

В модельных клетках нейробластомы крысы PC-12HttQ103, несущих индуцибельную генетическую конструкцию, включающую ген 1го экзонахантингина и зеленого флуоресцентного белка, экспрессию патогенного белка вызывали добавлением в среду PonasteroneA (PA). В этих клетках наблюдали рост агрегатов мутантногохантингина. Анализ кондиционированной среды с помощью метода ультрафильтрации показал, что агрегаты, оказавшиеся в среде, содержат мутантный хантингин и ГАФДГ.

С помощью метода конфокальной микроскопии мы показали, что в клетках SK-N-SH, трансфецированных геном, кодирующим короткий, непатогенный фрагмент хантингинаQ25, при инкубации с Q58 в комплексе с ГАФДГ происходило образование агрегатов, в то время как при инкубации с чистым Q58 агрегация в период наблюдения не происходила.

Чтобы понять, какую роль может играть ГАФДГ в способности Q58 проникать в клетки мы использовали метод CellELISA и убедились, что ГАФДГ многократно усиливает способность патогена проникать в клетки. С помощью ингибиторного анализа с применением ингибиторов внутриклеточного транспорта, мы показали, что ГАФДГ, как сам, так и в комплексе с Q58, проникает в клетки-акцепторы с помощью клатрин-зависимого эндоцитоза, в то время как вхождение Q58 было лишь незначительно подавлено при применении хлорпромазина, ингибитора рецептор-зависимогоэндоцитоза.

Полученные данные позволяют предположить, что фермент гликолиза ГАФДГ, транспортирует мутантныйхантингинв клетки и способствует прионизированию нормальных клеточных белков клетки-акцептора.

МЕХАНИЗМЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ЭКСТРЕМАЛЬНУЮ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ БЕЛКА Hfq

**Мурина В.Н., Леконцева Н.В., Мельник Б.С., Филимонов В.В., Марченков В.В.,
Гарбер М.Б., Никонов С.В., Никулин А.Д.**
ФГБУН Институт белка РАН, Пушкино, Россия

thyrada@rambler.ru

Объектом нашего исследования является белок Hfq из мезофильной бактерии *Pseudomonas aeruginosa*. Этот белок активно исследуется, поскольку большинство малых регуляторных РНК в граммотрицательных бактериях осуществляет свои функции при его участии. Было показано, что белок Hfq принимает участие в ответе на клеточные стрессы (радиация, окислительный стресс, сахаро-фосфатное голодание, понижение и повышение температуры и другие), влияет на вирулентность бактерий, формирование биопленок, регуляцию обмена железа в клетке, и в целом является глобальным регулятором экспрессии бактериальных генов.

Помимо широкого спектра функций, которые он выполняет в клетке, Hfq является экстремально термостабильным белком ($T_{пл.} = 120^{\circ}\text{C}$). Мы исследовали стабильность белка дикого типа и ряда мутантных белков с помощью КД, ДСК и флуоресценции. Нами было показано, что процесс плавления белка сложный, состоит как минимум из двух этапов, которые, по всей видимости, заключаются в диссоциации гексамера до мономеров и последующего плавления мономеров. Оба этапа удалось зафиксировать при исследовании белка РаеHfq с заменой Y55W (внесена триптофановая метка в область межмономерных контактов; его флуоресценция чувствительна к диссоциации гексамера). Процесс разворачивания белка гуанидин гидрохлоридом детектировалось по изменению спектров КД, а диссоциация гексамеров – по изменению флуоресценции. Сравнение графиков этих процессов показало, что S-образная кривая изменения флуоресценции заканчивается раньше, чем начинается кривая изменения КД. Это подтверждает гипотезу о двухэтапном плавлении белка.

Полученные результаты по исследованию белка Hfq из *Pseudomonas aeruginosa* могут быть использованы для повышения стабильности архейных и эукариотических белков его семейства (Sm/Sm-подобных белков).

Работа выполнена при финансовой поддержке программы "Молекулярная и клеточная биология" Президиума РАН и гранта РФФИ № 14-04-31215.