

АННОТИРОВАННЫЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ОТЧЕТ
О РЕЗУЛЬТАТАХ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ РАБОТ, ВЫПОЛНЕННЫХ
НА ЭТАПЕ № 1

«Теоретические исследования и подготовительные работы»

Соглашение № 14.В37.21.1230 от 17.09.2012.

Тема: «Роль доменов и междоменных линкеров в регуляции филаментов актина белками семейства виллина»

Исполнитель: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет» (ФГБОУ ВПО «СПбГПУ»)

Ключевые слова: Цитоскелет, виллин, супервиллин, F-актин, ЯМР

1. Цель проекта

1.1. Формулировка задачи / проблемы, на решение которой направлен реализованный проект.

Общей целью данной работы является изучение структурно-динамических и функциональных свойств модулярных белков системы регуляции цитоскелета. В заявке предлагается исследовать недостаточно изученные элементы механизма взаимодействия свёрнутых доменов и неструктурированных междоменных линкеров при регуляции актиновых филаментов (F-актин) модулярными белками семейства виллина. Данные процессы имеют фундаментальный характер и могут играть важную роль при заражении человека и сельскохозяйственных животных патогенными бактериями *Shigella flexneri*, одним из самых распространённых в России и СНГ возбудителей дизентерии.

1.2. Формулировка цели реализованного проекта, места и роли результатов проекта в решении задачи / проблемы, сформулированной в п. 1.1.

Молекулярные причины функциональных различий между регуляторными белками-гомологами виллин и супервиллин изучены и поняты недостаточно. Предлагаемая работа направлена на сравнительное изучение третичной структуры, динамики остова и функциональных свойств С-концевых фрагментов виллина и супервиллина с целью решения задачи характеристики и более глубокого понимания молекулярных механизмов действия данных биологических молекул. Для исследования выбраны гомологичные С-концевые фрагменты виллина (V6-HP) и супервиллина (SV6-SVHP), которые присутствуют только в этих белках, в то время как отдельные части этих последовательностей (близкие аналоги доменов V6 и HP) широко представлены и в других родственных белках (гельзолин, дематин и пр).

2. Основные результаты проекта

2.1. Краткое описание основных полученных результатов (основные теоретические и экспериментальные результаты, фактические данные, обнаруженные взаимосвязи и закономерности, характеристикисозданной научной продукции)/ Указание основных характеристик созданной научной продукции (при наличии научной продукции).

— Был проведён аналитический обзор информационных источников, описывающих современные данные по структуре и функциональным возможностям гомологичных белков виллина и супервиллина. Было определено, что супервиллин, как и виллин, обладает способностью связывать филаменты актина в пучки. При этом, супервиллин использует для взаимодействия с F-актином не имеющую гомологий N-концевую часть своей последовательности, а не С-конец,

гомологичный виллину. Молекулярные причины функциональных различий между С-концевыми фрагментами регуляторных белков-гомологов виллин и супервиллин на настоящий момент поняты недостаточно в силу отсутствия данных по структурно-динамическим свойствам соответствующего модулярного фрагмента супервиллина (SV6-SVHP). Кроме того, фрагмент V6L40 (домен V6 и линкер из 40-ка остатков) виллина предположительно может представлять сайт связывания F-актина неизвестного ранее типа (свёрнутый домен + развёрнутый полипептид).

- Был проведён биоинформатический анализ С-концевых частей аминокислотных последовательностей виллина и супервиллина. Анализ показал, что свойства линкерной последовательности (~40 остатков), соединяющей гельзолиновое ядро и HP домен в этих двух белках вероятно имеет различные структурно-функциональные свойства. Линкерная последовательность в виллине имеет относительно высокую вариабельность между различными организмами, в то время как в супервиллине данный участок последовательности абсолютно консервативен. Кроме того, ароматические остатки в линкере супервиллина сконцентрированы на N-конце линкера, в противоположность линкеру виллина, где такие остатки расположены более равномерно. Данное наблюдение позволяет предположить, что N-конец линкера является частью домена 6 супервиллина (SV6), а развёрнутая часть линкера соответственно короче в супервиллине, чем в виллине.
- Были получены лабораторные образцы плазмид, для наработки белковых фрагментов V6L40 виллина и SV6-SVHP супервиллина в стандартных экспрессионных системах *Escherichia coli*. Изучение структурно-динамических и функциональных свойств данных фрагментов виллина и супервиллина позволят добиться понимания на молекулярном уровне причин различия их регуляторных свойств.
- Были получены образцы бактериальных штаммов-продуцентов фрагмента V6L40 и были подобраны оптимальные условия для экспрессии данного белка полностью удовлетворяющие заявленным требованиям: выход белка из 1 литра культуры превышает 10 мг. Данный уровень выхода образца достаточен для тестирования способности V6L40 связывать F-актин.
- Разработана методика очистки рекомбинантного белка V6L40, обеспечивающая чистоту образца 95%, что удовлетворяет заявленным требованиям и достаточно для тестирования способности V6L40 связывать F-актин.
- Разработана методика экспрессии и очистки фрагмента виллина V6 в растворе свободном от ионов кальция и получены значительные предварительные ЯМР данные по третичной структуре домена в растворе, свободном от ионов кальция. Для записи этих данных использовался образец V6, обогащённый изотопами ¹⁵N. Собранные ЯМР данные позволяют заключить, что фрагмент V6 в растворе, свободном от ионов кальция, обладает стабильной структурой, отличной от структуры белка при наличии кальция. Эти данные и заключение легли в основу статьи, отправленной на рецензию с целью последующей публикации.

2.2. Описание новизны научных результатов.

Изучение структурно-динамических и функциональных свойства модулярного С-концевого фрагмента супервиллина SV6-SVHP, объединяющего домен SV6 гельзолинового ядра и SVHP домен, будет производиться впервые. Комплексное изучение нового образца фрагмента супервиллина в контексте сравнения его ключевых свойств с таковыми у гомологичных фрагментов виллина позволит получить недоступные ранее данные, проливающие свет на молекулярные механизмы регуляции цитоскелета этим важным классом белков-регуляторов.

Новизна выбранной нами стратегии заключается в применении комплексного подхода для достижения поставленной цели. Нами будет применен не только набор стандартных биохимических методов, используемых для исследования молекулярных механизмов взаимодействия белков, но и получающий все более широкое распространение биоинформатический анализ белковых последовательностей, а также новейшие методы высокоразрешающей спектроскопии ЯМР, с помощью которых будут определены структурно-динамические и функциональные свойства целевых белковых образцов. Описанный комплексный подход является чрезвычайно перспективным, так как он дает возможность получить разносторонние и полные данные по структурной биологии белков регуляции цитоскелета.

2.3. Сопоставление с результатами аналогичных работ мирового уровня.

Изучение механизмов действия белков-регуляторов цитоскелета составляет активное направление современных исследований в силу медицинской значимости данных молекул. В базе данных научных публикаций PUBMED на настоящий момент имеется более 900 статей посвященных белку виллину и около 30 публикаций по супервиллину. Молекулы супервиллина, взаимодействующие более чем с сотней белков-партнёров, обладают способностью значительно увеличивать скорость проникновения опухолевых клеток в здоровые ткани, что делает изучение данного белка весьма актуальным. Одной из главных причин относительно низкого количества публикаций по супервиллину является его большой размер (~1800 остатков), разнообразие структурно-динамических элементов и, соответственно, сложность в выработке экспериментальных подходов. Лаборатория иностранного участника данного проекта внесла значительный вклад в изучение структурно-динамических свойств виллина и супервиллина и разработала ряда эффективных подходов для изучения данных белков-гомологов. Работы по описываемому проекту развивают данное направление и позволят получить новые сведения о виллине и супервиллине, которые будут иметь широкое фундаментальное значение и важность для будущих прикладных исследований.

Таким образом, финансирование описываемого проекта позволяет организовать современные научные работы в Российской Федерации, результаты которых будут определять мировой уровень в данном направлении исследований.

3. Назначение и область применения результатов проекта

3.1. Описание областей применения полученных результатов (области науки и техники; отрасли промышленности и социальной сферы, в которых могут или уже используются полученные результаты или созданная на их основе инновационная продукция).

а) в науке и производстве - будут получены новые данные, важные для понимания молекулярных механизмов действия белков-регуляторов цитоскелета виллина и супервиллина. Полученные данные будут иметь широкое фундаментальное значение в силу наличия широкой гомологии между данными белками и другими регуляторами цитоскелета. Поскольку белок виллин является необходимым агентом для возникновения и развития некоторых распространённых форм шигелёза, а супервиллин обладает способностью ускорять динамику роста опухолей, данная работа будет способствовать созданию задела для разработки новых антибактериальных и антираковых препаратов.

б) образовательном процессе - в работе будут задействованы молодые ученые, аспиранты и студенты ФГБОУ ВПО «СПбГПУ», которые получают знания и ценный практический опыт по применению современных методов спектроскопии Ядерного Магнитного Резонанса высокого разрешения, биохимии, и других новейших подходов к исследованию живых систем. По результатам проекта будет дополнен курс лабораторных работ для студентов ФГБОУ ВПО «СПбГПУ», физико-механический факультет, кафедра биофизики.

4. Перспективы развития исследований.

Краткая информация о перспективах развития выполненного в ходе выполнения проекта исследования.

1) *Информация о том, насколько участие в ФЦП способствовало формированию новых исследовательских партнерств. Участвует ли научный коллектив в проектах по 7-й рамочной Программе Евросоюза (с указанием названия проектов и перечня партнеров по ним).*

Участие в ФЦП в течение 2009-2012 гг. способствовало формированию новых исследовательских партнерств со следующими зарубежными научными коллективами

- Rutgers University, New Jersey (USA) в рамках текущего проекта
- Western Washington University, Washington State (USA) (Минобрнаука Соглашение № 14.В37.21.1230)
- CNRS-Université Paul-Sabathier, Toulouse, France (Минобрнаука ГК № 02.740.11.5223 и № 11.519.11.2002) и РФФИ 11-04-91085-НЦНИ_г
- New University of Lisbon Portugal (Минобрнаука ГК 02.740.11.5182 от 12.03.10)
- University of Uppsala Sweden Минобрнаука ГК 02.513.12.3089 от 01.10.2009)

По результатам сотрудничества с вышеупомянутыми коллективами подана заявка на грант Сколково в 2013 году, с участием шести зарубежных научных коллективов из Франции, США и Великобритании. Планируется подача заявки с теми же коллективами в рамочную Программу Евросоюза в 2013 году.

2) *Краткая информация о проектах научного коллектива по аналогичной тематике.*

- Проект «Роль доменов и междоменных линкеров в регуляции филаментов актина белками семейства виллина» (Минобрнаука Соглашение № 14.В37.21.1230)

- Проект «Исследование динамики конформационных изменений ДНК вызванных факторами структурной перестройки хроматина методами оптической ловушки («лазерный пинцет») и молекулярного моделирования» (Минобрнаука ГК № 02.740.11.5223)

- Проект «Исследование АТФ – зависимой динамики олигомеризации белков семейства ТР49 на индивидуальных молекулах ДНК» (Минобрнаука ГК № 11.519.11.2002).

- Проект «Исследования на одномолекулярном уровне свойств ДНК-субстрата при связывании с белками ТР49» (Грант РФФИ №12-04-32060)

- Проект «Исследование структур, формируемых белком FtsZ, в клетках *Mycoplasma hominis* методом локализационной микроскопии» (Грант РФФИ №12-04-31536)

- Проект «Изучение механизмов образования и взаимодействия внутри- и внеклеточных пулов ключевых NAD-метаболитов» (Грант РФФИ №12-04-31194)

3) *Информация о том, сотрудничество с какими странами и исследовательскими центрами может способствовать наибольшей отдаче для развития в России технологий в области исследования, а также для выхода российской продукции на региональные и глобальные рынки.*

Наиболее предпочтительным является сотрудничество с наиболее развитыми западными странами и их исследовательскими центрами.

5. Опыт закрепления молодых исследователей – участников проекта (этапа проекта) в области науки, образования и высоких технологий.

Закреплены следующие специалисты:

1. Ведяйкин Алексей Дмитриевич, 20.02.1990 года рождения, принят на работу на должность инженера ФГБОУ ВПО «СПбГПУ»;

2. Сабанцев Антон Владимирович, 16.10.1990 года рождения, принят на работу на должность инженера 1 категории ФГБОУ ВПО «СПбГПУ»;

3. Якимов Александр Павлович, 22.12.1984 года рождения, принят на работу на должность инженера 1 категории ФГБОУ ВПО «СПбГПУ».

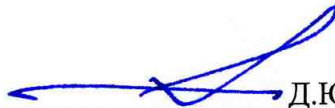
6. Вклад приглашенного руководителя в проект (этап проекта)

Допустимо вместо программы и материалов семинаров предоставлять аннотации о семинаре в объеме до 1 стр.


Взаимодействие научного коллектива с приглашённым руководителем С.Л. Смирновым является многосторонним и продуктивным. Приглашённый учёный имеет значительный опыт в области исследования модулярных белков-регуляторов цитоскелета. В частности, он первым определил динамический характер взаимодействия между HP доменом и доменами гельзолинового ядра виллина (Smirnov SL, et. al., Biochemistry 46(25):7488-96, 2007). Используя ресурсы возглавляемой им зарубежной лаборатории, С.Л. Смирнов организовал международный коллектив учёных из России и США, впервые определивших структурно-динамические свойства N-концевой части супервиллина (Fedechkin SO, et. al., J. Biomol. Struct. Dyn. 2012 [Epub]). Работа его лаборатории по этим и другим направлениям поддерживается рядом грантов, как частными (M. J. Murdock Charitable Trust, США, 2008-2012), так и правительственными (National Science Foundation, NSF, США, 2012-2015). Опираясь на свой опыт и знания, приглашённый учёный сформулировал цели и задачи описываемого проекта по структурно-динамическому и функциональному изучению модулярных C-концевых фрагментов виллина и супервиллина, составил план работ и руководит их ходом посредством личного участия во время пребывания в России и в удаленном режиме через электронные средства коммуникации.

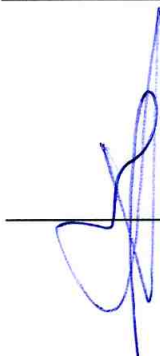
Вклад С.Л. Смирнова в повышение профессионального уровня членов научного коллектива заключается в обучении их современным методам планирования и проведения работ, в привлечении членов группы к написанию научных статей и в расширении их общенаучного кругозора. Им проведён семинар по теме "Роль доменов и междоменных линкеров в регуляции филаментов актина белками семейства виллина". Семинар состоялся в НИИ «Нанобиотехнологии» ОНТИ СПбГПУ с участием 25-ти сотрудников, аспирантов и студентов, включая пятнадцать исполнителей НИР. На семинаре обсуждались темы регуляции F-актина родственными белками гельзолин, виллин и супервиллин и структурно-динамические свойства фрагментов виллина и супервиллина, ответственных за данный вид регуляции. В рамках семинара и дискуссии были описаны и обсуждены теоретические и экспериментальные методы изучения функциональных и структурных свойств данных белков, основные цели и результаты проекта и план последующих совместных действий приглашённого руководителя и научного коллектива.

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВПО «СПбГПУ»


Д.Ю. Райчук

2012 г.

М.П. 
Заместитель руководителя работ
Вед.с. в.ф.м.н.


М.А.Ходорковский