

Исследование роли N-концевой регуляторной последовательности нейронального кальциевого сенсора 1 (НКС-1) в механизме его взаимодействия с мембранами различного фосфолипидного состава

Выполнила:

Ученица СУНЦ МГУ

им. М.В. Ломоносова

Строкач Анастасия Романовна

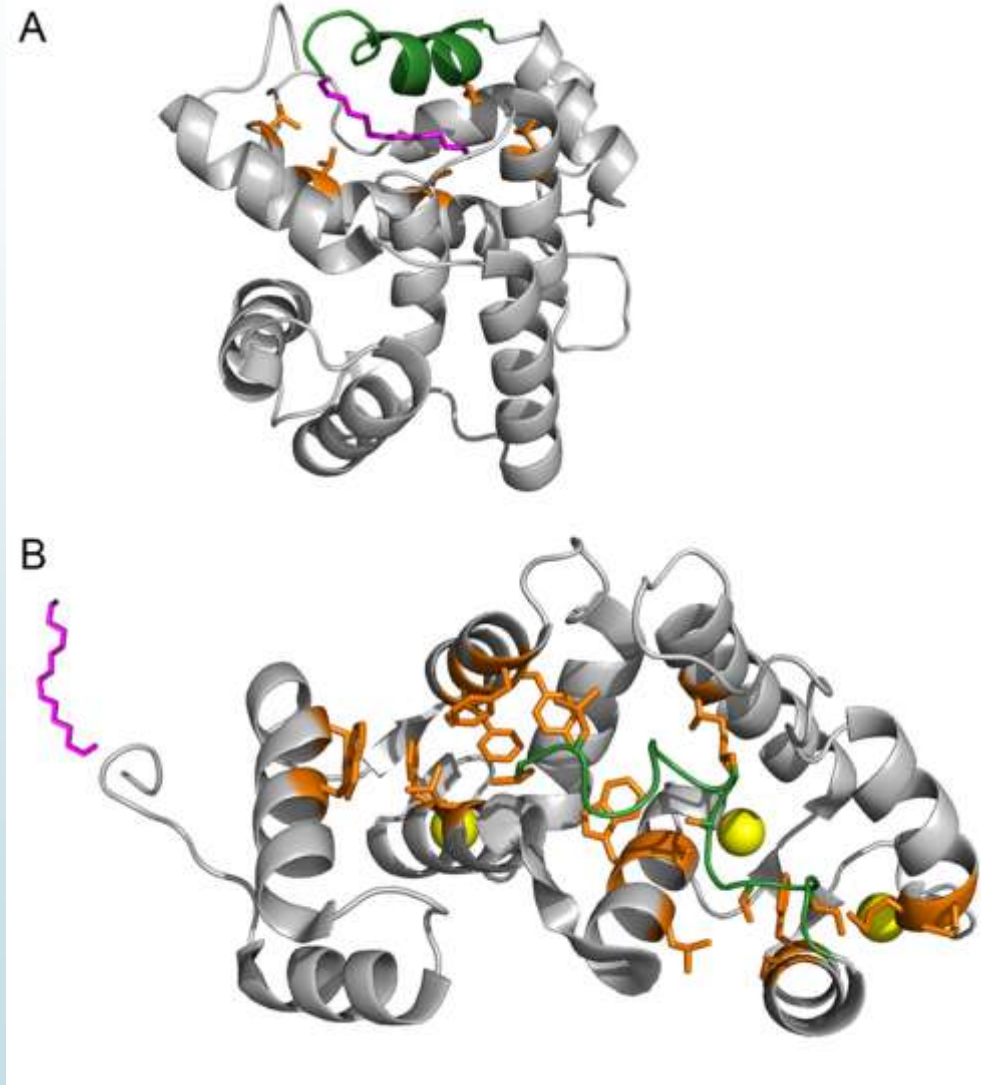
Научный руководитель:

Аспирант Факультета биоинженерии и биоинформатики

Бакшеева Виктория Егоровна

Механизм СВЯЗЫВАНИЯ КАЛЬЦИЯ

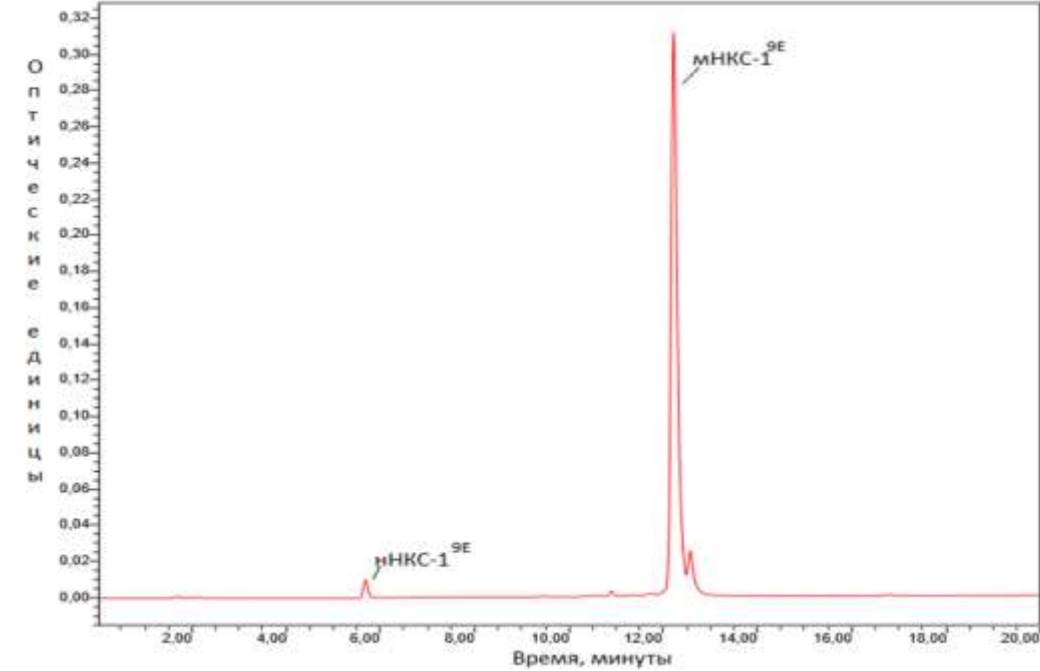
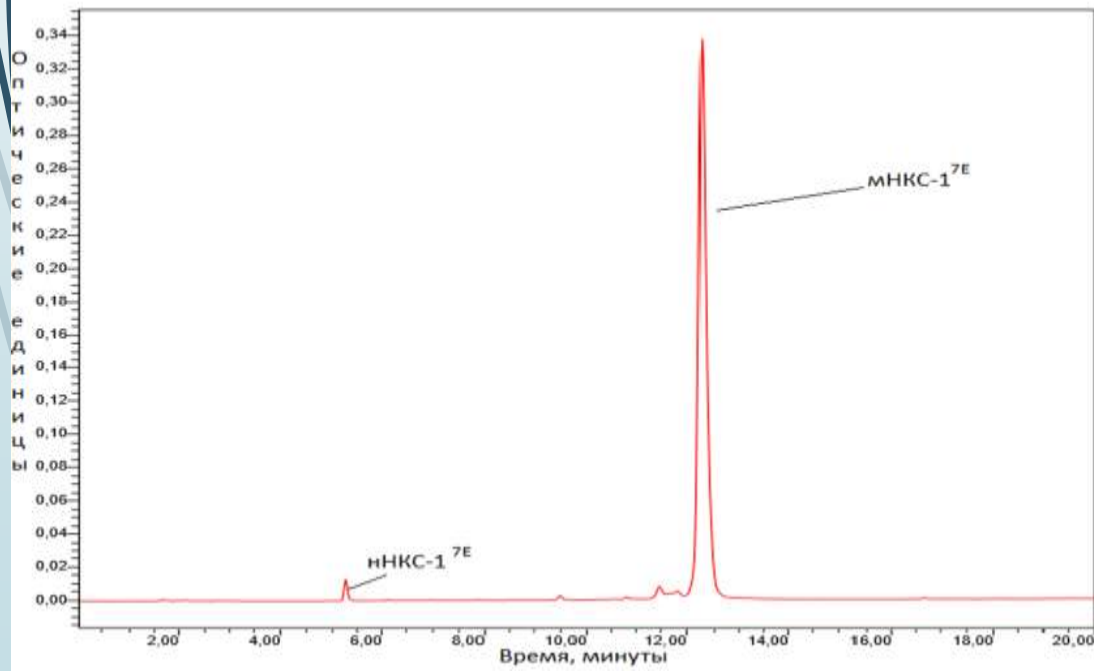
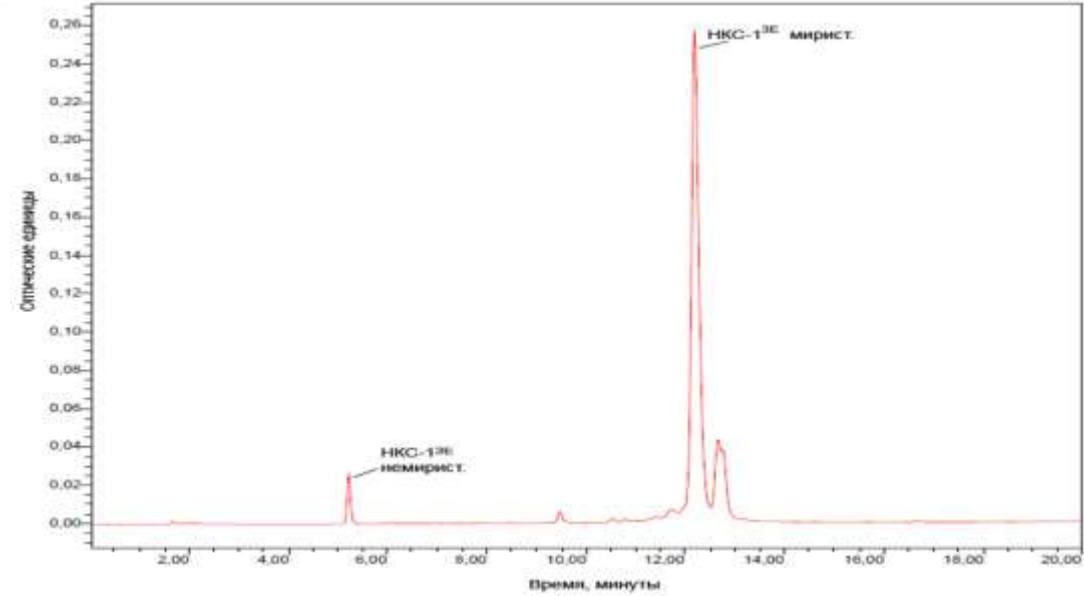
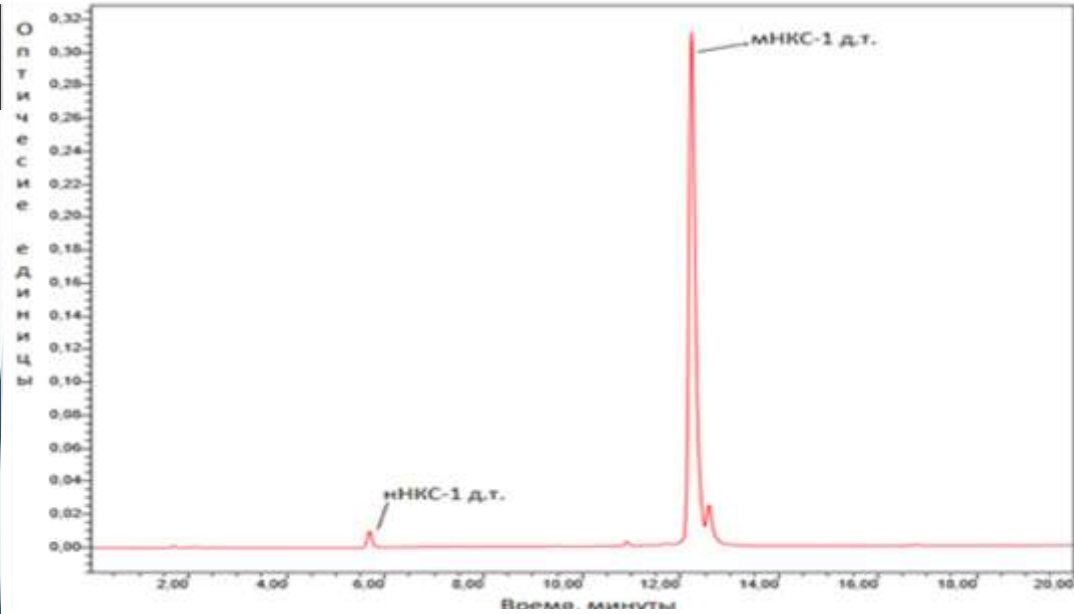
- ▶ А – Бескальциевая форма
- ▶ Б – Ca^{2+} -связанная форма
- ▶ Розовый - миристат
- ▶ Оранжевый – гидрофобный карман
- ▶ Зеленый – С-конец
- ▶ Желтый – Ca^{2+}



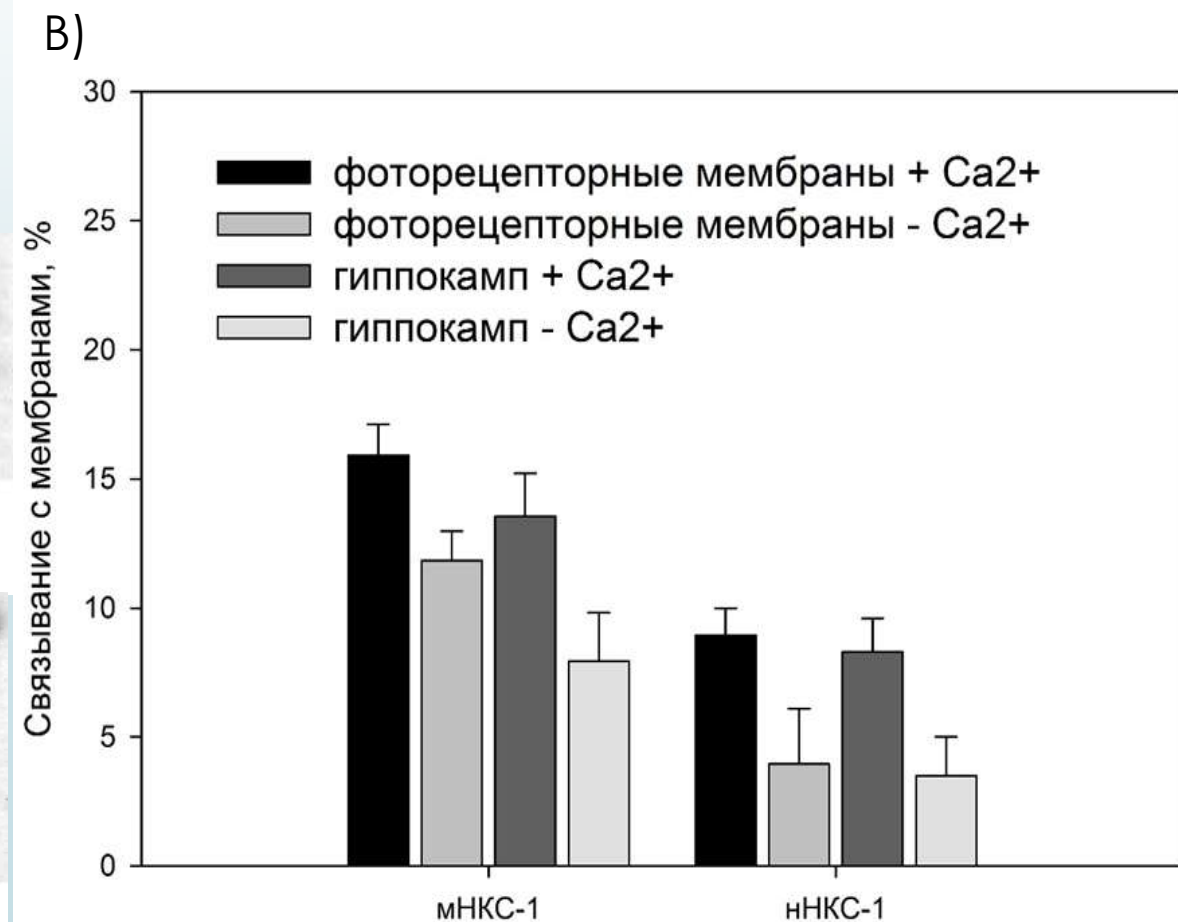
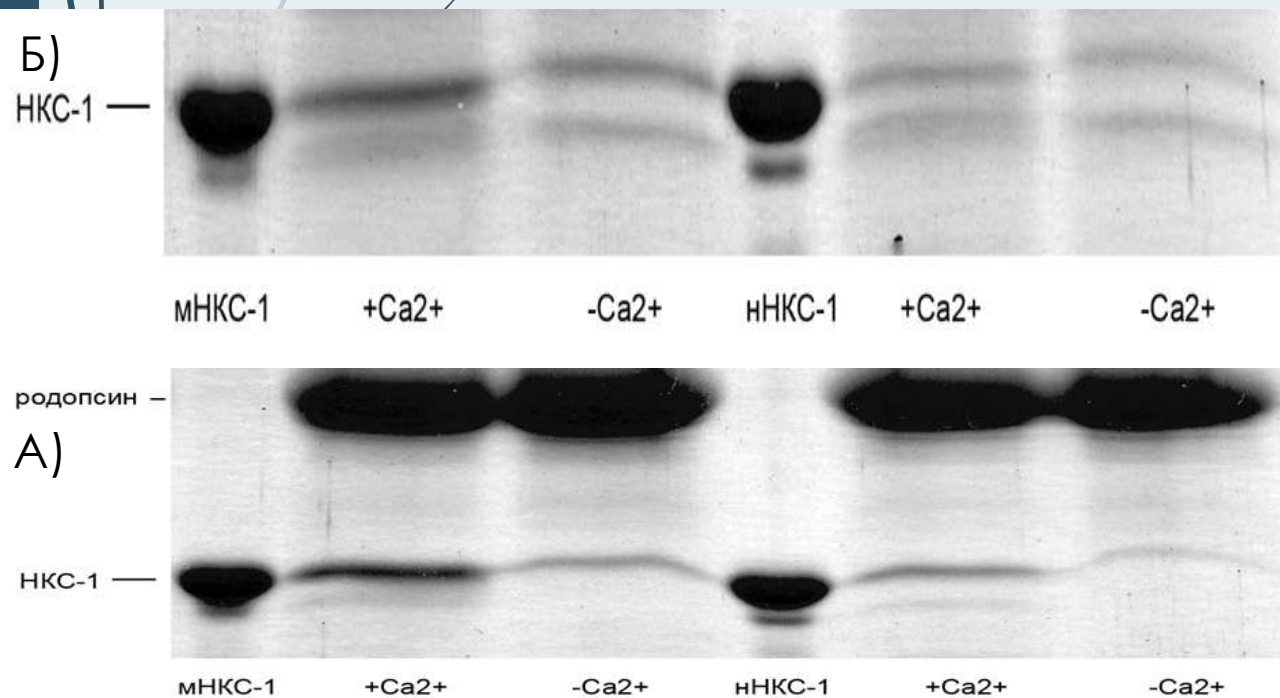
Цель: установить роль вариабельного N-концевого сегмента НКС-1 в механизме его взаимодействия с мембранами различного фосфолипидного состава

- Задачи
- Получение мутантных форм НКС-1, содержащих единичные замены в N-концевой регуляторной последовательности
- Выявление ключевых для компартментализации с мембранами аминокислотных остатков
- Установление роли миристоильной группы во взаимодействии НКС-1 с мембранами
- Методы:
- ПЦР, точечный мутагенез, трансформация, экспрессия рекомбинантных белков в бактериальной культуре *E. coli*, гидрофобная и ионообменная хроматография, получение препаратов мембран, соосаждение белков с мембранами, эдектрофорез в ПААГ, денситометрический анализ эффективности связывания белков с мембранами по полиакриламидному гелю.

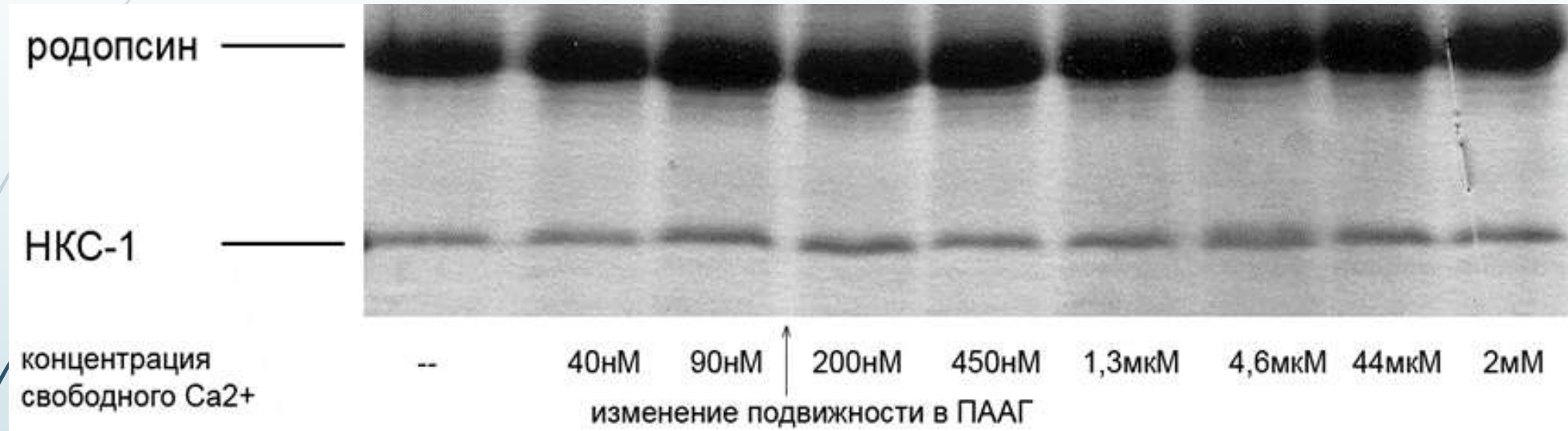
Определение степени миристилирования дикого типа и мутантных форм НКС-1 методом ВЭЖХ



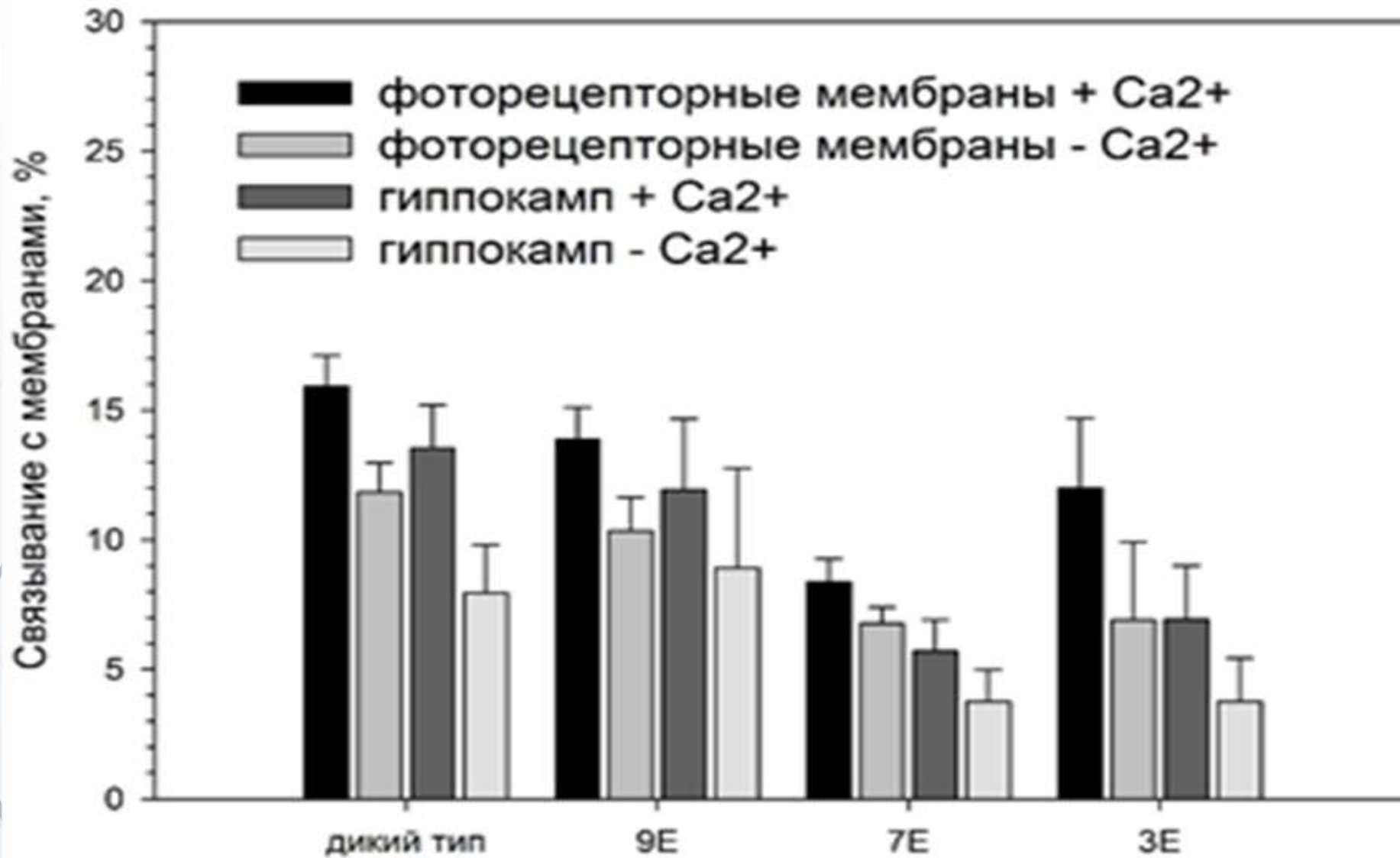
Электрофореграммы связывания миристоилированного НКС-1 (мНКС-1) и немиристоилированного НКС-1 (нНКС-1) с фоторецепторными мембранами (А) и мембранами гиппокампа (Б), и их анализ (В).



Электрофореграмма связывания дикого типа НКС-1 с фоторецепторными мембранами в присутствии различных концентраций Ca^{2+}



Сравнительный анализ дикого типа и мутантных форм НКС-1



Выводы:

- ▶ 1. Наибольший вклад в связывание НКС-1 с мембранами различных фосфолипидных составов вносит миристоильная группа, функционирование которой не является Ca^{2+} -зависимым процессом, так как структурные особенности НКС-1 препятствуют обратному захвату миристана после срабатывания Ca^{2+} /миристоильного переключателя даже при полном хелатировании Ca^{2+} .
- ▶ 2. Помимо миристоильной группы в механизме взаимодействия НКС-1 с мембранами участвуют положительно заряженные остатки лизина в 3 и 7 положениях.
- ▶ 3. Вклад различных структурных элементов НКС-1 в механизм его взаимодействия с мембранами зависит от их фосфолипидного состава последних. Так, в случае с мембранами гиппокампа, по сравнению с фоторецепторными мембранами возрастает роль N-концевой регуляторной последовательности НКС-1



Спасибо за внимание!