

## Получение и кристаллизация отдельных структурных элементов шаперонина бактериофага ОВР.

*Зюркалова Дарья Владимировна*

*Аспирант*

Институт белка РАН, Пущино, Россия

*E-mail: vic4455@mail.ru*

Шаперонины бактериофагов впервые были описаны сравнительно недавно, поскольку лишь единичные представители бактериофагов содержат в своем геноме гены собственных шаперонинов. На данный момент их относят к I группе шаперонинов, но низкий уровень идентичности аминокислотных последовательностей бактериального и фагового шаперонина, позволяет предположить, что фаговые шапероны следует относить к отдельной категории. Шаперонин бактериофага ОВР является одним из трех наиболее описанных на данный момент шаперонинов. Молекула шаперонина ОВР состоит из 7 субъединиц, собранных в гептамерное кольцо, но при этом несимметрична. В свою очередь, каждый мономер состоит из трех доменов: экваториального (а.о. 1-136 и 410-520), среднего (а.о. 136-191 и 375-410) и апикального (а.о. 192-374) (рис.1).

На данный момент опубликована только одна структура шаперонина бактериофага ОВР в апо-форме, полученная с помощью крио-электронной микроскопии с разрешением 4,5Å [1]. Нами получена кристаллическая структура с разрешением 3,37Å. Так как разрешение имеющихся данных недостаточно для точного и полного описания структуры, было решено получить и закристаллизовать укороченные формы шаперонина, представляющие собой отдельные структурные части молекулы. Для этой цели были выбраны: апикальный домен и два варианта фрагментов, включающих экваториальный и средний домены. (ОВРΔ145 и ОВРΔ185) (рис. 2). Для каждого белка были созданы штаммы суперпродуценты и разработаны методики выделения и очистки.

Белки ОВРΔ145 и ОВРΔ185 выделяли в нативных условиях. Очистка включала в себя две последовательные хроматографии на Butyl - Sepharose и Q-Sepharose. Финальные гомогенные препараты получали с помощью гель-фильтрации на Superdex200.

Препарат апикального домена выделяли из телец включения в денатурирующих условиях с SDS. В ходе ренатурации SDS удаляли с помощью KCl. При ренатурации для удержания белка в растворе в образец добавляли высокомолекулярные производные полиэтиленгликоля. Финальная очистка препарата проводилась с помощью гель-фильтрации на Superdex75. Очищенные белки концентрировали и использовали при кристаллизации.

Для очищенных белков был проведен скрининг условий кристаллизации. Для ОВРΔ145 и ОВРΔ185 найдены условия кристаллизации, но качество кристаллов оказалось недостаточным и требуется оптимизация условий роста кристаллов (рис.3). Для апикального домена были получены кристаллы, качество которых достаточно для дальнейшего тестирования. Так для апикального домена собран набор диффракционных данных с разрешением 2,6 Å.

### Источники и литература

- 1) Stanishneva-Konovalova TB, Semenyuk PI, Kurochkina LP, Pichkur EB, Vasilyev AL, Kovalchuk MV, Kirpichnikov MP, Sokolova OS. Cryo-EM reveals an asymmetry in a novel single-ring viral chaperonin. J Struct Biol. 2020 Feb 1;209(2):107439. doi: 10.1016/j.jsb.2019.107439. Epub 2019 Dec 21. PMID: 31870903.

### Иллюстрации

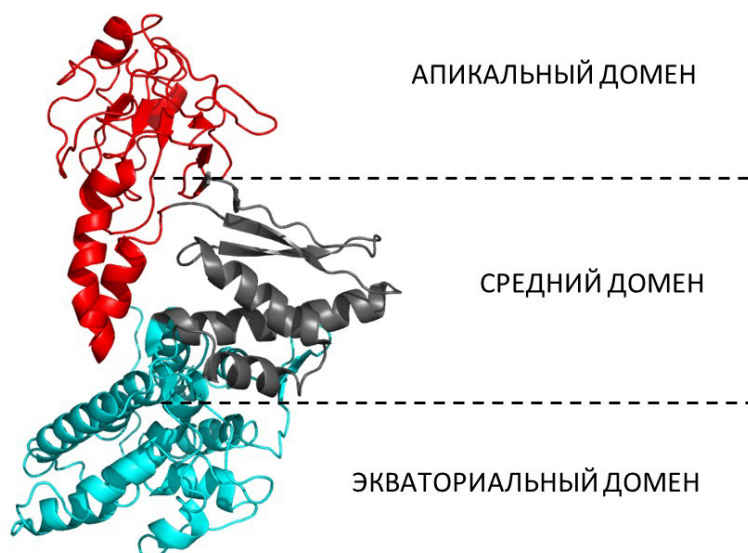


Рис. : Рисунок 1. Структура мономера шаперонина ОВР. Цветами выделены домены мономера.

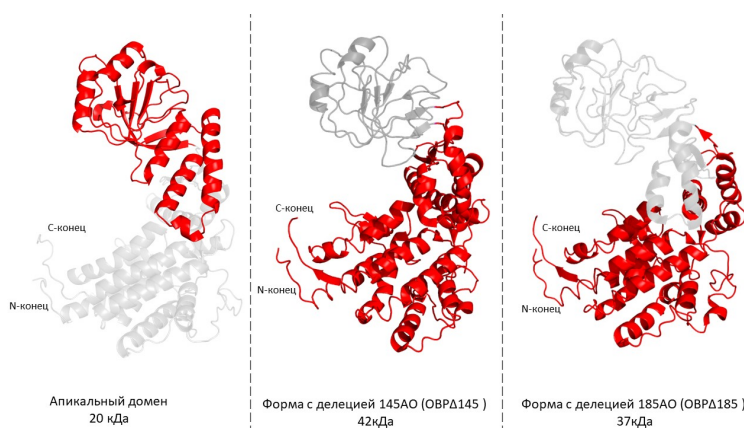


Рис. : Рисунок 2. Дизайн укороченных форм мономера, выбранных для выделения и кристаллизации. Цветом выделены выбранные структурные элементы молекулы.

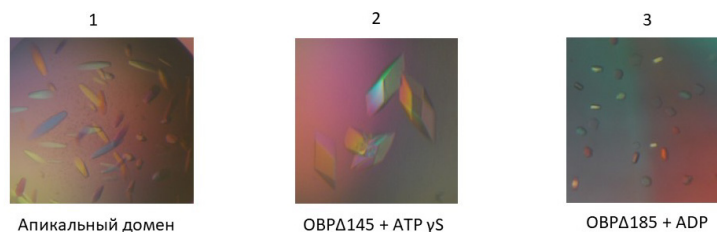


Рис. : Рисунок 3. Полученные кристаллы укороченных форм шаперонина бактериофага ОВР. 1 - апикальный домен, условия: 0.06М трехосновный дигидрат цитрата натрия (рН 5.6); 0.3М NaCl; 1,2% Полимер этиленимина; 40% Глицерина; 2 - ОВРΔ145 + АТР  $\gamma$ S, условия: 0.075 М Tris HCL (рН 8.5); 1.5М Сульфат аммония; 25% Глицерин; 3 - ОВРΔ185 + АDP, условия: 0.14М трехосновный дигидрат цитрата натрия; 0.07М тригидрат натрия какодилат (рН 6.5);