ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

ИНСТИТУТ БЕЛКА

РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

ЕЖЕГОДНАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

Сборник тезисов

8 - 9 июня 2013 г.
г. Пущино

Программа конференции

8 ИЮНЯ, СУББОТА

УТРЕННЕЕ ЗАСЕДАНИЕ, НАЧАЛО В 10.00

ОТКРЫТИЕ КОНФЕРЕНЦИИ

БИОСИНТЕЗ БЕЛКА

Председатель: Л. П. Овчинников

А. С. Спирин. Конформации и трансформации эукариотических полирибосом (30 мин.)

Ж. А. Афонина, В. А. Широков, А. Г. Мясников, Н. Ф. Хабибуллина, В. Д. Васильев, Ж.-Ф. Менетре, Б. П. Клахольц, А. С. Спирин. Структурная организация и динамика формирования эукариотических полирибосом (20 мин.)

К. С. Василенко, О. М. Алехина, С. Е. Дмитриев, И. М. Теренин, А. С. Спирин. Реинициация трансляции в эукариотических полирибосомах (20 мин.)

Перерыв 11:30-11:50

БИОСИНТЕЗ БЕЛКА

Председатель: В. А. Колб

Д. Х. Фаттахова, П. А. Сахаров, С. Ч. Агаларов, А. С. Спирин. Внутренняя АТФ-независимая инициация трансляции эукариотической мРНК на некэппированной лидерной последовательности РНК вируса табачной мозаики (15 мин.)

А. Г. Габдулхаков, С. В. Никонов, М. Б. Гарбер. Дополненная модель 50S рибосомной субчастицы из Haloarcula marismortui (15 мин.)

Т. Кларк, В. Романов, Г. Кисселман, Д. Ву-Браун, М. Соловейчик, Т. Чан, Р. Гордон, К. Батали, Ю. Чиргадзе, Э. Паи, Н. Чиргадзе. Структура ассоциированного с рибосомой белка SAV1646 из Staphylococcus aureus в кристалле и его возможная функция – образование комплекса с L21 и L27 на пути сборки рибосомы (10 мин.)

О. С. Никонов, Е. А. Столбоушкина, В. И. Архипова, С. В. Никонов, М. Б. Гарбер. Конформационные переходы архейного фактора инициации трансляции 2 (15 мин.)

Д. Н. Лябин, А. Н. Доронин, И. А. Елисеева, Л. П. Овчинников. Альтернативные формы мРНК и белка YB-1 (20 мин.)

Окончание утренней сессии

ДНЕВНОЕ ЗАСЕДАНИЕ, НАЧАЛО В 15.00

НАДМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ И КЛЕТКИ

Председатель: В. Н. Ксензенко

Е. С. Надеждина, А. В. Бураков, А. И. Фокин. Вариабельность микротрубочки-организующей активности аппарата Гольджи (20 мин.)

Е. М. Чудинова, А. А. Шпильман, А. В. Любителев, П. А. Иванов, Е. С. Надеждина. Роль микротрубочек в образовании стрессовых гранул (20 мин.)

Ч. Лин, А. Коваль, С. В. Тищенко, А. Г. Габдулхаков, У. Ф. Тин, Г. Солис, В. Л. Катанаев. RGS-белки обеспечивают двойное ингибирование активности Galpha-субъединиц тримерных G-белков (15 мин.)

Перерыв 16:10-16:25

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДНК И БЕЛКОВ

Председатель: Е. С. Надеждина

В. Н. Ксензенко, А. И. Крутилина, А. В. Калиман, А. С. Глухов. Т5-подобные фаги: что дает сравнительный анализ их геномов (30 мин.)

А. А. Гордеев, Е. В. Четверина, А. Б. Четверин. Как определить точное место интеграции чужеродной ДНК в клеточный геном? (15 мин.)

А.А. Тимченко, Г.А. Енин, В.В. Мелехов, А.В. Сергеев, О.Н. Озолинь. Новый подход к изучению структуры ДНК и ДНК-белковых комплексов методом атомно-силовой микроскопии (10 мин.)

В. В. Филимонов, С. Г. Гурьянов, А. А. Тимченко, Б. С. Мельник, Л. П. Овчинников, Г. В. Семисотнов. Структурно-термодинамические исследования белка YB-1 в растворе (15 мин.)

Перерыв до 18:00-18:45

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ

Председатель: С. А. Потехин

А. В. Ефимов и А. Г. Рязанов. Механизм активации аминных трансмембранных семиспиральных рецепторов (20 мин.)

И. А. Никонорова, Н. В. Корнаков, К. С. Василенко, С. Е. Дмитриев, А. Г. Рязанов. Магний-зависимая регуляция трансляции ионного канала TRPM7 осуществляется

посредством двух открытых рамок считывания, содержащихся в 5’- нетранслируемой области его мРНК (15 мин.)

В. Р. Котов, Е. Д. Байдарова, В. А. Широков, А. Г. Рязанов. Получение биосенсоров на основе 7ТМ-рецепторов, синтезированных в бесклеточной системе трансляции (20 мин.)

Окончание вечерней сессии

ЗАКРЫТИЕ КОНФЕРЕНЦИИ

9 ИЮНЯ, ВОСКРЕСЕНЬЕ – ПИКНИК 13:00

Тезисы докладов

КОНФОРМАЦИИ И ТРАНСФОРМАЦИИ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ПОЛИРИБОСОМ

А.С. Спирин

spirin@vega.protres.ru

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И ДИНАМИКА ФОРМИРОВАНИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ПОЛИРИБОСОМ

Ж. А. Афонина[1], В. А. Широков[1], А. Г. Мясников[2], Н. Ф. Хабибуллина[1], В. Д. Васильев[1], Ж.-Ф. Менетре[2], Б. П. Клахольц[2], А. С. Спирин[1]

[1] *Институт белка РАН и*
[2] *Институт генетики и молекулярной и клеточной биологии (IGBMC), г.Страсбург*

ori224@rambler.ru

Мы исследовали структурную организацию полирибосом, формирующихся в бесклеточной системе трансляции из зародышей пшеницы, методами седиментации, электронной микроскопии и криоэлектронной томографии. Применение крио-ЭТ позволило нам детально описать архитектуру полирибосом, имеющих различные конфигурации – кольца, двойные ряды и трехмерные спирали. Выяснено, что в полирибосомах, визуализируемых как двойные ряды рибосом, топология цепи мРНК может быть как циркулярной (сплюснутые кольца), так и линейной (зигзаг). Анализ полирибосом в течение многих раундов трансляции в бесклеточной системе трансляции длительного действия (CECF) позволил нам проследить за изменением соотношения различных типов полирибосом, формирующихся на кэпированной мРНК с поли(А)-последовательностью или на высоко-эффективной некэпированной мРНК без поли(А). Оказалось, что циркулярные полирибосомы образуются не только на мРНК, содержащей кэп и поли(А) (им приписывают ключевую роль в циркуляризации), но и на мРНК, лишенной этих элементов. Более того, общий ход формирования различных форм полирибосом имеет сходный характер на обеих мРНК, чтоб позволяет предположить независимость этого процесса от кэп и поли(А) элементов. Обнаружена корреляция типа структурной организации полирибосом со степенью их загруженности. Высоко-загруженные полирибосомы имеют форму плотноупакованной трехмерной спирали, которые накапливаются в процессе длительной работы системы трансляции. Одновременно происходит уменьшение содержания кольцевых и двурядных полирибосом. Анализ трансляцинной активности в разных фракциях полирибосом позволяет заключить, что в трехмерных спиральных полирибосомах она заметно снижена. На основе обнаруженных закономерностей предложен сценарий поэтапного формирования эукариотических полирибосом и их последовательных конформационных превращений: «цикл → зигзаг → плотная спираль».

РЕИНИЦИАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ В ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ПОЛИРИБОСОМАХ

К. С. Василенко, О. М. Алехина, С. Е. Дмитриев, И. М. Теренин, А. С. Спирин

kvassil@vega.protres.ru

ВНУТРЕННЯЯ АТФ-НЕЗАВИСИМАЯ ИНИЦИАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ мРНК НА НЕКЭППИРОВАННОЙ ЛИДЕРНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ РНК ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ

Д.Х. Фаттахова, П.А. Сахаров, С.Ч. Агаларов, А.С. Спирин.

В литературе описаны два основных механизма инициации трансляции у эукариот. В случае клеточных мРНК инициация обычно начинается с кэп-структуры на 5'-конце лидерной последовательности и продолжается путем АТФ-зависимого сканирования 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) мРНК. В другом случае, на мРНК некоторых вирусов животных, узнавание стартового кодона мРНК рибосомой определяется наличием специального структурного модуля мРНК, называемого «сайтом внутренней посадки рибосом», и не зависит от кэп-структуры. Однако, существуют лидерные последовательности, как среди вирусных, так и среди клеточных мРНК, которые обеспечивают успешную кэп-независимую инициацию, и в тоже время не содержат сайта внутренней посадки. Возникает вопрос, нужен ли свободный 5'-конец для инициации трансляции на таких лидерах, или же в этих случаях возможна внутренняя инициация.

Для ответа на этот вопрос нами была сконструирована химерная мРНК с лидерной последовательностью РНК вируса табачной мозаики, обеспечивающей эффективную инициацию трансляции в отсутствие кэп-структуры. Было показано, что блокировка 5'-конца такой мРНК путем ковалентного присоединения ДНК-олигонуклеотида с образованием гибридного РНК-ДНК дуплекса на старте 5'-НТО не приводит к изменению эффективности инициации трансляции в бесклеточной системе синтеза белка. Методом ингибирования удлинения праймера (т.н. «тупринтинг») было подтверждено одинаково эффективное образование 48S инициаторного комплекса на мРНК с 5'-блокированным и исходным лидерах как в присутствии полного набора факторов инициации, так и в отсутствие АТФ-зависимого фактора eIF4F.

Таким образом, наши эксперименты позволяют заключить, что на некэпированной лидерной последовательности РНК вируса табачной мозаики происходит эффективная внутренняя, т.е. не зависимая от свободного 5'-конца, инициация трансляции, в которой не участвует фактор инициации eIF4F. Независимость от eIF4F указывает на возможный механизм АТФ-независимого сканирования 5'-НТО, по типу «бесфазного блуждания» (одномерного диффузионного скольжения) рибосомной частицы вдоль межцистронной нетранслируемой области мРНК у прокариот.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 12-04-01179.

ДОПОЛНЕННАЯ МОДЕЛЬ 50S РИБОСОМНОЙ СУБЧАСТИЦЫ ИЗ *HALOARCULA MARISMORTUI*

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

azat@vega.protres.ru

Чуть более десяти лет тому назад пространственная модель рибосомной 50S субчастицы из археи *Haloarcula marismortui* была определена с разрешением 2.4 Å (Ban *et al*., 2000; Klein *et al*., 2001 and 2004). Эта структура до сих пор остаётся единственной кристаллической структурой архейной рибосомы. К сожалению, данная модель 50S субчастицы содержит несколько существенных пробелов: в ней, практически, полностью отсутствуют структуры функционально важных подвижных боковых выступов. Недавно, мы проинспектировали карту электронной плотности 50S рибосомной субчастицы с разрешением 2.4 Å и нашли участки электронной плотности, которые авторам в своё время не удалось интерпретировать. Используя полученные ранее в нашей лаборатории структурные данные для фрагмента архейного рибосомного белка P0, мы смогли уточнить и дополнить модель архейной 50S субчастицы. В результате проведенного нами уточнения были визуализированы следующие участки пространственной структуры этой 50S субчастицы: две трети рибосомного белка P0; 58 аминокислотных остатков N-концевых доменов двух молекул рибосомного белка P1; участок аминокислотной последовательности 130–156 рибосомного белка L11; полный рибосомный белок LX; 12 пар нуклеотидов спирали 23S рРНК H76, формирующей стебель L1-выступа; последовательность нуклеотидов 2339-2343 23S рРНК, контактирующую с рибосомным белком L5; петли 29-34 и 108-128 рибосомного белка L5.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российского фонда фундаментальных исследований (грант 11-04-00327а).

СТРУКТУРА АССОЦИИРОВАННОГО С РИБОСОМОЙ БЕЛКА SAV1646 ИЗ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* В КРИСТАЛЛЕ И ЕГО ВОЗМОЖНАЯ ФУНКЦИЯ – ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСА С L21 И L27 НА ПУТИ СБОРКИ РИБОСОМЫ

Т. Кларк, В. Романов, Г. Кисселман, Д. Ву-Браун, М. Соловейчик, Т. Чан, Р. Гордон, К. Батали, Ю. Чиргадзе, Э. Паи, Н. Чиргадзе

chir@vega.protres.ru

Структура белка генного продукта *sav1646* из генома патогенного микроорганизма *Staphylococcus aureus* была определена при разрешении 1.7Å. Белок относится к классу “жизненно важных” белков, без которых клетка не может существовать. Среди известных гомологичных последовательностей, все они определяются как “ассоциированные к рибосоме”, мы обнаружили, по крайней мере, тринадцать похожих бактериальных последовательностей. До настоящего времени их структура не описана и функция неизвестна. Белок SAV1646 небольшой, 106 остатков, в кристалле существует в виде димера. Особенностью белка-мономера является заметная асимметрия распределения зарядов на его поверхности. Анализ структуры белка, а также структуры оперона, содержащего ген *sav*1646, позволяет высказать предположение о возможной функции SAV1646. Мы полагаем, что димер этого белка, который, как мы показали, существует также и в растворе, может образовать комплекс с рибосомными белками L21 и L27. Этот комплекс, по-видимому, промежуточный и, в свою очередь, может играть важную роль на последнем этапе сборки 50S субчастицы рибосомы, определяя ее окончательную и правильную структуру.

Работа выполнена в сотрудничестве Института белка РАН с Отделениями биохимии, молекулярной генетики и медицинской биофизики, а также Отделением фармакологии и токсикологии Университета Торонто, Канада.

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПЕРЕХОДЫ АРХЕЙНОГО ФАКТОРА ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ 2

<u>О.С. Никонов</u>, Е.А .Столбоушкина, В. И. Архипова, С.В. Никонов и М.Б. Гарбер.

alik@vega.protres.ru

Фактор инициации трансляции 2 архей (aIF2) в комплексе с ГТФ доставляет метионилированную инициаторную тРНК в Р сайт рибосомы. Принято считать, что после спаривания антикодона тРНКi с инициаторным AUG кодоном мРНК ГТФ гидролизуется, и комплекс aIF2•ГДФ покидает рибосому. Комплексу aIF2•ГТФ соответствует активное «ON» состояние гамма субъединицы фактора, комплексу aIF2•ГДФ – неактивное «OFF» состояние. В эукариотах было выявлено также промежуточное состояние тройственного комплекса, при котором неорганический фосфат после гидролиза остается в комплексе и удаляется из него только после кодон-антикодонового спаривания при обязательном присутствии фактора eIF5. В археях ортолог eIF5 найден не был.

В данной работе представлены три структуры высокого разрешения для комплексов γ субъединицы aIF2 из *Sulfolobus solfataricus* (Sso aIF2) с нуклеотидами: комплекс aIF2γ•GDPCP; комплекс, имитирующий aIF2γ•GDP•Pi (где неорганический фосфат заменён ионом формиата); комплекс aIF2γ•GDP и одна структура высокого разрешения для свободной от нуклеотида aIF2γ. Данные структуры позволяют описать все возможные состояния γ субъединицы aIF2 и изучить конформационные переходы, которые происходят при ее функционировании.

Сравнение аминокислотных последовательностей и структур Sso aIF2 и фактора элонгации EF-Tu показывает, что в нуклеотид-связывающем кармане Sso aIF2 отсутствуют «гидрофобные ворота» (изолейцин в положении 45 заменен метионином), и ничто не мешает боковой группе His97 сместить молекулу воды в положение, необходимое для нуклеофильной атаки. В комплексах архейной aIF2γ с ГТФ, гидролиз ГТФ происходит весьма быстро, что подтверждается наличием ГДФ в нуклеотид-связывающих карманах комплексов, сокристаллизуемых с ГТФ. Однако формиат-ион, присутствующий в кристаллизационном растворе, способен быстро заместить неорганический фосфат в структуре комплекса, что дало нам возможность получить комплекс, имитирующий aIF2γ•GDP•Pi состояние.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ФОРМЫ мРНК И БЕЛКА YB -1

Лябин Д.Н., Доронин А.Н., Елисеева И.А. и Овчинников Л.П.

lyabin@vega.protres.ru

Эукариотический белок YB-1 участвует в самых разнообразных ДНК/РНК-зависимых процессах: репарации ДНК, транскрипции и сплйсинге пре-мРНК, в упаковке мРНК, регуляции её стабильности и трансляции. На клеточном уровне YB-1 принимает участие в пролиферации и дифференцировке клеток, в клеточном ответе на стресс, в злокачественном перерождении клеток. Регуляция синтеза YB-1 чрезвычайно важна для правильной реализации этих клеточных программ. Предпосылками к данной работе послужили два факта. Во-первых, противоречивые данные о длине 5’ нетранслируемой области (5’ НТО) мРНК *YB-1* (от 108 до 350 н.). Длина 5’ НТО может иметь принципиальное значение для регуляции трансляции мРНК *YB-1*. Во-вторых, в клетках были обнаружены формы белка YB-1 различной молекулярной массы. Причиной существования таких форм может быть их синтез с альтернативных стартовых кодонов одной и той же мРНК *YB-1* или трансляция разных молекул мРНК *YB-1*, транскрибированных с альтернативных промоторов гена *YB-1*.

Мы выяснили, что длина 5’ НТО примерно одинакова у мРНК *YB-1* человека, кролика и мыши, и составляет приблизительно 140 нуклеотидов. Эта 5’ НТО не содержит ранее описанных в литературе специфических YB-1-связывающих участков и 5’TOP-подобных последовательностей, что исключает некоторые из предложенных ранее механизмов регуляции трансляции мРНК *YB-1*. Далее мы обнаружили, что в бесклеточной системе трансляции с мРНК *YB-1* возможен синтез дополнительного продукта, имеющего меньшую электрофоретическую подвижность в ДСН-ПААГ, чем основной продукт синтеза. Мы показали, что синтез этого продукта начинается с кодона AUC в положении -60 относительно основного стартового кодона. Кроме того, мы обнаружили альтернативную форму мРНК *YB-1*, которая вместо первого экзона содержит часть первого интрона пре-РНК *YB-1*. Такая мРНК является функционально активной, и продукт ее трансляции, по-видимому, содержит другой N-концевой домен. Таким образом, нами предложены два способа образования альтернативных форм белка YB-1.

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ МИКРОТРУБОЧКИ-ОРГАНИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ АППАРАТА ГОЛЬДЖИ

Надеждина Е.С., Бураков А.В., Фокин А.И.

nadezhdina@vega.protres.ru

Микротрубочки в культуре клеток млекопитающих нередко организуют радиальную сеть, центр которой может быть представлен центросомой и / или аппаратом Гольджи (АГ). Мы решили сравнить микротрубочки-организующую активность АГ в двух линиях культивируемых клеток: Vero и BS-C-1. Обе линии происходят из почки зеленой мартышки и имеют радиальную систему микротрубочек. Обнаружили, что на АГ нуклеируется и с ним связано больше микротрубочек в клетках BS-C-1, чем в клетках Vero. После разборки АГ действием брефелдина или при синтезе доминантно-негативной ГТФазы Sar1A [T39N] в клетках Vero сеть микротрубочек изменялась меньше, чем в клетках BS-C-1. С другой стороны, ингибирование киназы LOSK/SLK, влияющей на активность центросомы, значительно сильнее влияло на расположение микротрубочек в Vero, чем в BS-C-1. Оказалось также, что в клетках BS-C-1 повышено содержание белка CLASP2, хотя не они отличаются от Vero по уровню ряда других микротрубочки-связывающих белков АГ. Однако экспрессия в клетках Vero ДНК-конструкции, кодирующей CLASP2-GFP, не привела к увеличению микротрубочки-организующей активности АГ. Более того, в этих клетках, в отличие от BS-C-1, экзогенный CLASP2-GFP не связывался с АГ, а распределялся по микротрубочкам. Возможно, отличия клеток объясняются различным уровнем активности протеинкиназы GSK-3β, которая участвует в фосфорилировании CLASP2, регулируя его связывание с микротрубочками и с АГ. Действительно, ингибирование активности GSK-3β в клетках BS-C-1 привело к ослаблению способности их АГ организовывать микротрубочки.

Работа поддержана грантами РФФИ 11-04-01022-а и 12-04-33178-мол-а-вед.

РОЛЬ МИКРОТРУБОЧЕК В ОБРАЗОВАНИИ СТРЕССОВЫХ ГРАНУЛ

Е. М. Чудинова, А. А. Шпильман, А. В. Любителев, П. А. Иванов, Е. С. Надеждина

chudiel@mail.ru

Под воздействием различных неблагоприятных факторов в цитоплазме эукариотических клеток возникают стрессовые гранулы (СГ). СГ представляют собой скопления нетранслируемой мРНК и белков, контролирующих функции мРНК. В клетках с искусственно разрушенными микротрубочками СГ образуются медленнее, размер СГ меньше. Чтобы установить роль микротрубочек в образовании СГ, мы проанализировали зависимость образования СГ от концентрации стрессирующего агента (арсенита натрия), времени воздействия стресса, проанализировали образование и перемещение СГ при ингибировании динеин-динактинового комплекса (активного транспорта) и предложили компьютерную модель, описывающую закономерности образования СГ. Модель построена на следующих принципах. В качестве элементарной единицы (ЭЕ) СГ принимался 1 неканонический 48S-комплекс (мРНК, некоторые РНК-связывающие белки и малая субъединица рибосомы), движение ЭЕ подчинялось законам броуновского движения. В модели варьировались коэффициент диффузии, степень адгезивности ЭЕ при столкновении и количество микротрубочек (от 0 до 20 на 6 мкм^3).

На основании модельных и экспериментальных данных можно заключить:

1) существенные различия в образовании СГ в клетках с целыми и разрушенными микротрубочками наблюдаются при низких концентрациях арсенита натрия и при умеренном времени воздействия;

2) ингибирование динеин-динактивного комплекса не оказывает влияния на образование и передвижение СГ.

3) при 100% адгезивности СГ или их ЭЕ в модели микротрубочки не влияют на образование СГ;

4) микротрубочки, скорее всего, служат «направляющими» для одномерной диффузии СГ и их ЭЕ, т.е. играют роль скэффолда, что способствует более эффективному формированию СГ.

Работа поддержана грантом РФФИ 10-04-01107а.

RGS-БЕЛКИ ОБЕСПЕЧИВАЮТ ДВОЙНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ GALPHA-СУБЪЕДИНИЦ ТРИМЕРНЫХ G-БЕЛКОВ

Ч. Лин[1], А. Коваль[1], С. Тищенко[2], А. Габдулхаков[2], У. Тин[2], Г. Солис[1], В. Л. Катанаев[1,2]

[1]*Департамент фармакологии и токсикологии, университет Лозанны, Швейцария*
[2]*Институт белка РАН*

Рецепторы, сопряженные с G-белками (GPCR), обеспечивают передачу внутрь клетки разнообразных внеклеточных сигналов, важных для развития и функционирования многоклеточных организмов. Активность G-белков, стимулируемая GPCR-рецепторами, подавляется белками семейства RGS, которые ускоряют гидролиз ГТФ на alpha-субъединице G-белка. Мы исследовали RGS-белок *Double hit* (Dhit) из дрозофилы и его взаимодействие с alpha-субъединицей тримерного белка Go. В отличие от других RGS-белков, Dhit одинаково эффективно взаимодействует с ГДФ- и ГТФ-связанными формами Gαo, а также с формой Gαo-ГДФ-AlF4, имитирующей гидролиз ГТФ. Кроме типичной для RGS-белков GAP (GTPase-activating protein)-активности, ускоряющей гидролиз ГТФ, Dhit обладает также нетипичной GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor)-активностью, замедляющей взаимодействие Gαo с ГТФ. Мы показали, что такое необычное взаимодействие характерно также для Gαo и Gαi-белков из человека и человеческого гомолога Dhit – RGS19. Мы определили кристаллическую структуру RGS-домена Dhit и предложили молекулярный механизм его GDI-активности, подтверждаемый мутационным анализом. Кроме того, эта необычная для RGS-белков активность подтверждена in vivo – как на модели развития крыла и сенсорных щетинок дрозофилы, так и в культуре человеческих клеток.

Таким образом, наши исследования показывают, что Dhit и его гомологи являются двойными регуляторами, которые способны ингибировать функционирование G-белков как путем ускорения перехода белков в неактивное состояние, так и путем замедления образования активной формы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 11-04-00859а), Swiss National Science Foundation (грант 31003A_138350) и Deutsche Forschungsgemeinschaft (грант KA 2721/2-1).

T5-ПОДОБНЫЕ ФАГИ: ЧТО ДАЕТ СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИХ ГЕНОМОВ

В. Н. Ксензенко, А. И. Крутилина, А. В. Калиман, А. С. Глухов

КАК ОПРЕДЕЛИТЬ ТОЧНОЕ МЕСТО ИНТЕГРАЦИИ ЧУЖЕРОДНОЙ ДНК В КЛЕТОЧНЫЙ ГЕНОМ?

А.А. Гордеев, Е.В. Четверина, А.Б. Четверин

aagordeev@gmail.com

Ранее нами были получены несколько клеточных линий эукариот, стабильно продуцирующих зеленый флуоресцентный белок (GFP). Каждая линия происходила из отдельной клетки популяции эмбриональных человеческих клеток HEK 293, трансформированных GFP-кодирующей плазмидой, не содержащей элементов, которые могли бы обеспечить ее репликацию в данных клетках или интеграцию в геном. В таких условиях стабильная продукция GFP может быть следствием только случайной (не сайт-специфической) интеграции гена GFP в хромосомную ДНК. Полученные линии различались между собой по интенсивности флуоресценции GFP и скорости роста клеток. Эти фенотипические отличия могли быть вызваны разным числом вставок гена GFP или являться следствием разного положения этих вставок в клеточном геноме.

С помощью метода молекулярных колоний установили, что в каждой из исследованных линий ген GFP интегрирован в геном в единственном сайте.

Для определения мест интеграции разработан новый метод. Нам была известна последовательность трансформирующей плазмиды, а также то, что в геном интегрирована большая часть гена GFP – постольку, поскольку клетки флуоресцируют. В отличие от существующих подходов, в данном случае неизвестно, каким сайтом плазмида встроилась в хромосому и какие ее участки были при этом утрачены, а, следовательно, неизвестно, каково расстояние между геном GFP и ближайшими хромосомными последовательностями.

Процедура включает расщепление хромосомной ДНК с помощью эндонуклеазы рестрикции, для которой есть сайт в гене GFP и нет сайтов в остальной части плазмиды; самолигирование полученных фрагментов ДНК с образованием кольцевых структур; размножение колец, включающих участки гена GFP и ближайшие к ним участки хромосомы, с помощью инвертированной ПЦР. Секвенирование ПЦР-продуктов позволяет точно установить обе границы интегрированной последовательности. Таким образом определены точные места интеграции плазмиды в двух клеточных линиях.

НОВЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ СТРУКТУРЫ ДНК И ДНК-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Тимченко А.А[1]., Енин Г.А[1]. Мелехов В.В[2], Сергеев А.В[3], Озолинь О.Н[,4,5]

[1]*Институт белка РАН, г. Пущино,*
[2]*Институт биологического приборостроения РАН г. Пущино,*
[3]*Институт математических проблем биологии РАН, г. Пущино,*
[4]*Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино,*
[5]*Пущинский государственный естественно-научный институт, г. Пущино, Россия*

E-mail: atim@vega.protres.ru

Метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) является современным эффективным методом для изучения структуры объектов на наноуровне. В последнее время АСМ находит широкое применение для исследования биологических объектов: от клеток до макромолекул в условиях, близких к нативным, благодаря простоте подготовки образцов. Обычно капля раствора исследуемого вещества наносится на подложку из слюды или графита, выдерживается некоторое время для абсорбции, подложка промывается водой и высушивается. Однако, в случае сильно отрицательно заряженных молекул типа ДНК их посадка на подложку, которая также заряжена отрицательно, сильно осложнена. К настоящему времени предложена два основных метода для устранения трудностей абсорбции таких молекул: добавление двухвалентных катионов и применение модифицированной слюды. Нами предложен новый подход к увеличению эффективности связывания нуклеиновых кислот с подложкой с использованием электрического поля (~500 В/см). С помощью разработанной нами установки мы исследовали посадку на слюду как протяженных (λ ДНК, 48520 п.о.), так и небольших (ДНК из регуляторной области гена dps, 200-400 п.о.) молекул ДНК. Кроме того, методом АСМ было изучено связывание последних с белком DPS. Проведенные исследования показали эффективность предложенного подхода, и его можно рекомендовать для изучения структуры ДНК и ее комплексов с белками.

СТРУКТУРНО-ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКА YB-1 В РАСТВОРЕ

<u>В. В. Филимонов</u>, С. Г. Гурьянов, А. А. Тимченко, Б. С. Мельник, Л. П. Овчинников, Г. В. Семисотнов

YB-1 является основным белком мРНП, участвующим в регуляции транскрипции и трансляции большого количества эукариотических генов. Детали функционирования YB-1 в последнее время интенсивно изучаются, однако о его структурной организации до сих пор известно очень немного. В данной работе проводилось изучение физико-химических свойств белка в растворе с использованием нескольких методов: кругового дихроизма, спектроскопии ЯМР, сканирующей микрокалориметрии, малоуглового рассеяния рентгена, седиментации и гель-хроматографии. Одним из важных свойств YB-1 является его склонность к образованию олигомеров, агрегатов и амилоидов в зависимости от ионной силы и концентрации белка, при этом даже глубокая олигомеризация легко обратима при изменении состава раствора. Было показано также, что только один из трех функционально-важных фрагментов белка, а именно домен холодового шока (CSD), обладает кооперативной глобулярной структурой как в составе YB-1, так и в изолированном виде. Этот домен составляет всего 20% от полной длины белка, а остальные участки, судя по оптическим и калориметрическим данным, не имеют упорядоченной и кооперативной структуры и преобладающей конформацией в них могут быть короткие участки полипролиновых спиралей. В то время как фрагменты, соответствующие неупорядоченным участкам в изолированном виде, имеют гидродинамические размеры, характерные для развернутых белков, размеры целого белка неожиданно малы и близки к таковым у глобулярных белков с аналогичной массой.

Ввиду того, что стабильность структуры CSD в составе интактного YB-1 заметно выше, чем в составе коротких фрагментов, именно взаимодействия этого домена с другими участками белка могут помогать в его компактизации.

МЕХАНИЗМ АКТИВАЦИИ АМИННЫХ ТРАНСМЕМБРАННЫХ СЕМИСПИРАЛЬНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

А.В. Ефимов и А.Г. Рязанов

E-mail: efimov@protres.ru

Суперсемейство трансмембранных (ТМ) семиспиральных рецепторов, сопряженных с G-белками, включает в себя более 800 белков. Недавние успехи в кристаллографических исследованиях этих белков позволили определить пространственные структуры более 15 рецепторов в различных функциональных состояниях. На основе стереохимического анализа известных пространственных структур рецепторов, а также на основе анализа строения молекул агонистов и антагонистов мы предлагаем механизм активации аминных рецепторов этого суперсемейства.

В соответствии с этим механизмом молекула агониста взаимодействует с рецептором в сайте связывания, расположенном в углублении между ТМ-спиралями 3, 5, 6 и 7, и приобретает максимально вытянутую конформацию, т.е. «натягивается как струна». В результате этого ТМ-спирали 5 и 7 немного сближаются, а «натянутая струна» агониста «давит» на консервативный остаток триптофана 6.48, что приводит к повороту ТМ-спирали 6. Это движение усиливается с помощью излома спирали, который образован остатком пролина 6.50, передается на внутреннюю часть рецептора и открывает центр связывания с G-белком.

Такой механизм накладывает определенные ограничения на структуру агониста. Молекулы агонистов аминных рецепторов имеют, как правило, гидрофобную «головку» (обычно это – одно или два ароматических кольца) и «хвостик» с положительно заряженной аминогруппой. Гидрофобная «головка» должна иметь один-два донора или акцептора Н-связей для связывания с ТМ-спиралью 5, а аминогруппа, как правило, должна иметь алкильные заместители для усиления положительного заряда. Расстояние между донорами/акцепторами на «головке» и аминогруппой на «хвостике» в вытянутой конформации должно быть одинаковым во всех молекулах агонистов. Увеличение этого расстояния, например, за счет удлинения «хвостика» превращает такие молекулы в антагонистов. Удаление доноров/акцепторов с «головки» также превращает молекулу в антагониста.

МАГНИЙ-ЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ ИОННОГО КАНАЛА TRPM7 ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ ПОСРЕДСТВОМ ДВУХ ОТКРЫТЫХ РАМОК СЧИТЫВАНИЯ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В 5'- НЕТРАНСЛИРУЕМОЙ ОБЛАСТИ ЕГО МРНК

И.А. Никонорова, Н.В. Корнаков, К.С. Василенко, С.Е. Дмитриев, А.Г. Рязанов

inna_nikonorova@yahoo.com

TRPM7 –ионный канал, абсолютно необходимый для нормальной жизнедеятельности клетки, основной функцией которого является поддержание магниевого гомеостаза. Ионный канал активируется в ответ на понижение внутриклеточной концентрации магния и ингибируется, когда концентрация свободного магния в клетке восполняется. Во всех клетках и тканях позвоночных животных содержится большое количество мРНК TRPM7, однако количество белка чрезвычайно мало, что подразумевает существование механизма, контролирующего трансляцию TRPM7.

Анализ структуры мРНК TRPM7 показал наличие 2 открытых рамок считывания в 5'-нетранслируемой области, начинающихся с АУГ кодонов (Рис.1). Взаимное расположение открытых рамок считывания эволюционно консервативно у всех позвоночных животных, что говорит о функциональной значимости данной структуры.

Рис.1 Структура 5'НТР мРНК TRPM7. Синим цветом обозначена последовательность, кодирующая TRPM7. Белым и черным цветом обозначены открытые рамки считывания, расположенные в 5'НТО.

Для выяснения функции открытых рамок считывания мы заменили кодирующую часть TRPM7 на последовательность, кодирующую люциферазу и изучили трансляцию полученного конструкта и его многочисленных модификаций в системе трансляции *in vitro*, приготовленной из клеток HEK293. Мы обнаружили, что трансляция кодирующей последовательности активируется понижением магния в системе. Функция первой рамки состоит в ингибировании общего уровня трансляции кодирующей последовательности; в то время как функция второй рамки заключается в смещении магниевого оптимума трансляции кодирующей рамки в область более низких концентраций. Наши данные свидетельствуют о том, что внутриклеточная концентрация магния регулирует не только способность ионного канала TRPM7 пропускать ионы магния, но и трансляцию его мРНК.

ПОЛУЧЕНИЕ БИОСЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ 7ТМ-РЕЦЕПТОРОВ В БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ ТРАНСЛЯЦИИ

В.Р. Котов, Е.Д. Байдарова, В.А. Широков, А.Г. Рязанов

vrk@pils.net

Семиспиральные трансмембранные рецепторы составляют самое большое семейство эукариотических мембранных белков, которые реагируют на широкий спектр лигандов: от ионов и метаболитов до пептидных гормонов и нейромедиаторов, т.о. участвуя в регуляции практически всех физиологических процессов. Несмотря на значительный прогресс в изучении структуры и функционирования отдельных 7ТМ-рецепторов, большинство представителей данного класса белков пока не удалось экспрессировать и исследовать, поэтому принципы функционирования всей совокупности 7ТМ-рецепторов (7ТМ-рецепторома) на организменном уровне во многом остаются неразгаданными. Для решения этой проблемы необходимо разработать метод измерения профиля активации/ингибирования всего 7ТМ-рецепторома при взаимодействии с изучаемыми лигандами. В нашей лаборатории было предложено экспрессировать в бесклеточной системе трансляции конформационные биосенсоры на основе 7ТМ-рецепторов. В основе таких сенсоров лежит измерение внутримолекулярного Фёрстеровского резонансного переноса энергии при изменении относительного положения трансмембранных спиралей рецептора в процессе активации.

В ходе данной работы были оптимизированы условия экспрессии биосенсоров на основе β_2-адренергического и М2-мускаринового 7ТМ-рецепторов в прокариотической бесклеточной системе трансляции в присутствии детергентов с высоким выходом белкового продукта (до 0,4 мг на мл реакционной смеси). Для мускаринового рецептора был подобран детергент, обеспечивающий мономерную конформацию белка по данным гель-фильтрации, а также был успешно применен новый метод экспрессии с котрансляционным встраиванием в формирующиеся молекулы нанодисков. Предварительные данные о вторичной структуре белка, полученные методом кругового дихроизма свидетельствуют в пользу правильного сворачивания белка.