

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73

КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ РЕНТГЕНОВСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ С-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА МИОМЕЗИНА-2

© 2021 г. Е. П. Ламбер¹, Н. Пинотсис^{2,*}

¹ *Институт трансляционной биомедицины Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия*

² *Институт структурной и молекулярной биологии, Биркбек Колледж, Лондон, Великобритания*
*E-mail: n.pinotsis@mail.cryst.bbk.ac.uk, n.pinotsis@bbk.ac.uk

Поступила в редакцию 21.08.2020 г.

После доработки 14.09.2020 г.

Принята к публикации 22.09.2020 г.

Рекомбинантный С-концевой фрагмент миомезина-2 очищен до гомогенного состояния. Методом диффузии паров растворителя найдены условия кристаллизации С-концевого фрагмента миомезина-2, и выращены кристаллы данного белка для рентгеновского исследования. Кристаллы принадлежат пр. гр. *P222*, и имеют параметры элементарной ячейки: $a = 114.2$, $b = 142.0$, $c = 111.7$ Å. От одного из выращенных кристаллов на синхротроне ESRF собран дифракционный набор до разрешения 3.4 Å, пригодный для определения пространственной структуры С-концевого фрагмента миомезина-2.

DOI: 10.31857/S0023476121050118

ВВЕДЕНИЕ

В течение долгого времени группа кардиомиопатий (КМП) считалась заболеваниями с неизвестной этиологией. Однако с развитием молекулярно-генетических методов и молекулярной кардиологии была обнаружена связь этой группы заболеваний с генетическими дефектами синтеза различных белков. Считается, что на долю генетически обусловленных КМП приходится ~30% случаев [1, 2]. В настоящее время известно, что возникновение гипертрофической кардиомиопатии (ГКМП) связано с мутациями генов саркомерных белков [3] и, как следствие, нарушением структуры и функции сократительной мышечной единицы – саркомера.

Предположительно, белки семейства миомезина (миомезин-1, миомезин-2 и миомезин-3) [4–7] играют роль структурных звеньев, связывающих миозиновые волокна в саркомере. Миомезин-2 (изначально носивший название М-белка) наименее изучен [6]. Миомезин-2 интересен тем, что он экспрессируется в основном в быстро сокращающихся мышцах и саркомерах миокарда [8]. Недавние генетические исследования обнаружили у пациентов с диагнозом ГКМП мутации в гене миомезина-2 [9]. Кроме того, мутации миомезина-2 были обнаружены у пациентов с пороком сердца, тетрадой Фалло [10, 11]. Эти данные позволяют предположить, что миомезин-2 играет важную роль в работе сердца. Соответственно, исследования структуры и функции белка миомезина-2 важны как для изучения его роли в работе сердечной мышцы, так и с целью выявления ме-

ханизмов, приводящих к возникновению сердечной патологии, включая ГКМП и тетраду Фалло.

Миомезин-2 состоит из 13 доменов и имеет молекулярную массу 165 кДа [6]. N-концевой фрагмент миомезина-2 предположительно отвечает за связывание с миозином [12], за ним следуют два Ig-домена, пять FnIII-доменов и еще пять Ig-доменов, расположенных на С-конце. Два последних Ig-домена, mp12-mp13, представляют особый интерес, так как одна из мутаций, приводящих к развитию порока сердца, тетраде Фалло, была обнаружена именно на этом участке миомезина-2. По этой причине в настоящей работе исследован С-концевой фрагмент миомезина-2 методом белковой кристаллографии.

Перспективы использования результатов данного исследования в медицине в будущем вызывают интерес к изучению пространственной структуры миомезина-2. В настоящей работе представлена методика получения и очистки рекомбинантного С-концевого фрагмента mp12-mp13 миомезина-2. Найдены условия кристаллизации и получены кристаллы mp12-mp13. От выращенных кристаллов собран дифракционный набор до разрешения 3.4 Å, пригодный для решения пространственной структуры С-концевого фрагмента миомезина-2.

МЕТОДЫ

Выделение рекомбинантного С-концевого фрагмента mp12-mp13 миомезина-2. Рекомбинантный белок, человеческий С-концевой фрагмент миомезина-2 mp12-mp13, длиной 211 аминокислотных остатков и имеющий молекулярную массу

Таблица 1. Статистические характеристики дифракционных данных С-концевого фрагмента mp12-mp13 миомезина-2

Пр. гр.	$P222_1$
$a, b, c, \text{Å}$	114.23, 141.95, 111.68
α, β, γ , град	90.0, 90.0, 90.0
Длина волны, Å	0.976582
Разрешение, Å	47.87–3.41 (3.50–3.41)
Количество независимых рефлексов	25371 (1808)
Полнота набора	99.5 (97.0)
$I/\sigma(I)$	6.66 (0.38)
Повторяемость	4.42 (4.50)
$CC(1/2)$	99.9 (28.2)
R_{meas}	15.5 (403.8)

Примечание. В скобках приведены значения для слоя высшего разрешения.

23.7 кДа, был экспрессирован в бактериальных штаммах *E. coli* BL21 Star с использованием ранее описанного протокола аутоиндукции [13]. Клетки центрифугировали ($6000 \times g$, 15 мин) и ресуспендировали в лизирующем буфере, содержащем 25 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 0.3 М NaCl, 5 мМ β -меркаптоэтанол (β МЕ), 10 мМ имидазола, 5% глицерина, 1 таблетку ингибиторов протеаз (Complete, EDTA-free, Roche) и 0.25 мг/мл лизоцима. Клетки лизировали в гомогенизаторе EmulsiFlex-C3 (Avestin), неочищенный экстракт центрифугировали при $50000 \times g$ в течение 45 мин. Супернатант наносили на колонку HisTrap объемом 5 мл (GE Healthcare), калиброванную лизисным буфером и подключенную к хроматографической системе АКТА (GE Healthcare). Стадии промывки выполняли множественными объемами лизирующего буфера, а также буфером с высоким содержанием соли (25 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 1 М NaCl, 5 мМ β МЕ, 10 мМ имидазола, 5% глицерина). Белок элюировали, используя градиент имидазола (буфер для элюирования: 25 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 150 мМ NaCl, 5 мМ β МЕ, 0.6 М имидазола, 5% глицерина). Для отрезания гистидинового тага (6His-tag) использовали протокол расщепления на колонке, описанный в [13]. Затем элюированный белок диализовали в течение ночи против буфера А (25 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 5% глицерина) и загружали на колонку Resource Q (GE Healthcare). Белок элюировали градиентом NaCl с концентрацией ~ 0.05 – 0.1 М NaCl. Элюированный белок дополнительно концентрировали и загружали в колонку Superdex 200 16/60 (GE Healthcare), уравновешенную буфером SEC (25 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 М NaCl, 5 мМ β МЕ, 5% глицерина). Качество белка оценивали с помощью SDS-PAGE. Чистота рекомбинантного белка составляла более 95%.

Кристаллизация. Поиск условий кристаллизации проводили методом диффузии паров растворителя, используя раствор белка с концентрацией 12 мг/мл в 25 мМ Tris-HCl-буфере, pH 7.5, содержащем 150 мМ NaCl, 5% глицерина, 5 мМ β МЕ и коммерческие наборы фирм Hampton-Research и Molecular Dimensions. Образование кристаллов наблюдали при использовании в качестве осаждающего раствора 20%-ного полиэтиленгликоля 3350 и 0.2 М трехосновного моногидрата цитрата калия при температуре 16°C.

Сбор и обработка дифракционных данных. Кристаллы были предварительно заморожены в криорастворе, содержащем 15% MPD. Дифракционные наборы собраны на синхротроне ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Франция) при 100 К на станции синхротронного излучения id29. Наилучший дифракционный набор собран до разрешения 3.4 Å , статистика этого набора приведена в табл. 1. Данные обрабатывали с использованием пакета программ XDS [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Рекомбинантный белок, С-концевой фрагмент mp12-mp13 человеческого миомезина-2, был очищен до гомогенного состояния. Первоначальный поиск условий кристаллизации проведен методом диффузии паров растворителя в сидящей капле с использованием коммерческих кристаллизационных наборов фирм Hampton Research и Molecular Dimensions. Кристаллы были обнаружены в условиях B12 коммерческого кристаллизационного набора JCSG-plus фирмы Molecular Dimensions (рис. 1). Дифракционные наборы от замороженных кристаллов собраны при 100 К на источнике синхротронного излучения ESRF. Пример дифракционной картины приведен на рис. 2. Приведенные дифракционные характеристики (табл. 1) показывают, что удалось получить набор данных для кристаллов С-концевого фрагмента mp12-mp13 миомезина-2. Наиболее вероятными являются значения коэффициента Мэтьюса в диапазоне 2.39–3.18, соответствующие шести–восемью молекулам в независимой части и 48.5–61.37% растворителя в ячейке. В данный момент структура находится в процессе решения, одновременно ведется работа по оптимизации условий кристаллизации с целью улучшения дифракционного качества кристаллов.

Степень идентичности аминокислотных последовательностей миомезина-2 и более изученного миомезина-1, который обладает высокой эластичностью (его молекулы могут растягиваться в несколько раз и возвращаться в прежнее состояние без внутренних повреждений) [15], составляет 47%. Несмотря на довольно высокую степень гомологии, функция и локализация миомезина-1 и миомезина-2 различаются: миомезин-1 расположен параллельно миозиновым фи-

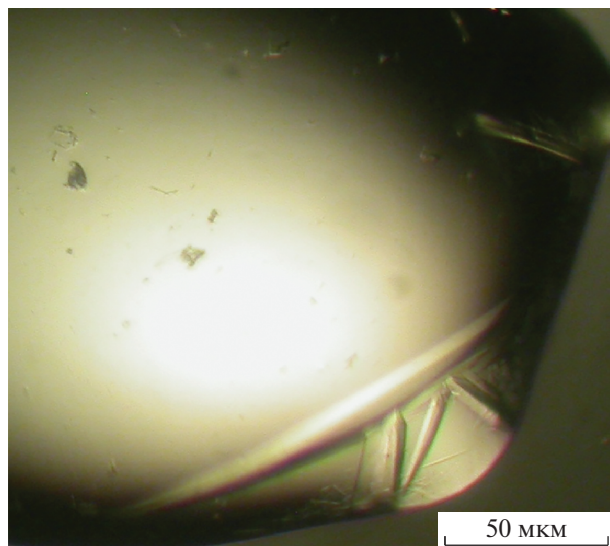


Рис. 1. Кристаллы С-концевого фрагмента $\mu\text{p12-}\mu\text{p13}$ миомезина-2, выращенные методом диффузии паров растворителя.

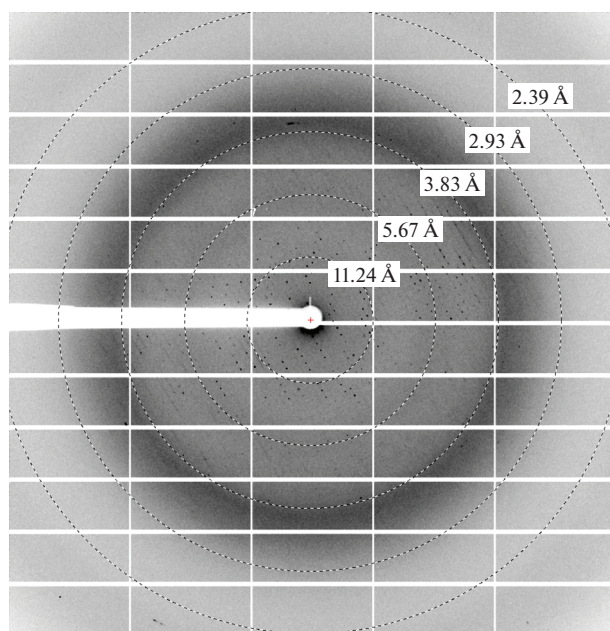


Рис. 2. Дифракционная картина, полученная с кристалла С-концевого фрагмента $\mu\text{p12-}\mu\text{p13}$ миомезина-2 на синхротроне ESRF.

ламентам, миомезин-2 — перпендикулярно [4]. Известно, что С-концевой фрагмент миомезина-1 $\mu\text{p12-}\mu\text{p13}$ отвечает за гомодимеризацию, играющую роль в сборке М-линии саркомера [16]. Получение пространственной структуры С-концевого фрагмента миомезина-2 позволит установить различия между миомезином-1 и миомезином-2, что в дальнейшем поможет установить функцию миомезина-2. Дифракционный набор, представленный в работе, является первым набором, полученным для миомезина-2, и является важным шагом на пути определения простран-

ственной структуры миомезина-2, играющего важную роль в работе сердца.

Авторы выражают благодарность И. Агарковой (Швейцария) за дискуссии при подготовке статьи.

Наборы данных собраны на станции синхротронного излучения id29 на синхротроне ESRF (Гренобль, Франция). Авторы выражают благодарность сотрудникам id29 за помощь при получении дифракционных наборов данных.

Работа выполнена в рамках госзадания Санкт-Петербургского государственного университета (проект № 51143531).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Towbin J.A., Hejmancik J.F., Brink P. et al.* // *Circulation*. 1993. V. 87. № 6. P. 1854. <https://doi.org/10.1161/01.cir.87.6.1854>
2. *Tsubata S., Bowles K.R., Vatta M. et al.* // *J. Clin. Invest.* 2000. V. 106. № 5. P. 655. <https://doi.org/10.1172/JCI9224>
3. *Marian A.J., Roberts R.* // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2001. V. 33. № 4. P. 655. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2001.1340>
4. *Obermann W.M., Gautel M., Steiner F. et al.* // *J. Cell. Biol.* 1996. V. 134. № 6. P. 1441. <https://doi.org/10.1083/jcb.134.6.1441>
5. *Grove B.K., Kurer V., Lehner C. et al.* // *J. Cell. Biol.* 1984. V. 98. № 2. P. 518. <https://doi.org/10.1083/jcb.98.2.518>
6. *Masaki T., Takaiti O.* // *J. Biochem.* 1974. V. 75. № 2. P. 367. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a130403>
7. *Schoenauer R., Lange S., Hirschy A. et al.* // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 376. № 2. P. 3381. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.11.048>
8. *Agarkova I., Perriard J.-C.* // *Trends Cell. Biol.* 2005. V. 15. № 9. P. 477. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.07.001>
9. *Dorn C.* Identification of Disease-Related Genes in Congenital Heart Defects using Next-Generation Sequencing. Dissertation. Dr. RER. NAT. Free University of Berlin, 2014. 173 p.
10. *Apitz C., Webb G.D., Redington A.N.* // *Lancet*. 2009. V. 374. № 9699. P. 1462. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60657-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60657-7)
11. *Troelsen K.D.* Myomesin 2 characterisation of a candidate gene for congenital heart defects. Dissertation. DR. RER. NAT. Copenhagen University, 2017. 145 p.
12. *Obermann W.M., van der Ven P.F., Steiner F. et al.* // *Mol. Biol. Cell.* 1998. V. 9. № 4. P. 829. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.4.829>
13. *Mlynek G., Lehner A., Neuhold J. et al.* // *Amino Acids*. 2014. V. 46. № 6. P. 1565. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1699-x>
14. *Kabsch W.* // *Acta Cryst. D*. 2010. V. 66. № 2. P. 125. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>
15. *Pinotsis N., Chatziefthimiou S.D., Berkemeier F. et al.* // *PLoS Biol.* 2012. V. 10. № 2. P. e1001261. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001261>
16. *Lange S., Himmel M., Auerbach D. et al.* // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 345. № 2. P. 289. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.10.040>