

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БЕЛКА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК



**ЕЖЕГОДНАЯ НАУЧНАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ**

Сборник тезисов

8 - 9 июня 2012 г.
г. Пущино

Программа конференции

8 ИЮНЯ, ПЯТНИЦА

УТРЕННЕЕ ЗАСЕДАНИЕ, НАЧАЛО В 10.00

ОТКРЫТИЕ КОНФЕРЕНЦИИ

БИОСИНТЕЗ БЕЛКА

Председатель: Л. П. Овчинников

В. А. Широков, Ж. А. Афонина, А. Г. Мясников, Б. П. Клахольц и А. С. Спирин. Формирование и структурная организация эукариотических полирибосом (20 мин.)

К. С. Василенко, О. М. Алехина, А. С. Спирин. Функциональная циклизация матричных РНК в процессе трансляции (15 мин.)

Е. А. Согорин, Н. Э. Широких, А. М. Ибрагимова, В. Д. Васильев, С. Ч. Агаларов, А. С. Спирин. Одновременное присутствие 80S рибосомы и 40S субъединицы на лидерной последовательности мРНК (15 мин.)

Д. Н. Лябин и Л. П. Овчинников. Регуляция содержания YB-1 в клетках (20 мин.)

Перерыв до 11:40

СТРУКТУРА БЕЛКОВ И МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Председатель: А. В. Финкельштейн

Н. Н. Васильев, З. Ш. Кутлубаева, В. И. Угаров, Е. В. Четверина, А. Б. Четверин. Зачем Q β -репликазе нужен рибосомный белок S1? (30 мин.)

А. Г. Габдулхаков, С. В. Никонов, М. Б. Гарбер. Пространственная структура комплекса фотосистемы II из *Thermosynechococcus elongates* с тербутрином (10 мин.)

А. Д. Никулин, В. Н. Мурина. Взаимодействие белка Hfq с рибонуклеотидами – гипотеза и эксперимент (10 мин.)

С. Г. Гурьянов, О. М. Селиванова, А. Д. Никулин, Г. А. Енин, Б. С. Мельник, Д. А. Кретов, И. Н. Сердюк, Л. П. Овчинников. Белок YB-1 образует амилоидоподобные фибриллы (15 мин.)

Окончание утренней сессии

ВЕЧЕРНЕЕ ЗАСЕДАНИЕ, НАЧАЛО В 15.00

НАДМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ И КЛЕТКИ

Председатель: С. А. Потехин

А. А. Минин, И. С. Черноиваненко, Е. А. Матвеева. Мембранный потенциал митохондрий регулируется виментиновыми промежуточными филаментами (15 мин.)

А. С. Сюткин, С. Н. Безносков, М. Г. Пятибратов. Различные механизмы спирализации жгутиков галофильных архей (10 мин.)

М. В. Крючков, Г. А. Енин, А. В. Сергеев, А. А. Тимченко, В. Л. Катанаев. Наноструктура поверхности глаза мушек *Drosophila melanogaster* (10 мин.)

А. А. Гордеев, Е. В. Четверина, А. Б. Четверин. Двумерная 3D-культура эукариотических клеток (15 мин.)

Перерыв до 16:20

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ

Председатель: Г. В. Семисотнов

Б. С. Мельник, Т. Н. Поварницына, А. С. Глухов, Т. Н. Мельник. Как «изготовить» суперстабильный белок (15 мин.)

В. А. Балобанов, А. Г. Егорова, Н. С. Катина, В. Д. Васильев, А. В. Мачулин, И. А. Елисеева, Н. Б. Ильина, Р. В. Черткова, Д. А. Долгих, В. Е. Бычкова. Четыре стадии образования амилоидов альбумином (15 мин.)

Е. А. Бошкова, А. В. Ефимов. Новый структурный подкласс ($\alpha+\beta$)-белков (10 мин.)

А. М. Каргатов, А. В. Ефимов. Поиск и анализ структур, образованных на ранних стадиях сворачивания белков (10 мин.)

Ю. Н. Чиргадзе, В. С. Сивожелезов, Р. В. Полозов, В. В. Иванов. Правила узнавания факторов транскрипции семейства Zn-Cys²His² фрагментами операторной ДНК (15 мин.)

Перерыв до 18:00

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ

Председатель: В. В. Филимонов

Н. В. Довидченко, М. Ю. Суворина, О. М. Селиванова, И. А. Елисеева,
А. К. Сурин, В. В. Шматченко, А. В. Финкельштейн, О. В. Галзитская. Как
определить размер зародыша из концентрационной зависимости
продолжительности лаг периода? Приложение: инсулин (20 мин.)

А. В. Ефимов Хиральность белковых структур (30 мин.)

Окончание вечерней сессии

ЗАКРЫТИЕ КОНФЕРЕНЦИИ

9 ИЮНЯ, СУББОТА – ПИКНИК 13:00

Тезисы докладов

ФОРМИРОВАНИЕ И СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ПОЛИРИБОСОМ

В.А. Широков⁽¹⁾, Ж.А. Афонина⁽¹⁾, А.Г. Мясников⁽²⁾, Б.П. Клахольц⁽²⁾ и А.С. Спирин⁽¹⁾

*Институт белка РАН, Пущино ⁽¹⁾, и Институт генетики и молекулярной и клеточной биологии, Страсбург ⁽²⁾
shirokov@vega.protres.ru*

Как показано нами ранее, трансляция мРНК в пшеничной бесклеточной системе длительного действия (SECF) сопровождается постепенным, в течение нескольких раундов трансляции, формированием полирибосом, которые в основном представляют собой двурядные структуры, аналогичные наблюдаемым *in vivo*.

В настоящей работе проведен подробный анализ структурной организации таких полирибосом и процесса их формирования в бесклеточной системе трансляции. Для этого использован метод крио-электронной томографии, позволяющий исследовать индивидуальные макромолекулярные комплексы в состоянии, максимально приближенном к нативному.

Анализ реконструированных томограмм показал, что полирибосомы обладают высокой степенью пространственной организации за счет межрибосомных взаимодействий в пределах каждой полисомы. Исходя из найденных ориентаций рибосом в индивидуальных полирибосомах и определенного на этом основании хода цепи мРНК идентифицированы три типа организации полирибосом: циркулярная, зигзагообразная и спиральная. Обнаружено, что все три типа организации полирибосом возникают уже на ранних стадиях их формирования и наблюдаются в полисомах длиной до 10-12 рибосом (на мРНК размером 1 kb), тогда как более длинные полисомы в основном имеют спиральную форму. Накопление последних происходит при затухании активности системы трансляции, вероятно, в результате возникающих затруднений с терминацией.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЦИКЛИЗАЦИЯ МАТРИЧНЫХ РНК В ПРОЦЕССЕ ТРАНСЛЯЦИИ

К.С. Василенко, О.М. Алехина, А.С. Спирин

kvassil@vega.protres.ru

Считается, что кэпированный 5'- и полиаденилированный 3'-концы эукариотических мРНК взаимодействуют друг с другом через факторы инициации четвертой группы и поли(А)-связывающий белок, и что это взаимодействие является важным фактором, обеспечивающим эффективную инициацию трансляции. Экспериментально было показано сближение концов мРНК в присутствии определенных белковых факторов и способность транслирующих полирибосом образовывать замкнутые структуры как *in vivo*, так и *in vitro*. Однако до сих пор неясно, приводит ли структурная циклизация мРНК и полирибосом к их функциональной циклизации, т. е. к реинициации на той же мРНК рибосом, закончивших синтез белка. Можно предположить, что подобная функциональная циклизация будет отражаться в изменении скорости синтеза белка в процессе работы бесклеточной системы трансляции, вызываемом включением механизма реинициации после прочтения мРНК первыми рибосомами. Применение метода *in situ* мониторинга синтеза белка, разработанного ранее в нашей лаборатории, позволило нам обнаружить увеличение скорости белкового синтеза в процессе трансляции эукариотических мРНК в системе из асцита мыши. Используя различные конструкции мРНК, а так же специфические конкурентные ингибиторы инициации, такие как кэп-аналог, eIF4E-связывающий белок и пикорнавирусная протеаза, мы показали, что полиаденилирование 3'-конца мРНК и взаимодействие факторов четвертой группы с кэп-структурой и друг с другом являются определяющими для наблюдаемого изменения скорости инициации в процессе трансляции. Этот результат является серьезным свидетельством в пользу существования механизма реинициации транслирующих рибосом, основанного на взаимодействии 5'- и 3'-концов мРНК.

ОДНОВРЕМЕННОЕ ПРИСУТСТВИЕ 80S РИБОСОМЫ И 40S СУБЪЕДИНИЦЫ НА ЛИДЕРНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ мРНК

Е.А. Согорин, Н.Э. Широких, А.М. Ибрагимова, В.Д. Васильев, С.Ч. Агаларов, А.С. Спирин

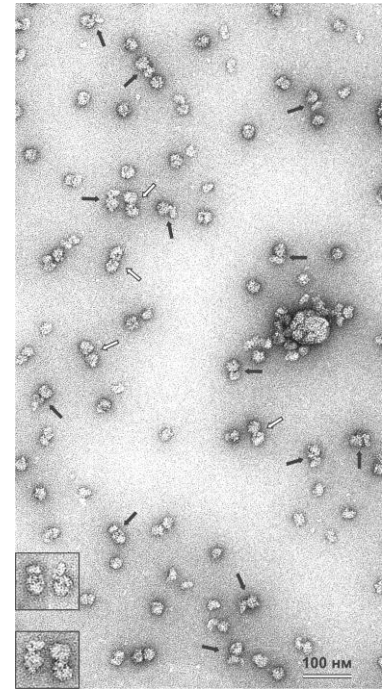
sogorin@vega.protres.ru

Согласно общепринятой модели инициации трансляции у эукариот, 40S рибосомная субъединица, первоначально связывающаяся с 5'-концом мРНК, начинает сканировать нуклеотидную последовательность 5'-нетранслируемой области, пока не остановится на иницирующем кодоне. Здесь к ней присоединяется 60S рибосомная субъединица и образуется 80S рибосома, представляющая собой завершённый иницирующий комплекс, с которого начинается трансляция.

Проведено исследование связывания лидерных последовательностей мРНК с рибосомами методами

седиментации в сахарозном градиенте и электронной микроскопии. Показано, что лидерная последовательность мРНК из ВТМ (омега-РНК) может связываться одновременно с 80S рибосомой и 40S рибосомной субъединицей. Обнаружено, что нуклеотидные замены в омега-РНК, приводящие к дестабилизации структуры РНК, не влияют на ее способность образовывать комплекс одновременно с 80S рибосомой и 40S рибосомной субъединицей. Показано, что лидерная последовательность глобиновой мРНК также может образовывать подобный комплекс. Высказано предположение, что способность лидерных последовательностей мРНК связывать одновременно 80S рибосому и 40S субъединицу не зависит от природы лидера и, возможно, отражает до сих пор не известные механизмы инициации трансляции у эукариот.

Следует отметить, что сканирующую 40S субъединицу никогда ранее не наблюдали физическими методами.



Электронная микрофотография комплексов омега-РНК с рибосомами, обнаруженных в данной работе. Черными стрелками отмечены комплексы омега-РНК с 80S рибосомой и 40S субъединицей, белыми – с двумя 80S рибосомами.

РЕГУЛЯЦИЯ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА YB-1 В КЛЕТКАХ**Д.Н. Лябин, Л.П. Овчинников***lyabin@vega.protres.ru*

YB-1 – это эукариотический белок, который выполняет в клетке, а возможно и вне её, самые разнообразные функции, основанные на способности YB-1 взаимодействовать с РНК и ДНК, а также множеством других белков. YB-1 участвует в целом ряде клеточных процессов, включая пролиферацию, дифференцировку и ответ на стрессовые воздействия. YB-1 обладает онкогенной и антионкогенной активностью, повышает устойчивость клеток к стрессовым воздействиям и является одним из маркеров множественной лекарственной устойчивости. Характер действия YB-1 на клеточные процессы зависит от его содержания в клетке и от его распределения между ядром и цитоплазмой. В ядре он участвует в регуляции транскрипции многих генов, вовлечен в процессы репликации и репарации ДНК, а также сплайсинга пре-мРНК. В цитоплазме YB-1 упаковывает мРНК в мРНП, стабилизирует мРНК и регулирует их трансляцию. Кроме того, YB-1 может секретироваться из клеток и, связываясь с рецепторами на их поверхности, активировать внутриклеточную сигнализацию.

Несмотря на значительный прогресс в изучении функций YB-1, регуляция синтеза и содержания самого YB-1 в клетке остается малоизученной. В данной работе мы выяснили особенности синтеза YB-1 в эукариотических клетках. Мы установили, что в лизатах органов кролика количество белка YB-1 зачастую не коррелирует с количеством мРНК *YB-1*. В культивируемых клетках количество белка YB-1 и количество мРНК *YB-1* слабо варьирует, а значительная часть мРНК *YB-1* находится в составе свободных мРНП в большинстве проанализированных эукариотических клеток. Однако синтез белка YB-1 в таких клетках происходит, что нам удалось показать с помощью разработанной методики детекции синтеза YB-1. Также мы показали, что содержание и синтез YB-1 в клетках зависит от условий, меняющих скорость клеточного деления (плотность клеточной культуры, голодание клеток по сыворотке, обработка некоторыми ксенобиотиками). Мы выяснили, что стабильность белка YB-1 в культуре клеток не отличается от стабильности тотального клеточного белка. Дегградация белка YB-1, по-видимому, происходит во время фазы G1 клеточного цикла.

ЗАЧЕМ Q β -РЕПЛИКАЗЕ НУЖЕН РИБОСОМНЫЙ БЕЛОК S1?**Н.Н. Васильев, З.С. Кутлубаева, В.И. Угаров, Е.В. Четверина, А.Б. Четверин***alexch@vega.protres.ru*

Одной из четырех субъединиц Q β -репликазы (РНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага Q β) является рибосомный белок S1. С 1972 года, когда в лаборатории Ч. Вайссмана был получен и изучен соге-фермент (репликаза, лишенная этой субъединицы), считалось доказанным, что белок S1 (1) необходим для синтеза РНК на (+)-цепи геномной РНК фага Q β ; (2) действует на стадии инициации синтеза РНК; (3) не участвует на последующих стадиях (элонгации и терминации); и (4) не нужен для репликации RQ РНК («малых реплицирующихся РНК», «6S РНК»). В данном сообщении будет показано, что ни одно из этих утверждений не является верным. В частности, что белок S1 (1) не требуется для однократного копирования любой матрицы, в том числе (+)-цепи Q β РНК; (2) стимулирует инициацию на (+)-цепи Q β РНК только в условиях высокой ионной силы, когда ослаблены РНК-белковые взаимодействия; (3) нужен для экспоненциальной репликации как Q β РНК, так и RQ РНК. Будет также показано, что в отсутствие белка S1 большая часть синтезированной РНК оказывается в двутяжной форме и, следовательно, не может служить матрицей в следующих циклах репликации, а в присутствии белка S1 почти вся РНК оказывается в однотяжной форме. Однако роль белка S1 состоит не в расплетании двойной спирали РНК, так как в отсутствие белка S1 репликативный интермедиат остается однотяжным в течение всей элонгации и еще некоторое время после нее. Механизм же действия белка S1 состоит в том, что он ускоряет выход однотяжного продукта сразу по завершении элонгации и, таким образом, препятствует его спонтанному отжигу с матрицей. Иными словами, белок S1 является фактором терминации синтеза РНК. В этой функции белок S1 полностью заменяет его фрагмент, содержащий первые два ОВ (“Oligonucleotide/oligosaccharide Binding”) домена.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА ФОТОСИСТЕМЫ II ИЗ *THERMOSYNECHOCOCCUS ELONGATES* С ТЕРБУТРИНОМ

А.Г. Габдулхаков, С.В. Никонов, М.Б. Гарбер.

azat@vega.protres.ru

Ключевым компонентом фотосинтетического пути образования кислорода является фотосистема II (ФСII), расположенная в тилакоидной мембране цианобактерий, зеленых водорослей и растений. Мономер фотосистемы II состоит из 20 белковых субъединиц и расположенных между ними 35 молекул хлорофилла, 12 каротиноидов и 25 молекул липидов. Каталитическим центром ФСII является уникальная система фотоокисления воды - Mn_4CaO_5 кластер, в котором в результате серии биохимических реакций две молекулы воды окисляются до молекулярного кислорода, четырех протонов и четырех электронов. В ходе работы фотосистемы II происходит восстановление пластохинонов, подвижных переносчиков электронов, располагающихся в билипидном слое мембраны. Предполагают, что сайты взаимодействия пластохинонов с ФСII являются мишенью для гербицидов.

Для понимания механизма электронного транспорта, а также для определения точного места связывания гербицидов с фотосистемой II была определена пространственная структура комплекса ФСII с тербутрином (2-tert-butylamino-4-ethylamino-6-methylthio-1,3,5-triazine) с разрешением 3.2 Å. Молекула тербутрина обнаружена в области связывания подвижного пластохинона Q_B . Она прочно связана с фотосистемой II и удерживается в ней гидрофобными взаимодействиями и тремя водородными связями. В результате пластохинон Q_B не может занять свое место в фотосистеме II, что исключает транспорт электронов и блокирует ее работу.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКА Hfq С РИБОНУКЛЕОТИДАМИ – ГИПОТЕЗА И ЭКСПЕРИМЕНТ

А. Д. Никулин, В. Н. Мурина

nikulin@vega.protres.ru

Бактериальный регулятор экспрессии генов белок Hfq имеет две различные РНК-связывающие области с противоположных сторон формируемого им гексамера. Считается, что в одной области происходит связывание мРНК и малых регуляторных РНК, а в другой – полиА участков РНК. Для связывания и расплетания вторичной структуры РНК белку не требуется гидролиз АТФ или ГТФ. Однако было обнаружено, что белок Hfq обладает слабой АТФазной активностью, был локализован сайт связывания АТФ и предложена модель комплекса АТФ-Hfq.

Нами были определены структуры комплексов белка Hfq из *Pseudomonas aeruginosa* с АТФ, АДФНФ, ЦТФ и УТФ, при этом белок не образовывал комплексов с ГТФ. АТФ и АДФНФ связываются в предсказанном участке, однако расположение АТФ отличается от предложенного ранее. Учитывая, что трифосфат нуклеотида в полученном комплексе не имеет близких контактов с атомами белка, участие Hfq в гидролизе фосфодиэфирной связи АТФ кажется маловероятным. УТФ был локализован с противоположной стороны белка, причем в зависимости от условий получения комплекса УТФ-Hfq, как в классическом сайте узнавания мРНК, так и в сайте, ранее не наблюдавшемся для белка Hfq.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

БЕЛОК YB-1 ОБРАЗУЕТ АМИЛОИДОПОДОБНЫЕ ФИБРИЛЛЫ

С.Г. Гурьянов, О.М. Селиванова, А.Д. Никулин, Г.А. Енин, Б.С. Мельник, Д.А. Кретов,
И.Н. Сердюк, Л.П. Овчинников

sergey@vega.protres.ru

Недавно мы обнаружили, что белок YB-1 в условиях высокой ионной силы может образовывать протяженные фибриллы. С использованием ряда фрагментов YB-1 мы установили, что за образование фибрилл отвечает домен холодового шока, а другие домены по-разному влияют на этот процесс: А/Р-домен стимулирует фибриллообразование, первая половина С-концевого домена блокирует фибриллообразование, а вторая его половина снимает это блокирующее действие. Оказалось также, что домен холодового шока сохраняет способность к образованию фибрилл при физиологической ионной силе, при этом А/Р-домен также стимулирует фибриллообразование, а С-концевой домен, как укороченный, так и полноразмерный, предотвращает образование фибрилл.

Мы предположили, что фибриллы YB-1 являются амилоидоподобными. Действительно, оказалось, что фибриллы специфически окрашиваются тиофлавином Т и конго красным. Кроме того, при инкубации YB-1 при высокой ионной силе в белке увеличивалась доля β -структуры, а рассеяние рентгеновских лучей на ориентированных препаратах фибрилл показало наличие периодов, соответствующих амилоидной кросс- β -структуре.

Анализ электронно-микроскопических изображений фибрилл фрагмента YB-1 без С-концевого домена позволил выявить ряд структур, которые могут быть промежуточными стадиями роста фибрилл. На основе этих структур были предложены модели внутренней организации фибрилл.

Амилоидные структуры обычно являются достаточно стабильными нерастворимыми образованиями. Мы проверили устойчивость фибрилл YB-1, полученных в условиях высокой ионной силы, к понижению концентрации соли до физиологической концентрации. Оказалось, что фибриллы YB-1 растворяются при физиологических условиях и могут быть обратимыми, в отличие от большинства известных амилоидов. Мы предполагаем, что образование амилоидоподобной структуры YB-1 может иметь физиологическое значение.

МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МИТОХОНДРИЙ РЕГУЛИРУЕТСЯ ВИМЕНТИНОВЫМИ ПРОМЕЖУТОЧНЫМИ ФИЛАМЕНТАМИ

А.А.Минин, И.С.Черноиваненко, Е.А.Матвеева

Митохондрии играют центральную роль в клеточной физиологии, и их состояние критично для многих процессов. Почти все функции митохондрий зависят от их мембранного потенциала, механизмы регуляции которого мало изучены. Наша работа посвящена изучению роли виментиновых промежуточных филаментов (ВПФ) в поддержании нормального функционирования митохондрий. Используя микроскопию живых клеток без ВПФ и с восстановленными ВПФ мы изучали, как их присутствие влияет на потенциал митохондрий. Наши данные свидетельствуют о том, что ВПФ обеспечивают высокий потенциал и увеличенный синтез АТФ. Мы обнаружили, что за этот эффект отвечает участок в N-концевой части молекулы виментина, и даже содержащий его фрагмент молекулы способен увеличивать потенциал митохондрий. Кроме того, мы показали, что эффект на митохондрии не зависит от степени полимеризации виментина, и единичные филаменты длиной в одну молекулу образованные мутантом Y117L, связываются с митохондриями и увеличивают их потенциал.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук и РФФИ (грант № 10-04-00414-а).

РАЗЛИЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СПИРАЛИЗАЦИИ ЖГУТИКОВ ГАЛОФИЛЬНЫХ АРХЕЙ

Сюткин А.С., Безносков С. Н., Пятибратов М.Г.

alexeysyutkin@gmail.com

Ранее мы показали, что наличие двух флагеллинов FlgA1 и FlgA2 является необходимым условием формирования спирального жгутика галофильного археона *Halobacterium salinarum*. В геноме близкородственного галофильного археона *Haloarcula marismortui* имеется два флагеллиновых гена: *flaA2* (расположен на плазмиде pNG100) и *flaB* (расположен на хромосоме I). Мы идентифицировали два штамма данного организма, отличающихся белковым составом нитей жгутиков, состоящих либо из FlaA2-флагеллина с небольшой долей FlaB (FlaA2-штамм), либо только из FlaB-флагеллина (FlaB-штамм). Нами было показано, что у клеток FlaB-штамма произошла утрата плазмиды pNG100 и, соответственно, гена *flaA2*, при этом, несмотря на отсутствие второго флагеллина, клетки продуцировали спиральные и полностью функциональные жгутики. Показано, что в составе филаментов FlaB-штамма присутствуют две формы флагеллина FlaB, имеющие различную чувствительность к протеолизу, наличие которых может обеспечивать формирование спирального филамента.

Кроме того, впервые выделены и охарактеризованы жгутики психротрофного галофильного археона *Halorubrum lacusprofundi*. Филаменты *H. lacusprofundi* спиральны и проявляют полиморфизм, несмотря на то, что в геноме имеется только один флагеллиновый ген.

Полученные результаты свидетельствуют, что механизмы формирования спиральности жгутиков могут существенно отличаться у различных галофильных архей, и наличие двух флагеллиновых генов не всегда является необходимым (как в случае *Halobacterium salinarum*) условием формирования функционального спирального жгутика. При этом остается неясной роль избыточности по генам флагеллинов у *H. marismortui*. Мы предполагаем, что наличие двух флагеллиновых генов дает возможность не описанной ранее для архей однонаправленной фазовой вариации, обеспечивающей защиту от фагов, распознающих детерминанты, расположенные на жгутиках.

НАНОСТРУКТУРА ПОВЕРХНОСТИ ГЛАЗА МУШЕК *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Крючков М. В., Енин Г. А., Сергеев А.В., Тимченко А. А., Катанаев В. Л.

KryuchkovMV@gmail.com

Модельные организмы, такие как *Drosophila melanogaster*, играют важнейшую роль в биологических исследованиях. Глаз этого насекомого традиционно используется для изучения роли различных белков в органогенезе и формировании упорядоченных структур. В отличие от внутренней организации глаза дрозофилы, ее ретины, роговица глаза этой мушки изучена мало, неизвестен даже ее белковый состав. Ранее нами было показано, что поверхность роговицы глаза дрозофилы покрыта псевдоупорядоченными наноструктурами около 30 нм в высоту и 200 нм в диаметре, выполняющими антиотражательную функцию (Kryuchkov и др.; 2011 PLoS ONE 6(7): e22237). Впервые методом АСМ была продемонстрирована возможность экспресс анализа наноструктуры поверхности глаза мушек. Нами также была продемонстрирована роль Wnt-зависимого сигнального каскада в формировании наноструктур роговицы. Однако молекулярные механизмы формирования таких структур оставались неизвестны.

В данной работе мы провели сравнительный анализ белкового состава роговицы и ретины глаза дрозофилы. Методом масс-спектрометрии нами были идентифицированы мажорные белковые компоненты роговицы: ретинин, энолаза, дрозокристаллин, алкогольдегидрогеназа и кутикулярный белок 72Ес. С использованием трансгенных линий, подавляющих экспрессию соответствующих генов, нами исследована роль каждого из этих белков в формировании роговицы в целом и наноструктур ее поверхности в частности. Так, с помощью атомно-силовой микроскопии выяснено, что при недостатке белка ретинина происходит значительное уменьшение размера наноструктур как по высоте, так и по площади сечения. Таким образом, сочетание физических и генетических подходов позволило нам исследовать молекулярную природу формирования роговицы глаза и ее наноструктурированной поверхности.

ДВУМЕРНАЯ 3D-КУЛЬТУРА ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК**А.А. Гордеев, Е.В. Четверина, А.Б. Четверин***a.a.gordeev@gmail.com*

Трехмерные (3D) культуры эукариотических клеток, где клетки «подвешены» в матриксе геля, лучше имитируют условия многоклеточного организма, чем двумерные (2D) культуры, где клетки прикреплены к пластику или стеклу. Поэтому 3D-культуры предпочтительнее использовать во всех случаях, когда физиологическое состояние клетки играет важную роль, например, при исследованиях дифференцировки стволовых клеток, морфогенеза тканей, злокачественной трансформации клеток, взаимодействий клеток с вирусами, терапевтического и токсического действия лекарственных препаратов. Однако 2D-культуры обладают тем преимуществом, что все клетки расположены в одной плоскости. Это облегчает скрининг и обеспечивает для всех клеток равные физико-химические условия, такие как скорости газообмена, поступления питательных веществ и удаления продуктов метаболизма.

Разработанный нами метод слитых гелей позволяет совместить преимущества обоих подходов: клетки подвешены в матриксе геля (как в 3D-культуре), но при этом расположены в одной плоскости (как в 2D-культуре). Все клетки расположены на одинаковом расстоянии от поверхности геля, что обеспечивает равенство условий и возможность одновременного наблюдения всех клеток с помощью обычного микроскопа; клетки прочно иммобилизованы в геле и имеют точные координаты, но при этом полностью сохраняют жизнеспособность. Это позволяет осуществлять быстрый скрининг, индивидуально наблюдать клетки в течение длительного времени и изучать их реакции на разнообразные воздействия, а также культивировать с образованием сферических микроколоний. Регистрируя процесс формирования микроколоний и извлекая те из них, которые гарантированно произошли из одиночных клеток, можно выделять клеточные клоны. Важно, что метод позволяет получать клоны из относительно плотных клеточных популяций и в отсутствие какого-либо вида химической селекции.

КАК «ИЗГОТОВИТЬ» СУПЕРСТАБИЛЬНЫЙ БЕЛОК.

Мельник Б.С., Поварницына Т.Н., Глухов А.С., Мельник Т.Н.

bmelnik@phys.protres.ru

Самый заманчивый (поскольку удобный с точки зрения методики) способ увеличить стабильность белка это введение ss-связи. Однако, зачастую, воздействие искусственно введенной ss-связи на стабильность белка оказывается совершенно непредсказуемым. Как выбрать участок белковой цепи «скрепление» которого ss-связью максимально стабилизирует белок? В этой работе высказано предположение, что один из важных критериев, при проектировании ss-связи это высокая локальная подвижность участка белковой цепи не скомпенсированная гидрофобными взаимодействиями. На примере зеленого флуоресцентного белка, карбоксиангидразы и апомиоглобина показано, что анализ контактов гидрофобных аминокислот совместно с расчетами подвижности белковой цепи (программой Ponder-Fix) позволяют выбрать участок белковой цепи, введение ss-мостика на котором, вероятнее всего, увеличит стабильность белка.

ЧЕТЫРЕ СТАДИИ ОБРАЗОВАНИЯ АМИЛОИДОВ АЛЬБЕБЕТИНОМ.

Балобанов В.А.¹, Егорова А.Г.¹, Катина Н.С.¹, Васильев В.Д.¹, Мачулин А.В.¹, Елисеева И.А.¹, Ильина Н.Б.¹, Черткова Р.В.², Долгих Д.А.², Бычкова В.Е.¹

¹ *Институт белка РАН, Пущино*

² *Институт биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН*
uraltm62@rambler.ru

Образование амилоидов белками процесс очень сложный. Существует предположение о том, что на первых этапах происходит образование начальных агрегатов, затем образование протофибрилл и в конце созревание готовых амилоидных фибрилл. Однако, до сих пор мало работ, в которых каждый из этих этапов достаточно хорошо охарактеризован. Целью данной работы было выявление и характеристика стадий процесса образования амилоидов искусственным белком альбетеином из начального компактного и структурированного состояния. Были использованы методы флуоресценции и кругового дихроизма, атомно-силовой, электронной и флуоресцентной конфокальной микроскопии. Таким набором методов была исследована кинетика образования амилоидных агрегатов. Были выявлены и охарактеризованы 4 стадии процесса образования амилоидных агрегатов АВВ: 1 стадия характеризуется образованием агрегатов, не связывающих ThT, тестируемых электронной микроскопией и сопровождающихся изменением формы спектров КД; на 2 стадии образуются фибриллярные агрегаты, содержащие кросс- β структуру, о чем свидетельствует рост интенсивности флуоресценции ThT; для 3 стадии характерен дальнейший рост и накопление фибрилл, наблюдаемых в ЭМ и АСМ; на 4 стадии образуются пучки фибрилл, видимые во флуоресцентный микроскоп. Полученный результат позволяет начать дальнейшую работу по исследованию влияния внешних факторов на каждую из стадий в отдельности, а это, в свою очередь, позволит выявить физические закономерности, определяющие ход процесса образования амилоидных структур.

Работа поддержана программой МКБ РАН, грантами РФФИ(09-04-01348) и ФАНИ(02.770.11.0295).

НОВЫЙ СТРУКТУРНЫЙ ПОДКЛАСС ($\alpha+\beta$)-БЕЛКОВ

Бошкова Е.А., Ефимов А.В.

boshkova.e.a@rambler.ru

В результате анализа Банка белковых структур (PDB) выделен новый структурный подкласс ($\alpha+\beta$)-белков. Анализируемые белки (домены) состоят из сильно скрученных β -листов, и одной или нескольких альфа-спиралей, упакованных на вогнутой поверхности β -листа. Таким образом, β -лист служит своеобразной обёрткой для альфа-спирали. В связи с этим, белкам данного подкласса дано название «wгар-белки».

Пространственная структура wгар-белков определяется наличием структурного мотива с уникальной укладкой – сильно скрученной β -шпильки. Сильно скрученная и изогнутая β -шпилька образует в пространстве двойную спираль из β -тяжей. Скрученная шпилька обладает хиральностью: она практически всегда правая, т.е. если смотреть на неё со стороны вогнутой поверхности, то второй тяж по направлению от N- к С-концу располагается справа относительно первого.

Для найденных wгар-белков построено структурное древо. Структурное древо белков – это совокупность всех разрешённых промежуточных и конечных пространственных структур, которые могут быть получены из одной стартовой структуры путём последовательного пристраивания к ней других элементов вторичной структуры в соответствии с набором правил, выведенных из известных принципов структурной организации белков.

В качестве корневого мотива при построении структурного древа для данной группы белков использована сильно скрученная β -шпилька.

При моделировании предпочтение отдано тем путям роста, которые ведут к более быстрому пристраиванию α -спирали, т.к это резко уменьшает площадь доступной для воды гидрофобной поверхности, характерной для вогнутой стороны сильно скрученных β -шпилек.

Белки и белковые домены, содержащие wгар-белки, отобраны визуально из банка белковых данных PDB и системы классификации SCOP 1.75. На древо нанесены только те укладки, которые ведут к известным белкам. Построенное структурное древо включает в себя 93 негомологичных белка (белковых домена), и содержит 54 укладки, заполненные известными белками.

ПОИСК И АНАЛИЗ СТРУКТУР, ОБРАЗОВАННЫХ НА РАННИХ СТАДИЯХ СВОРАЧИВАНИЯ БЕЛКОВ

Каргатов А.М., Ефимов А.В.

kargatov@rambler.ru

Последовательность событий при сворачивании белка играет важную роль в отборе как путей сворачивания, так и получаемых уникальных структур. К сожалению, прямых экспериментальных методов, которые позволяли бы исследовать процесс сворачивания белка в реальном времени, до сих пор нет. Одним из подходов к решению этой задачи является теоретическое моделирование с помощью построения и анализа структурных деревьев белков, однако, во многом этот подход остаётся гипотетическим.

В настоящей работе мы использовали топологический подход для поиска структур, которые свернулись явно раньше, чем остальная часть белка. Суть подхода можно продемонстрировать с помощью следующей аналогии. Очевидно, что снять рубашку, не снимая пиджака, невозможно. Понятно, что рубашка надета раньше пиджака.

В результате анализа известных белков из Банка белковых данных (PDB) нами найден целый ряд белков, в которых имеются структуры - аналоги «рубашек», образованные явно раньше, чем «намотанные» на них остальные части молекул («пиджаки»). Анализ этих структур показал, что во многих случаях это - корневые структурные мотивы, которые мы использовали в качестве «зародышей» при построении структурных деревьев, такие, например, как abcd-единица, 3 β -уголок, α - α -уголок, скрученная β -шпилька и др.

ПРАВИЛА УЗНАВАНИЯ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ СЕМЕЙСТВА Zn-Cys2His2 ФРАГМЕНТАМИ ОПЕРАТОРНОЙ ДНК

Ю.Н. Чиргадзе¹, В.С. Сивожелезов², Р.В. Полозов³, В.В. Иванов⁴

¹Институт белка РАН, Пущино, Московская область, email: chir@vega.protres.ru

²Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская область

³Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская область

⁴Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Московская область

Структурный анализ атомных контактов проведен для 22 комплексов белковых факторов транскрипции семейства Zn-Cys2His2 с фрагментами операторной ДНК. Связывание факторов осуществляется Zn-содержащими белками в виде коротких βα пептидов с длиной цепи около 30 остатков, и включает в себя от 2 до 9 Zn-содержащих белковых единиц. Эти белковые единицы связываются с триплетными нуклеотидными участками операторной ДНК. Мы рассмотрели 46 отдельных модулей комплексов из Zn-содержащих белковых единиц и триплетных фрагментов ДНК, имеющиеся в банке данных. Показано, что почти во всех случаях узнавание ДНК белком определяется четырьмя остатками узнающей α-спирали и одним остатком β-участка. Кодированная цепь ДНК образует четыре канонических контакта с остатками в позициях (-1, 3, 6, 7) узнающей α-спирали. Эти контакты образуются с участками этой цепи ДНК, имеющими нуклеотидную последовательность ZXYZ (подчеркнут узнающий триплет). Некодирующая цепь ДНК образует один контакт с остатком в позиции 2 узнающей α-спирали. Для всех 46 комплексов семейства Zn-Cys2His2 был обнаружен только *один инвариантный контакт*: он образован остатком His7α с фосфатной группой нуклеотида Z кодирующей цепи ДНК. Этот контакт достаточно специфичен и имеет частоту встречаемости 83%. Все остальные контакты переменные и имеют гораздо меньшую частоту встречаемости, они образуются группами азотистых оснований и определяют специфическое связывание конкретных факторов этого семейства. Обнаруженные правила узнавания справедливы для комплексов Zn-содержащих факторов разных таксономических групп. Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 11-07-00374-а.

**КАК ОПРЕДЕЛИТЬ РАЗМЕР ЗАРОДЫША ИЗ КОНЦЕНТРАЦИОННОЙ
ЗАВИСИМОСТИ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЛАГ ПЕРИОДА? ПРИЛОЖЕНИЕ:
ИНСУЛИН**

**Довидченко Н.В., Суворина М.Г., Селиванова О.М., Елисеева И.А., Сурин А.К.,
Шматченко В.В., Финкельштейн А.В., Галзитская О.В.**

ogalzit@vega.protres.ru

Разная морфология фибрилл может являться следствием сходных, но не идентичных путей формирования зрелых протофибрилл. Отличия могут закладываться в начале пути формирования фибрилл, в том числе и на стадии нуклеации. Вопрос о размере зародышей протофибрилл, образованных разными белками и пептидами, до настоящего времени остается открытым. При нуклеационном механизме образование протофибриллы начинается с термодинамически невыгодных шагов, в результате которых образуется «критический зародыш» из n мономеров. В нашей работе предложена кинетическая модель процесса амилоидообразования, позволяющая рассчитывать размер зародыша по определенным кинетическим данным. Данная модель включает в себя, помимо нуклеации, как линейный рост протофибриллы (происходящий только за счет присоединения мономеров к ее концам), так и экспоненциальный рост протофибриллы за счет ее ветвления и дробления. Полученное аналитическое решение и компьютерное моделирование позволяют определить размер зародыша из экспериментально полученных концентрационных зависимостей отношения длительности лаг-периода к времени роста амилоидных фибрилл. В случае инсулина, это отношение не зависит от концентрации белка, что, согласно разработанной теории, соответствует размеру зародыша в один мономер.

Работа выполнена при поддержке Программ "Молекулярная и клеточная биология" и "Фундаментальные науки – медицине" Президиума РАН, грантами РФФИ (11-04-00763, 10-04-00162a).

ХИРАЛЬНОСТЬ БЕЛКОВЫХ СТРУКТУР

А.В. Ефимов

efimov@protres.ru

В настоящей работе термин хиральность означает свойство белковых структур существовать в правой или левой форме. В белках многие структуры существуют преимущественно в одной форме. Простейшей структурой такого типа является α -спираль, которая в белках практически всегда находится в правой форме. Большинство β -листов в белках скручены с образованием правопропеллерных структур, а сильно скрученные длинные β -шпильки образуют своеобразные двойные суперспирали правого смысла. Многие известные структурные мотивы с уникальными укладками цепи также содержат элементы (часто это различные суперспирали) с определенной хиральностью. Так, например, $\beta\alpha\beta$ -единицы, из которых состоят все укладки по Россманну, включая 5s и 7s α/β -мотивы, представляют собой правые суперспирали. В abcd- и abCd-единицах имеются аналогичные правые суперспирали bcd и bCd, соответственно. В белках с ортогональной упаковкой β -слоев встречаются более сложные правые суперспирали, включающие в себя S- и Z-образные β -листы. Всего в докладе рассматривается более десяти структурных мотивов с уникальной хиральностью и приводятся данные о том, что они широко распространены в белках.

Свойство этих и других рассмотренных структур существовать преимущественно в одной (правой или левой) форме имеет важнейшее значение как для сворачивания белков *in vivo* и *in vitro* так и для теоретического моделирования белковых структур, поскольку резко (во многих случаях наполовину) сокращает число разрешенных структур полипептидной цепи. Все это значительно упрощает поиск и отбор уникальных белковых структур.