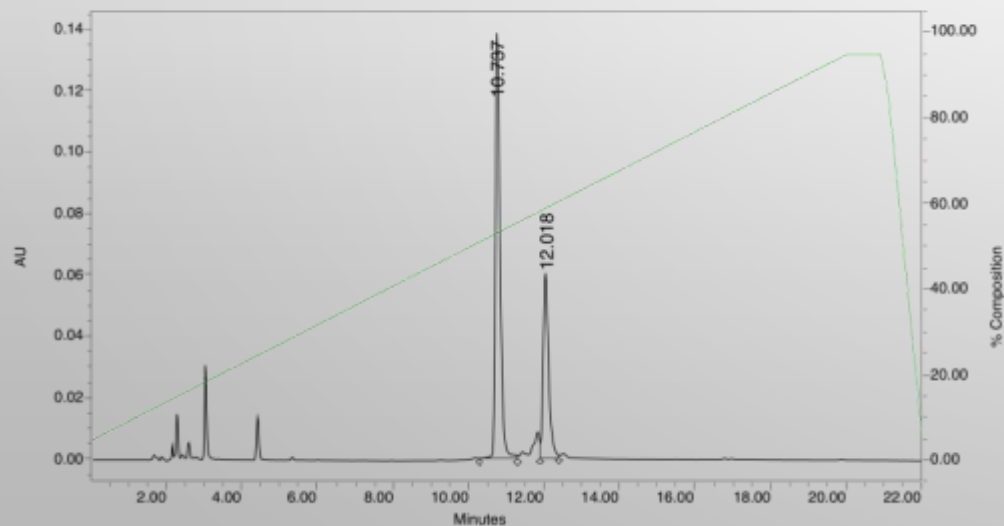
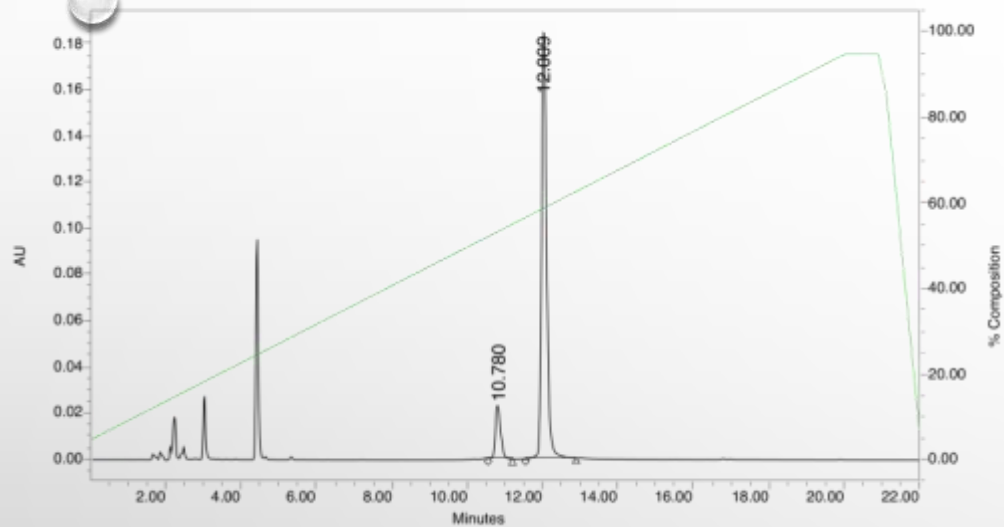
Аналитическая экспрессия

Выделение рековерина

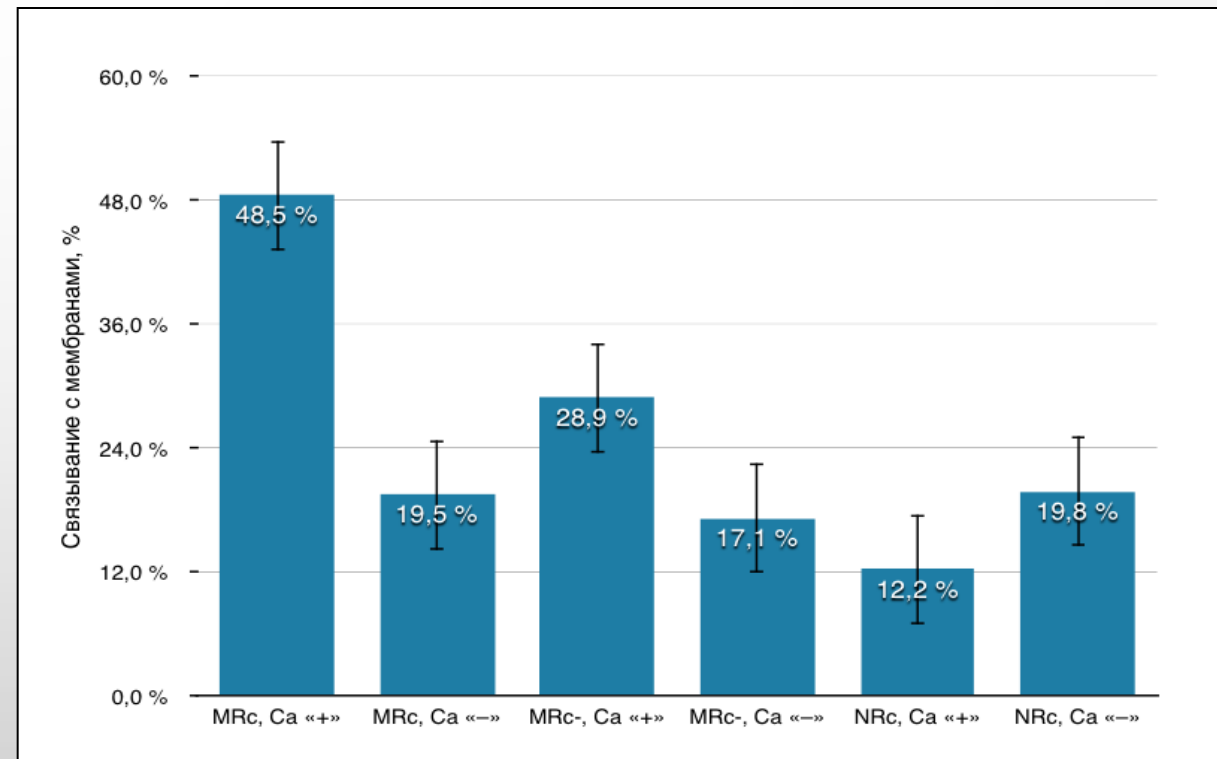
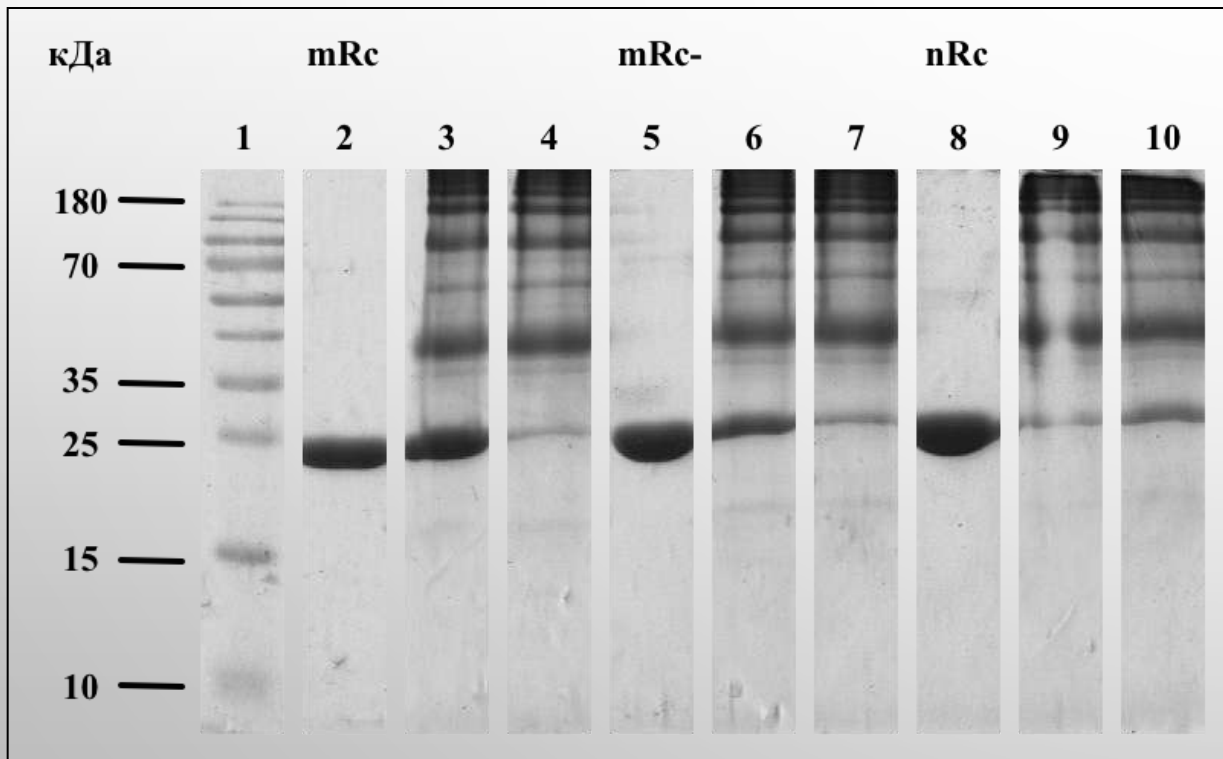


Название пробы	Количество белка, мг
mRc	27
mRc-	49,5
nRc	11,1

Степень миристоилирования рековерина в полученных препаратах



Связываемость различных форм рековерина с мембранами



Выводы

- Коэкспрессия гена реCOVERина с геном N-миристоилтрансферазы в клетках *Escherichia coli* приводит к накоплению миристоилированной формы белка, доля которой не превышает 33%, в то время как добавление экзогенной миристиновой кислоты повышает содержание миристоилированной формы до 88%.
- Получены очищенные препараты рекомбинантных форм реCOVERина, обладающих различной степенью N-концевого миристоилирования (33 и 88%). Молекулярный состав полученных препаратов верифицирован с помощью иммуноблоттинга и аналитической ВЭЖХ.
- Сродство реCOVERина к мембранам наружных сегментов палочек сетчатки прямо пропорционально содержанию миристоилированной формы в препарате белка, что указывает на определяющую роль миристоильной группы в механизме его мембранной ассоциации.

Спасибо за внимание