

Аннотация проекта, выполненного в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг.

Государственный контракт № 02.740.11.5014 от 20 июля 2009 г.

Тема: «Структурная протеомика окислительно-восстановительных белков, вовлеченных в регуляцию последствий окислительного стресса»

Исполнитель: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет» (ГОУ «СПбГПУ»)

Ключевые слова: окислительно-восстановительная система клетки, метионин-сульфоксид редуктаза, тиоредоксин, ЯМР-спектметрия, отнесение ямр-сигналов, расчёт пространственной структуры белков, молекулярное моделирование

1. Цель проекта

1.1. Проект направлен на решение фундаментальной задачи изучения механизмов поддержания окислительно-восстановительного гомеостаза клеток млекопитающих, который играет важную роль в обеспечении жизнеспособности клеток, а также участвует в регуляции процессов, связанных со старением. Второй аспект проекта связан с обеспечением развития устойчивого и эффективного взаимодействия с российскими учеными, работающими за рубежом, закреплением их в российской науке и образовании, использованием их опыта, навыков и знаний для развития отечественной системы науки, образования и высоких технологий.

1.2. Реализованный проект посвящён изучению белков метионин-сульфоксид редуктаза B (MsrB) и тиоредоксин (Trx) окислительно-восстановительной системы млекопитающих, участвующих в устранении последствий окислительного стресса в клетках. В проекте был решен широкий спектр задач, начиная с клонирования генов белков MsrB и Trx и заканчивая не только решением пространственной структуры каждого из них, но и установлением пространственной структуры активного непродуктивного комплекса, возникающего в результате взаимодействия их мутантных форм. В итоге были сформулированы основы механизма окислительно-восстановительной реакции катализируемой в комплексе двух изучаемых белков. Работы проводились под непосредственным руководством профессора, доктора химических наук А.И. Дикого из Норвежского университета науки и технологии.

2. Основные результаты проекта

2.1. и 2.2. В ходе выполнения задач проекта был проведён ряд последовательных мероприятий, позволивших решить пространственную структуру комплекса мутантных форм белков MsrB1 и Trx мыши, определить термодинамические параметры комплекса, а также выявить основы механизма восстановления белка MsrB1 тиоредоксином. Основные результаты можно кратко сформулировать следующим образом

Был отработан полный цикл биохимических манипуляций по экспрессии, выделению и очистке структурированных белков MsrB1, 2, 3 и Trx мыши. этих белков. В результате оптимизации процесса экспрессии в клетках *E.coli* выход рекомбинантных белков составил: MsrB1 – 25 мг/л, Trx – 20 мг/л. Методом изотермальной титрирующей калориметрии определены такие термодинамические параметры взаимодействия MsrB1 и Trx, как стехиометрия образования комплекса N=1, энтальпия образования комплекса $\Delta H = -2,1 \pm 0,4$ ккал моль⁻¹, энтропия образования комплекса $\Delta S = + 18,5$ (кал моль⁻¹ K⁻¹) и константа образования комплекса $K_a = 3.1 \pm 0,5 \cdot 10^6$ М.

Выделены обогащённые по ¹⁵N и ¹³C изотопам мутантные формы белков Sec95Cys MsrB1 и Cys35Ser Trx, для которых получен ряд двумерных (¹⁵N-HSQC, ¹³C-HSQC, ¹⁵N-NOESY-HSQC) и трёхмерных (¹⁵N,¹³C-NHCA, ¹⁵N,¹³C-CBCANH, ¹⁵N,¹³C-CBCA(CO)NH, ¹⁵N-NBHNH, ¹⁵N,¹³C-NBHA(CO)NH, HCCN-TOCSY) гетероядерных ЯМР спектров. По результатам анализа полученных спектров выполнено отнесение 95% и 92% сигналов ¹H, ¹³C и ¹⁵N мутантных форм белков MsrB1 Sec95Cys и Trx Cys35Ser соответственно, для каждого из которых найдено 1334 и 1983 ограничения на величины межпротонных расстояний и 176 и 235 ог-

раничений на величины торсионных углов, соответственно. На основании рассчитанных ограничений были определены пространственные структуры мутантных форм белков MsrB1 и Trx.

Далее при двух значениях pH, равных 5,5 и 6,5, было проведено по две процедуры титрования каждого из изучаемых белков его партнёром по взаимодействию. Регистрация формирования комплекса осуществлялась с помощью ^1H - ^{15}N HSQC ЯМР-спектроскопии. Для обоих белков по изменению химических сдвигов ^1H - ^{15}N HSQC спектров определены аминокислотные остатки, принимающие участие в формировании комплекса. В белке MsrB1 это – Cys4-Val11, Trp43, Asp53, Lys57, Glu65, His80-Asn84, Arg91-Phe97; в белке Trx – Phe3-Ala12, Asp26-Ser35, Val57-Glu68, Lys72-Thr74.

По результатам *in silico* эксперимента была получена окисленная форма белка MsrB1 окислительно-восстановительной системы мыши и проанализированы его динамические характеристики. Было установлено, что сближение в пространстве N-конца белка с активным центром, за счёт большой подвижности и гибкости N-конца и может модулироваться гидрофобными взаимодействиями. Такой механизм окисления является отличительной чертой белка MsrB1 мыши в ряду белков MsrB из других организмов.

In silico методами белкового докинга и молекулярной динамики на основании экспериментальных данных о принадлежности определённых аминокислотных остатков белков к интерфейсу их взаимодействия, а также с использованием пространственной структуры окисленной формы белка MsrB1 Sec95Cys, был обнаружен его стабильный комплекс с Trx Cys35Ser. Молекулярная поверхность MsrB1 может адаптироваться к Trx за счёт гибкости двух петель, находящихся вблизи от активного центра. Оказалось, что образованию белкового комплекса способствует формирование межбелкового β -листа (см. рисунок 1).

В итоге были установлены роли каталитических остатков двух белков и сформулированы основы механизма катализа окислительно-восстановительной реакции, осуществляемой при их взаимодействии. Стабилизация комплекса посредством образования межбелкового β -листа приводит к возникновению напряжённости в структуре дисульфидной связи белка MsrB1, что, понижает энергетический барьер её разрыва при нуклеофильной атаке остатком Cys32 тиоредоксина атомов серы каталитического (Cys95) или расщепляющего (Cys4) остатков MsrB1. Далее восстановление MsrB1 тиоредоксином протекает через образование межбелковой дисульфидной связи, которая в свою очередь разрывается каталитическим остатком Cys35 Trx, в результате чего образуется внутримолекулярная дисульфидная связь Cys32-Cys35 в белке Trx. В результате такого каталитического акта MsrB1 переходит в восстановленную, а Trx – в окисленную форму.

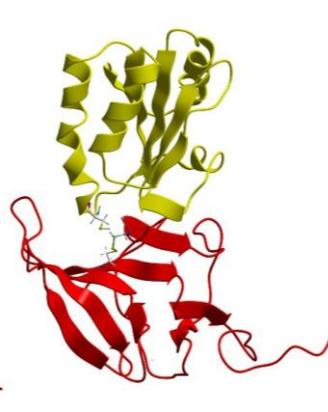


Рисунок 1 – Пространственная структура комплекса белков мыши MsrB1 (красный) и Trx (жёлтый).

2.3. По результатам проекта впервые были получены термодинамические характеристики комплексообразования белков MsrB1 и Trx мыши, установлены пространственные структуры их мутантных форм, найдена пространственная структура активного непродуктивного комплекса этих белков, а также сформулированы основы механизма катализа окислительно-восстановительной реакции, осуществляемой при взаимодействии изучаемых белков.

2.4. Изучением метионин-сульфоксид редуктаз млекопитающих занимаются группы исследователей под руководством следующих учёных: Alexander Dikiy (Norwegian University of

Science and Technology, Norway), Vadim N. Gladyshev (University of Nebraska, USA), Jakob Moskovitz (University of Kansas, USA), Hwa-Young Kim (Yeungnam University College of Medicine, Korea), Frédérique Favier (Universite' Henri Poincare', France), Herbert Weissbach (Florida Atlantic University, USA). Данный проект был посвящён изучению комплексообразования белков MsrB1 и Trx мышцы и механизмам действия этих белков. Проблематика проекта актуальна в научном мире, работы по проекту выполнены на высоком уровне, не уступающем уровню исследований, проводимых перечисленными выше зарубежными учёными и их лабораториями.

3. Назначение и область применения результатов проекта

3.1. Результаты НИР могут быть использованы в физико-химической молекулярной и клеточной биологии, биохимии, структурной биологии, медицине, фармакологии

3.2. и 3.6 Использование результатов НИР возможно следующим образом:

а) Использование белка Trx (тиоредоксина) в гибридных белках, для получения антимикробных пептидов, которые могут найти применение в фармакологии. Например, один из гибридных пептидов на основе ареницина, защищен патентами **РФ №RU 2316590 C1 и № RU 2316595 C1**. Указанный пептид аналогичен пептиду, выделенному из кольчатого червя *Arenicola marina*, и может найти применение в медицинской и ветеринарной практике в качестве антибиотика широкого спектра действия и позволит расширить арсенал антимикробных препаратов широкого спектра действия. Использование подобного подхода позволит сделать производство ареницина более высокотехнологичным.

б) Нам видится перспективным построение системы поиска химических соединений, модулирующих активность системы окислительно-восстановительного равновесия млекопитающих на основе моделей взаимодействия между белками (каталазы, супероксид дисмутаза, пероксидаза, тиоредоксин, глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы, хинон-оксидоредуктазы и т. д.) и низкомолекулярными лигандами. Описанные в литературе компьютерные системы используют детали взаимодействия белков и лигандов, основанные на термодинамических данных для предсказания аффинности взаимодействия. Эти результаты могут быть использованы в фармакологии.

3.3. В случае реализации системы поиска лигандов, сократится время разработки новых лекарственных средств. Использование новых лекарственных средств, сконструированных на основе рационального поиска, приведет к их селективному применению и снижению риска появления осложнений при применении препарата.

3.4. Поиск соединений повышающих активность белков семейства MsrB и их применение в лечебной практике и профилактике приведет к понижению уровня необратимо окисленных форм тиолов в клетках человека, уровень которых скорректирован с возрастом, что может привести к повышению продолжительности жизни.

3.5. Коммерциализация проектом не предусмотрена

4. Достижения молодых исследователей – участников Проекта

В ходе выполнения НИР было использовано большое количество методик из разных областей научного знания, включая: биохимию и молекулярную биологию, ЯМР-спектроскопию и расшифровку ЯМР-данных, компьютерные методы и молекулярное моделирование. Поэтому молодые исследователи, принимавшие участие в работе, были разбиты на группы по научным интересам, каждая из которых занималась выполнением сформулированных задач, в определённой области знаний.

Первая группа, занимавшаяся задачами, связанными с клонированием генных конструкций белков MsrB и Trx, наращиванием их в клетках *E.coli*, оптимизацией выхода белков, обогащением их изотопами ¹⁵N и ¹³C, окислением белка MsrB1, включала в себя следующих молодых исследователей: Д. Б. Червякова, к.б.н., н.с., К. В. Соловьев, к.б.н., н.с., А. Е. Шмидт, бакалавр, студент, К. О. Золотухин, бакалавр, студент, А.С. Борисова, бакалавр, студент.

Вторая группа молодых исследователей работала над получением гомоядерных и гетероядерных двумерных и трёхмерных ЯМР-спектров исследуемых белков, занималась анализом и расшифровкой собранных экспериментальных результатов, решала задачи, связанные с

установлением пространственной структуры белков. В эту группу вошли: Г. Н. Рычков, к.ф.-м.н., доцент, А. А. Сидорова, к.х.н., н.с., А. П. Якимов, магистр, м.н.с., Д. В. Ярошенко, бакалавр, студент,

Задачи третьей группы заключались в создании молекулярной модели белкового комплекса MsrB1 и Tgх вычислительными методами, определении механизмов комплексообразования и выявлении ключевых стадий каталитической реакции восстановления белка MsrB1 тиоредоксином. Эти задачи были решены следующими молодыми специалистами: Г. Н. Рычков, к.ф.-м.н., доцент, Н. И. Поваров, магистр, аспирант, А.П. Якимов магистр, м.н.с., К. О. Золотухин, бакалавр, студент

При этом каждая из групп не только работала по своей специализации, но и имела чёткие представления о работе других групп, и о взаимосвязи каждого из экспериментов между собой. Ход выполнения работ и их корректировка проводились непосредственно профессором, д.х.н. А.И. Диким, и опытными научными сотрудниками старше 35 лет, принявшими активное участие в работе.

Работы проводились на современном научном оборудовании на базе кафедры биофизики и НОЦ «Нанобиотехнологии» СПбГПУ. Финансирование проекта по государственному контракту позволило обеспечить работу необходимыми химическими реактивами. Результаты НИР соответствуют мировому уровню, в области исследования молекулярных механизмов окислительно-восстановительных реакций в клетках млекопитающих. Полученные результаты позволят применить накопленные знания для исследования механизмов действия второго члена семейства метионин-сульфоксид редуктаз млекопитающих, и сделать суммарные выводы о роли этих ферментов в обеспечении поддержания окислительно-восстановительного гомеостаза клеток млекопитающих.

5. Опыт закрепления молодых исследователей – участников Проекта в области науки, образования и высоких технологий

В ходе выполнения проекта в сфере науки, образования и высоких технологий было закреплено шесть молодых исследователей, а именно:

ФИО	Место закрепления	Должность
Борисова Анна Сергеевна	Лаборатория энзимологии Отделения молекулярной и радиационной биофизики, Петербургский институт ядерной физики РАН	Аспирант
Поваров Никита Игоревич	Кафедра экспериментальной физики физико-механического факультета СПбГПУ	Аспирант
Червякова Дарья Борисовна	Лаборатория кафедры биофизики физико-механического факультета СПбГПУ	Научный сотрудник
Шмидт Александр Евгеньевич	Лаборатории биофизики макромолекул Отделения молекулярной и радиационной биофизики, Петербургский институт ядерной физики РАН	Старший лаборант-исследователь
Якимов Александр Павлович	Лаборатория кафедры биофизики физико-механического факультета СПбГПУ	Младший научный сотрудник
Ярошенко Дмитрий Вадимович	ООО Центр коллективного пользования «Аналитическая спектрометрия»,	Инженер-исследователь

В ходе закрепления молодых исследователей проблем не возникло. В указанных учреждениях были предоставлены ставки для молодых сотрудников. Необходимо отметить, что стимулирование закрепления молодых исследователей должно происходить не только за счёт привлечения их к интересной и актуальной научной тематике, но и за счёт стабильного материального стимулирования, что не обеспечивается величиной ставки оплаты труда в сфере науки и образования.

6. Перспективы развития исследований

6.1. По результатам участия в ФЦП было налажено стойкое сотрудничество между кафедрой биофизики, а также НОЦ «Нанобиотехнологии» СПбГПУ и кафедрой биотехнологии, факультета естественных наук и технологий Норвежского университета науки и технологии, (Тронхейм, Норвегия). В рамках программы студент шестого курса А.Е. Шмидт и научный сотрудник НОЦ «Нанобиотехнологии» К.Б. Нериновский были командированы в указанную лабораторию, где перенимали опыт клонирования, очистки и обогащения изотопами белков MsrB и Trx млекопитающих. Во время пребывания в России профессор А.И. Дикий активно делился своими знаниями в области ЯМР-спектromетрии, и расшифровке ЯМР спектров со студентами, аспирантами и научными сотрудниками (участниками проекта), а также продемонстрировал зарубежные стандарты ведения научной работы.

В проектах по 7-ой рамочной Программе Евросоюза НОЦ не участвует.

6.2. По данной научной тематике исследовательский коллектив впервые начал работу в 2009 году в рамках ФЦП. Благодаря хорошо скоординированным действиям, высокой научной квалификации, и грамотно спланированным мероприятиям, коллективу под руководством приглашенного зарубежного исследователя профессора А.И. Дикого удалось выполнить запланированную в техническом задании работу в полном объеме и в установленные сроки.

7. Вклад приглашенного руководителя в проект

В ходе выполнения НИР, благодаря усилиям профессора А.И. Дикого, было налажено устойчивое взаимодействие между коллективами Санкт-Петербургского государственного политехнического университета (Россия) и Норвежского университета науки и технологии (Тронхейм, Норвегия), которое, в частности, проявилось в передаче практического опыта по изотопному обогащению белков в Норвежской лаборатории А.И. Дикого (командировка двух сотрудников Политехнического Университета в 2009г.), а так же в совместном обсуждении результатов работы и оформлении статей и докладов выступлений. Кроме того, были предприняты попытки установления научного контакта с группой американских исследователей (В.Н. Гладышев, Гарвардская медицинская школа, Бостон, США). А.И. Дикий участвовал в планировании и проведении экспериментов по оптимизации уровня экспрессии белков, регистрации 3D гетероядерных ЯМР экспериментов и ЯМР титрованию. Обогастил российский коллектив новыми знаниями в области отнесения сигналов в 3D гетероядерных ЯМР спектрах и определении трехмерных структур белков. Кроме того, он показал пример эффективного и рационального планирования не только отдельного эксперимента, но и проекта в целом, в результате чего запланированные работы по НИР были выполнены в срок. Семинары проведенные А.И. Диким позволили более детально и глубоко разобраться в значении активных форм кислорода и азота в клетках, их влиянии на функционирование различных органелл клетки и белков, осуществляющих модуляцию окислительно-восстановительного гомеостаза, были выявленные новые особенности в каталитическом механизме восстановления метионин-сульфоксида метионин-сульфоксид редуктазой B1 и восстановления метионин-сульфоксид редуктазы B1 тиоредоксином. Все выше перечисленное, глубокое понимание проблемы, тщательное планирование эксперимента, постоянное обсуждение деталей эксперимента и результатов имело существенное значение для достижения цели исследования.

№	Название семинара	Дата и место проведения	Количество участников семинара					Краткое описание связи содержания семинара с сутью проекта
			студентов	Аспирантов и соискателей	КН	ДН	НС и преподавателей	
1	«Оптимизация уровня экспрессии белка MsrB млекопитающих в клетках <i>Escherichia coli</i> »	19 ноября 2009	8	3	13	3	5	На семинаре обсуждались проблемы, связанные с клониро-

								ванием генов MsrB, наращиванием и очисткой белка, кодируемого этими генами. Семинар был построен на результатах работы первого этапа проекта
2	«Механизмы катализа восстановления MsrB тиоредоксином»	9 июля 2010	3	3	7	2	2	На семинаре обсуждались структурные особенности белков MsrB из разных организмов, а также механизмы их восстановления тиоредоксином. В содержание семинара вошли данные, полученные на втором и третьем этапе проекта.

8. Охраноспособные результаты интеллектуальной деятельности (РИД), полученные в рамках исследования, разработки

Охраняемые результаты интеллектуальной деятельности в ходе выполнения проекта созданы не были.

9. Список публикаций в рамках проекта

№	Ф.И.О. участника проекта	Наименование публикации на русском языке	Наименование публикации на языке оригинала (для иностранных публикаций)	Реквизиты издания, опубликованной работы	Статус журнала (список ВАК, другой)	Краткое описание связи содержания публикации с результатами проекта
1	Рычков Г.Н., Поваров Н.И., Якимов А.П., Шабалин К.А.	Окисление белка метионин-сульфоксид редуктаза В1 мышцы приводит к снижению его конформационной подвижности		Журнал «Научно-технические ведомости СПбГПУ» Свидетельство Госкомпечати РФ № 013165 от 23.12.94	Список ВАК, решение Президиума ВАК 6/6 от 19.02.2010	Статья содержит результаты проекта, относящиеся к структуре и динамическим характеристикам белка MsrB1 мышцы в восстановленной и окисленной формах.

2	Рычков Г.Н., Золотухин К.О., Нериновский К.Б., Дикий А.И.	<i>In silico</i> модель пространст- венной струк- туры комплек- са белков MsrB1 и Trx окислительно- восстанови- тельной систе- мы мышцы		—"—	—"—	В статье опи- саны резуль- таты проекта, относящиеся к решению пространст- венной структуры комплекса белков MsrB1 и Trx млекопи- тающих, об- суждается процесс ком- плексообраз- ования и механизм каталитиче- ской реакции окисления- восстановле- ния
---	--	--	--	-----	-----	--

10. Диссертации, представленные к защите в рамках проекта

№	Ф.И.О . участ- ника про- екта	Наименование диссертации	Вид диссер- тации (канди- датская; доктор- ская)	Наиме- нование и шифр научной специ- альности	Номер диссер- тацион- ного совета	Дата защиты диссер- тации (факти- ческая или плано- вая да- та)	Краткое опи- сание связи содержания диссертации с результатами проекта
1	Чер- вя- кова Д.Б.	Характерные особенности химерных бел- ков RecAX21 и RecAX53 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / <i>Esc herichia coli</i>), обладающих повышенной рекомбино- генностью	Канди- датская	Молеку- лярная биология 03.00.03	Д.002.2 30.01 при Ин- ституте цитоло- гии РАН	20 ноября 2009	Полученные при подготов- ке кандидат- ской диссерта- ции навыки работы по клонированию генетических конструкций, очистке белков и проверке их биологической активности

							были успешно применены в проекте при работе с белками MsrB и Trx млекопитающих.
--	--	--	--	--	--	--	---

11. Выступления на конференциях

№	Ф.И.О. участника проекта	Наименование доклада на русском языке	Наименование доклада на языке оригинала (для международных конференций)	Название конференции, дата и место проведения	Краткое описание связи содержания доклада с результатами проекта
1	Якимов А.П.	Изучение пространственной структуры белков MsrB1 и Trx млекопитающих методами ЯМР-спектроскопии		Политехнический симпозиум «Молодые учёные промышленности северо-западного региона», 20 мая 2010 года, Санкт-Петербург	Доклад сделан по материалам научно-исследовательской работы, выполненной в рамках проекта
2	Рычков Г.Н.	Модель пространственной структуры комплекса белков MsrB1 и Trx окислительно-восстановительной системы млекопитающих.		Политехнический симпозиум «Молодые учёные промышленности северо-западного региона», 20 мая 2010 года, Санкт-Петербург	—"
3	Рычков Г.Н.	Вычислительная модель комплекса белков MsrB1 и Trx окислительно-восстановительной системы млекопитающих.	Computational model of mammalian redox system proteins MsrB1 and Trx in complex	"Nuclear Magnetic Resonance in Condensed Matter" 7th Meeting "NMR in Heterogeneous Systems", June 28 - July 2, 2010, Saint-Petersburg, Russia	—"

Выступление А.П. Якимова было отмечено первой премией и почётной грамотой на Политехническом симпозиуме.

12. Внедрение результатов проекта в образовательный процесс

№	Наименование образовательной программы	Тип программы	Уровень	Статус программы	Программа разработана в соответствии со стандартом	Уровень целевой группы	Потенциальные заказчики (география слушателей)	Планируемое количество слушателей (в год)
1	«Современные методы биофизики. ЯМР спектроскопия белков»	Основная образовательная программа	Магистратура	Доработка имеющейся аналогичной программы	Собственные стандарты ВУЗа	Студенты 6 курса	РФ, СНГ	15

Заместитель руководителя работ по проекту
Доцент каф. биофизики
физико-механического факультета СПбГПУ

_____ Г.Н.Рычков

_____ 20__ г.
М.П.