

развитием поликистоза продемонстрировано не было. Возможные ассоциации будут найдены при сравнении полученных генотипов с биохимическими показателями, такими как уровни гормонов коры надпочечников и поджелудочной железы (данные приведены в литературе). Однако, впервые показаны прямые различия между группой женщин, больных поликистозом и здоровым контролем для полиморфизмов генов IRS2 (rs 1805097), PPAR γ (rs 1801282) и IRS1 (rs 1801278) на российской популяции.

ПОИСК БЕЛКОВ КОФАКТОРОВ ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВЛИЯНИЯ ШАПЕРОНА HSP104 НА РЕГУЛЯЦИЮ ЭКСПРЕССИИ НА ПОСТТРАНСКРИПЦИОННОМ УРОВНЕ

В.В. Игнатова¹, А.А. Рубель¹, А.Г. Лада², К.С. Антоненц¹, А.Ф. Сайфитдинова¹

1 - Санкт-Петербургский государственный университет

2 - Eppley Institute for Research in Cancer, Omaha

valentina.v.ignatova@gmail.com

Недавно была показана новая функция шаперонов – участие в регуляции трансляции. Такие данные были получены для дрожжевого шаперона Zuo1in (семейство Hsp40/DnaJ), для шаперона млекопитающих Hsp70 и для представителей семейства Hsp100/ClpB – растительного Hsp101 и дрожжевого Hsp104, которые являются ортологами. Регуляция экспрессии генов шаперонами может происходить за счет связывания с нстранилируемыми областями (UTR) мРНК, которые могут выполнять функцию энхансеров трансляции в клетках эукариот. Известные на сегодняшний день регуляторные последовательности такого типа не имеют какого-либо сходства в первичной последовательности или вторичной структуре, что значительно затрудняет поиск потенциальных энхансерных последовательностей по гомологии с уже известными.

Наша работа посвящена изучению нового энхансера трансляции эукариот. Нами было показано, что последовательность 5'-UTR мРНК CUP1 *S. cerevisiae* участвует в регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном уровне, причем ее влияние зависит от шаперона Hsp104. Мы провели *in silico* анализ структур, формируемых 5'-UTR CUP1 и сайтов потенциального связывания факторов транскрипции и трансляции. Было выяснено, что 5'-UTR мРНК CUP1 содержит четыре тандемных повтора (CAAU) и не способен к формированию стабильных вторичных структур. С помощью флуоресцентной микроскопии и Вестерн-блот гибридации, мы показали, что делеция или мутагенез этих повторов приводят к отсутствию продукции репортерных белков. Для изучения влияния 5'-UTR CUP1 мы сконструировали плазмиды, несущие репортерный ген GFP, под контролем разных промоторов с неизменными лидирующими участками и с дополнительными 5'-UTR CUP1 перед стартовым кодоном. Мы исследовали уровень продукции репортерных белков в штаммах с нормальным уровнем продукции Hsp104, сверхпродукции Hsp104 и в изогенном штамме с делецией гена Hsp104. Нами установлено, что введение дополнительной последовательности 5'-UTR CUP1 приводит к позитивной регуляции экспрессии репортерного гена вне зависимости от промотора.

Для определения роли дрожжевого шаперона Hsp104 в регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном уровне нами был проведен анализ связывания белка Hsp104 с фрагментами меченой РНК методом ретардации в геле с последующим связыванием специфичными антителами. Мы показали, что Hsp104 с высокой эффективностью связывает одонитевую РНК, соответствующую как смысловой, так и антисмысловой последовательности 5'-UTR CUP1. В то же время шаперон Hsp104 не способен связывать двунитевую РНК. Для определения этапа, на котором связывание шаперона с 5'-UTR оказывает влияние на уровень трансляции, мы провели тест с ингибированием РНК-полимеразы II актиномицином. Нами показано, что образование комплекса Hsp104 - 5'-UTR мРНК CUP1 не приводит к стабилизации или увеличению времени жизни РНК в клетке. Можно предположить, что подобный комплекс необходим на стадии инициации трансляции для привлечения трансляционных факторов и субъединиц рибосом. Специфичность взаимодействия и направленность регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном уровне в этом случае должны определяться наличием ко-факторов, распознающих определенную последовательность 5'-

UTR. Методом иммунопреципитации с использованием меченых однонитевых фрагментов РНК был выявлен белковый комплекс, специфично связывающий последовательность 5'-UTR мРНК CUP1. В его состав входит Hsp104 и неизвестные белки. Для выявления всех белков, участвующих в исследуемом взаимодействии, мы планируем использовать метод MALDI масс-спектрометрии.

Работа выполнена при поддержке ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009 - 2013 годы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ САЙТА СВЯЗЫВАНИЯ ИОНОВ ЦИНКА РАЗНЫМИ ФОРМАМИ ФРАГМЕНТА 1-16 БЕТА-АМИЛОИДА

М.И. Индейкина¹, Н. Христенко², А.С. Кононихин¹, С.А. Козин³, И.А. Попов¹, Е.Н. Николаев¹

1 - Институт Биохимической Физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

2 - Московский Физико-Технический Институт (Государственный Университет),
Долгопрудный, Россия

3 - Институт Биомедицинской Химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Москва, Россия
mariind@rbcmail.ru

Характерным признаком болезни Альцгеймера является накопление белковых бляшек, преимущественно образованных молекулами бета-амилоида, в тканях головного мозга у лиц пожилого возраста¹. Бета-амилоид это обычный компонент крови, который присутствует в кровотоке в низких наномолярных концентрациях как у здоровых людей, так и больных с болезнью Альцгеймера². Причины, по которым растворимый мономерный бета амилоид переходит в свою олигомерную форму, до сих пор не установлены, однако известен ряд факторов, влияющих на этот процесс. Так, недавно было показано, что ионы цинка вызывают агрегацию молекул бета-амилоида³, а в амилоидных бляшках пациентов с болезнью Альцгеймера зарегистрированы аномально высокие концентрации цинка⁴. Ранее был определен цинк-связывающий домен молекулы бета-амилоида, фрагмент 1-16, и с помощью масс-спектрометрических методов уточнен непосредственно сайт связывания ионов цинка, главную роль в котором играют три остатка гистидина, расположенные в этом домене⁵. Однако также было показано, что в амилоидных бляшках до 75% молекул пептида модифицированы и содержат изомерную форму остатка аспарагиновой кислоты в 7 позиции⁶, что не только значительно влияет на конформацию пептида, но и усиливает процесс олигомеризации бета-амилоида в присутствии цинка⁷. Таким образом особый интерес представляет не только цинк-связывающий сайт бета-амилоида, но и изменения, вызываемые в нем этой модификацией. Кроме того, существенный интерес представляет информация о различиях сайтов связывания цинка в молекулах амилоида человека и крысы, так как крысы, как известно, не болеют болезнью Альцгеймера, а молекула амилоида крысы отличается от молекулы амилоида человека тремя аминокислотными остатками, расположенными именно в цинк-связывающем домене⁸. Для решения задачи сравнения структур цинк-связывающих фрагментов бета-амилоида были использованы масс-спектрометрические методы. Информация о сайтах связывания была получена посредством сравнительного анализа спектров CID и ECD фрагментации комплексов молекул бета-амилоида с цинком. Таким образом, была получена новая информация о структуре и различиях в изоформах цинк-связывающих доменов и определены сайты связывания цинка молекул бета-амилоида крысы и человека.

¹ Cummings, J. L., Alzheimer's Disease. N Engl JMed 2004, 351, 56-67.

² Mayeux, R., Tang, M. X., Jacobs, D. M., Manly, J., et al., Plasma amyloid beta-peptide 1-42 and incipient Alzheimer's disease. Ann Neurol 1999, 46, 412-416.

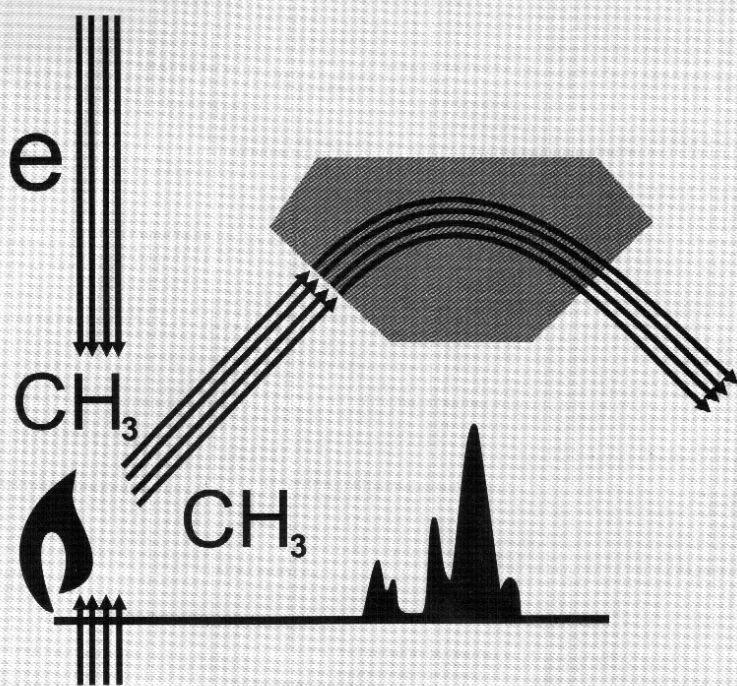
³ Bush, A.I. The metallobiology of Alzheimer's disease. Trends Neurosci. 2003, 26, 207-214.

⁴ Frederickson C. J., Bush A.I. Synaptically released zinc: Physiological functions and pathological effects. BioMetals 2001, 14, 353-366

⁵ Zirah, S., Rebuffat, S., Kozin, S.A., Debey, P., Fournier, F., Lesage, D., and Tabet, J.C. Zinc binding properties of the amyloid fragment A[beta](1-16) studied by electrospray-ionization mass spectrometry. Int JMass Spectrom 2003, 228, 999-1016.

Российская академия наук
Институт энергетических проблем химической физики
Российский университет дружбы народов

10 - 14 октября 2010 г., Звенигород



СБОРНИК ТЕЗИСОВ

Четвертая Всероссийская
конференция-школа
“Фундаментальные вопросы
масс-спектрометрии
и её аналитические применения”