Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова
Биологический факультет
Кафедра биоинженерии

Дипломная работа

по теме

"Исследование взаимодействия I-BAR домена белка MIM с отрицательно заряженной липидной мембраной"

Выполнила студентка 5 курса
Станишнева-Коновалова Т. Б.

Научный руководитель:
к. б. н., доцент МГУ Соколова О. С.

Москва
2011

Оглавление

Список сокращений....3
Глава 1. Литературный обзор....4
1Введение. Цитоскелет....4
2Актиновые филаменты. Полимеризация актина....4
3Актинсвязывающие белки....6
3.1Нуклеация актиновых филаментов....7
3.2G-актин связывающие белки....9
3.3F-актин связывающие белки....10
4Актин в клетках....11
4.1Ламеллоподии....11
4.2Сократительные структуры клетки....12
4.3Ядерный актин....13
4.4Передача сигналов цитоскелету — ГТФазы семейства Rho....13
4.5Филоподии....14
5Взаимодействие между цитоскелетом и плазматической мембраной....15
5.1PI(4,5)P2 и PI(3,4,5)P3....16
6Суперсемейство белков BAR....18
6.1BAR домены....18
6.2F-BAR домен....19
6.3I-BAR домен....19
7Белок MIM....19
7.1Альтернативный сплайсинг у MIM....20
7.2Структура и функции MIM. WH2 и I-BAR домены....20
Глава 2. Материалы и методы....24
1Физические основы метода молекулярной динамики....24
2Расчёт координат атомов. Численное интегрирование....26
3Температура и термостаты....27
3.1Термостат Берендсена....28
3.2Коллизионный (столкновительный) термостат....29
4Поддержание постоянного давления....30
5Метод крупнозернистой (coarse-grained) молекулярной динамики....31
5.1Создание крупнозернистой модели на основе формы (shape-based coarse graining)....31
5.2Создание крупнозернистой модели на основе остатков (residue-based coarse graining)....32
Глава 3. Исследование взаимодействия I-BAR домена белка MIM с отрицательно заряженной липидной мембраной....33
1Цели и задачи....33
2Сборка систем и постановка расчётов....33
3Результаты и обсуждение....35
3.1Системы "мембрана — димер"....35
3.2Аминокислотные остатки, взаимодействующие с мембраной....39
3.3Расчёт зависимости кривизны мембраны от времени....41
3.4Система "мембрана — N-концевой пептид"....43
Выводы....45
Приложение 1. Скрипт для расчёта кривизны мембраны....46
Список использованной литературы....49

Список сокращений

BAR – Bin-Amphiphysin-Rvs

MIM – Missing-In-Metastasis

$PI(3,4,5)P_3$ – Фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат

$PI(4,5)P_2$ – Фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат

PIP(4,5)PC – Фосфоинозитид-4,5-фосфатидилхолин

POPC – Пальмитоил-олеил-фосфатидилхолин

WASP – Wiscott-Aldrich syndrome protein

WAVE – WASP family Verprolin homologous

WH2 – WASP homology 2

МД – Молекулярная динамика

ПФ – Промежуточные филаменты

Глава 1. Литературный обзор

1 Введение. Цитоскелет

Эукариотические клетки обладают цитоскелетом, который позволяет им поддерживать или изменять свою форму, передвигаться, делиться, поглощать и выделять вещества и т. д. Все эти процессы осуществляются с помощью белков, регулирующих его динамику. Цитоскелет образован филаментами трёх типов: 1) микрофиламенты, состоящие из белка актина, 2) микротрубочки, состоящие из тубулина, и 3) промежуточные филаменты, которые могут быть сформированы различными белками (Bray, 2001).

Микротрубочки представляют собой трубчатые структуры, функционирующие в клетках как формообразующие элементы или как "рельсы" для передвижения везикул. Моторными белками, осуществляющими передвижение, являются кинезины и динеины. Микротрубочки также играют важную роль в клеточном делении, образуя митотическое веретено, которое отвечает за расхождении хромосом.

Промежуточные филаменты (ПФ) — неоднородный класс цитоскелетных структур, которые могут быть сформированы различными белками, обычно специфическими для каждого клеточного типа. ПФ являются упругими волокнами, в основном ответственными за устойчивость клетки к механическим воздействиям. Особые типы ПФ формируют ядерную оболочку, защищающую ядро и поддерживающую его форму (Herrmann et al, 2007). В недавних исследованиях было показано, что ПФ могут также функционировать как скаффолд-белки для сигнальных молекул клетки (Pallari and Eriksson, 2007).

2 Актиновые филаменты. Полимеризация актина

Микрофиламенты формируют огромное количество цитоскелетных структур, вовлечённых в процессы движения, деления, экзо- и эндоцитоза и многие другие. Они образованы актином (рис. 1), являющимся одним из самых распространённых белков в наших клетках. Этот белок очень консервативен: актин дрожжей на 90% идентичен актину человека. Низшие эукариоты обладают только одним геном актина, в то время как у млекопитающих есть несколько изоформ, отличающихся уровнями экспрессии в

разных тканях.

Мономер актина (G-актин) — глобулярный белок массой 43кДа, состоящий из 4 доменов. Между парами доменов находятся сайты связывания АТФ или АДФ и Mg^{2+}. Важнейшим свойством G-актина является его способность полимеризоваться и образовывать филаменты, называемые F-актином. Эти филаменты представляют собой две перекрученные цепочки диаметром 7-8 нм. Филаменты обладают полярностью, т. е. два их конца неравноценны по своему строению, способности присоединять новые молекулы актина и другим свойствам. Один конец обозначается как "+" (быстрорастущий конец), другой "-" (медленнорастущий).

Рисунок 1: G-актин, связанный с молекулой АДФ

В клетках актин циркулирует между полимеризованной и деполимеризованной формами. При полимеризации мономеры актина в АТФ-связанной форме присоединяются к быстрорастущему концу филамента, обладающему высоким сродством к АТФ-G-актину. Затем АТФ гидролизуется до АДФ и фосфат высвобождается, оставляя остаток филамента в АДФ-связанном состоянии. Предположительно, высвобождение фосфата вызывает структурные изменения в полимере, делающие его менее стабильным, поэтому на "-"-конце идёт деполимеризация. После этого молекула АДФ, связанная с мономером актина, заменяется на АТФ и цикл повторяется (рис. 2) (Pollard, 1986; Wegner, 1982).

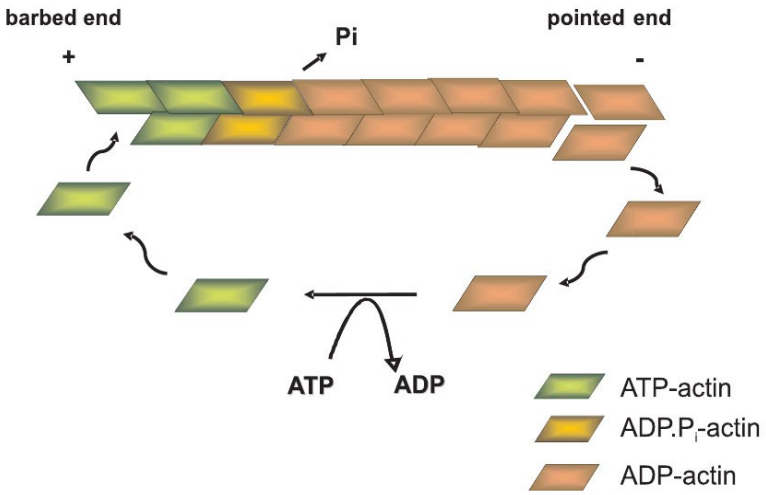


Рисунок 2: Цикл полимеризации-деполимеризации актина.

Описанный выше цикл является результатом различия критических концентраций G-

актина для двух концов: 0,1 мкМ для "+"-конца и 0,7 мкМ для "-"-конца. Между этими концентрациями система находится в стабильном состоянии, когда скорости полимеризации и деполимеризации равны, а концентрация свободного актина остаётся близкой к 0,1 мкМ. (Pollard, 1986).

3 Актинсвязывающие белки

Динамика актинового цитоскелета регулируется огромным числом актин-связывающих белков. Кроме того, специальные актин-секвестирующие белки связывают мономеры актина, высвобождая их для полимеризации по мере необходимости. В отсутствии таких белков концентрация G-актина в клетке составляла бы 100 мкМ, что значительно превышает критические концентрации.Несмотря на большое разнообразие функций белков, регулирующих динамику актина, у них существует всего несколько мотивов укладки. Одним из наиболее распространённых актин-связывающих мотивов является WH2 (WASP homology 2) домен (рис. 3). Он относится к тому же семейству, что и β-тимозин (βT) домен. β-тимозины это небольшие актин-секвестирующие белки позвоночных, состоящие только из βT-домена. Они присутствуют в большинстве клеток в высоких концентрациях (до 500 мкМ) и рассматриваются как главные актин-секвестирующие клеточные агенты (Hannappel, 2007). WH2 домен короче, чем βT домен и не секвестирует G-актин. Его функции в белках WASP/WAVE, верпролин/WIP связаны с нуклеацией актиновых филаментов. Многие мультидоменные регуляторы актинового цитоскелета, такие как Srv2/CAP и IRSp53/MIM белки, тоже содержат WH2 домен. Кроме того, у низших многоклеточных (Drosophila melanogaster, Caenorhabditis elegans) также существуют WH2/ βT подобные белки. Их точные функции не установлены, но предполагается, что они связаны с развитием нейронов.

Рисунок 3: WH2 домен белка WASP в комплексе с актином и ДНКазой-1 (код в PDB - 2a3z)

3.1 Нуклеация актиновых филаментов

Помимо образования актиновых филментов de novo, "+"-концы могут быть получены в результате формирования дочерних цепей. Ключевое значение при ветвлении актиновых филаментов и образовании лидирующего края имеет Arp2/3-комплекс, состоящий из 7 субъединиц (рис. 4). Было показано, что активация комплекса включает 3 конформации: открытую, промежуточную и закрытую (Rodal et al., 2005). В процессе активации две субъединицы комплекса arp2 (actin related protein 2) и arp3 (actin related protein 3), гомологичные по строению мономерам актина, сближаются (закрытая конформация) и при взаимодействии с активатором дают начало дочерней боковой цепи, образующей с материнской угол в 70°.

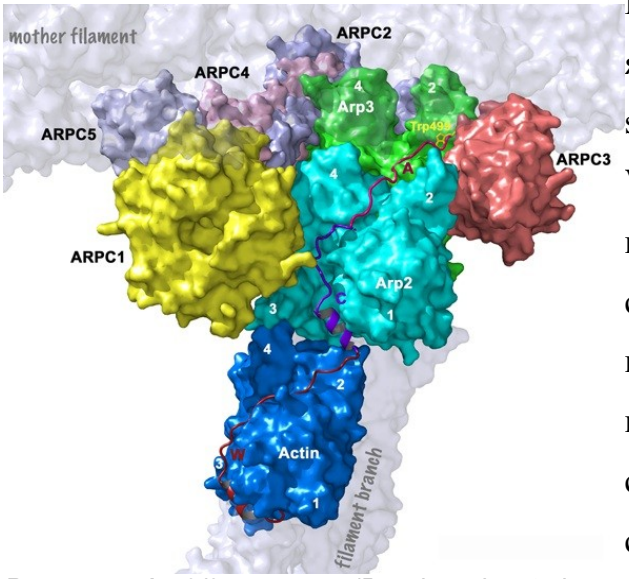


Рисунок 4: Arp2/3 комплекс (Boczkowska et al., Structure 2008)

Главными активаторами Arp2/3 комплекса являются белки WASP (Wiscott-Aldrich syndrome protein) и WAVE (WASP family Verprolin homologous). Эти белки имеют C-концевой каталитический VCA модуль, содержащий WH2 домен, который взаимодействует с актиновыми мономерами и Arp2/3-комплексом. Актиновый мономер, связанный с WH2 доменом белка WASP, становится первым мономером образующегося филамента (Mullins, 2000). Сравнение белков WASP и WAVE показало, что наиболее эффективным активатором является найденный в нервных клетках N-WASP белок, содержащий два WH2 домена (Dominguez, 2007; Frittoli, 2007).

WASP специфически экспрессируется в кроветворных клетках и был изначально определён как ген, ответственный за синдром Вискотта-Олдрича (иммунное заболевание). Близкий гомолог N-WASP в большом количестве экспрессируется в нервной ткани, однако присутствует и в других. В клетках большая часть N-WASP связана с белками семейства WIP (WASP interacting protein)/верпролин, которые, по-видимому, стабилизируют неактивную конформацию. Мутации WIP-связывающего сайта белка WASP найдены у многих пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича, что

говорит о важности этого взаимодействия in vivo (Burns et al., 2004). WIP/верпролин белки содержат два WH2 домена, взаимодействующие с F- и G-актином. Молекулярные механизмы связывания актина и функции этих белков остаются спорными, поскольку показано, что они ингибируют WASP-Arp2/3 опосредованную нуклеацию филаментов, но необходимы для Cdc42-зависимого формирования филоподий (Aspenstrom, 2005).

Взаимодействие с Cdc42 и фосфатидилинозитол-4,5-бифосфатом ($PI(4,5)P_2$) снимают автоингибирование с N-WASP, что приводит к активации Arp2/3-комплекса (Prehoda et al., 2000). С другой стороны, WAVE белки могут функционировать в составе многомолекулярного комплекса, включающего белки Abi1, Sra1/PIR121, Nap/Kette, HSPC300. Rac1 связывается с WAVE-комплексом, но как это приводит к активации Arp2/3 остаётся не совсем понятным (Eden et al., 2002; Innocenti et al., 2004). Функции WASP и WAVE связаны не только с формированием ламеллоподий и филоподий движущихся клеток, но и с образованием фагоцитарных пузырьков и клеточной адгезией (Stradal and Scita, 2006).

Другое семейство белков, инициирующих сборку актиновых филаментов — формины. Их особенностью является то, что они остаются связанными с "+"-концом растущего филамента (Pruyne et al., 2002). Формины обеспечивают полимеризацию актина за счёт FH2 (formin homolody 2) домена, который гомодимеризуется в "пончикоподобную" структуру и двигается вместе с растущим концом. Рядом с FH2 доменом находится FH1 домен, содержащий пролин-богатую последовательность, взаимодействующую с профилином и способствующую полимеризации комплексов профилин-актин. Формины защищают "+"-конец от кэп-белков (Zigmond et al, 2003). У млекопитающих есть не менее 15 различных форминов. Одними из наиболее изученных являются мышиные mDia1 (mouse diaphanous-related formin) и mDia2, которые автоингибируются взаимодействием между доменами DAD (diaphanous autoregulatory domain) и DID (diaphanous inhibitory domain). Rho ГТФаза связывается с N-концевым регионом рядом с DID и снимает автоингибирование. Формины участвуют во многих клеточных процессах, например, в цитокинезе, адгезии, эндоцитозе и формировании филоподий, а так же в стабилизировании микротрубочек и митотического веретена (Goode and Eck, 2007).

3.2 G-актин связывающие белки

Группа G-актин связывающих белков регулирует пул клеточного G-актина, секвестируя или высвобождая мономеры для полимеризации в соответствии с требованиями клетки. Шесть G-актин связывающих белков очень консервативны в течение эволюции: профилин, ADF/кофилин, твинфилин, Scr2/CAP, WASP/WAVE и верпролин/WIP.

Профилин — это небольшой белок, широко представленный в клетках и необходимый во многих связанных с динамикой актина процессах (рис 5). Профилин обладает большей афинностью к АТФ-G-актину, чем к АДФ-G-актину (K_D = 0.1 и 0.5 мкМ соответственно) и некоторые изоформы катализируют АДФ/АТФ нуклеотидный обмен. Профилин также катализирует добавление актиновых мономеров к "+"-концам филаментов, но в отсутствии свободных концов, он функционирует как актин-секвестирующий белок. Кроме того, профилин взаимодействует с полипролиновыми последовательностями некоторых белков, в том числе N-WASP, Ena/VASP, Arp2/3 и форминов, которые участуют в полимеризации актина.

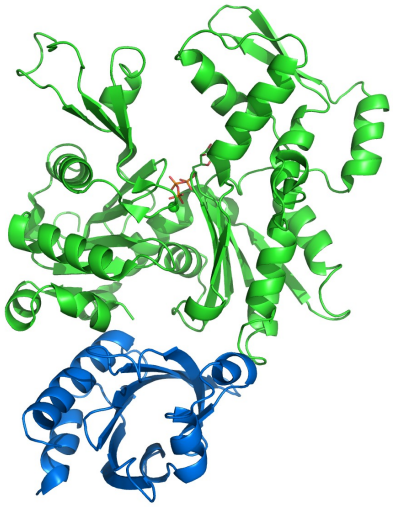


Рисунок 5: Комплекс профилина с актином (код в базе PDB - 2BTF)

Для поддержания пула актиновых мономеров и постройки новых актиновых структур необходима быстрая деполимеризация ненужных филаментов. Единственным семейством белков, выполняющих эту задачу, является ADF/кофилины. Это небольшие белки, состоящие из одного ADF-H (actin depolymerizing factor homolody) домена, присутствующие во всех эукариотических клетках и присоединяющиеся и к F- и к G-актину. Они предпочтительно связываются с АДФ-актином, стимулируя диссоциацию неорганического фосфата из F-актина, и в то же время индуцируют поворот в структуре филамента, что приводит к деполимеризации (Paavilainen et al., 2004). ADF/кофилины остаются связанными с диссоциировавшими мономерами, постепенно освобождая их для взаимодействия с другими актин-связывающими белками. Они также препятствуют спонтанной нуклеотидной замене в мономерах актина, поддерживая их в неподходящем для полимеризации состоянии.

Твинфилин (twinfilin) состоит из двух ADF-H доменов, связанных коротким линкерным участком. Твинфилин связывает АДФ-актиновые мономеры, препятствуя их присоединению к филаментам. В дополнение к актин-секвестирующей функции, твинфилин связывается с кэп-белком и даже может выступать в роли кэп-белка для "+"-конца (Helfer et al., 2006; Paavilainen et al., 2007). Твинфилин вовлечён в процессы развития Drosophila и в эндоцитоз млекопитающих и дрожжей, однако как различные биохимические актвности этого белка связаны с этими процессами ещё не известно. Srv2/CAP непосредственно взаимодействует с актиновыми мономерами и недостаток этого белка приводит к дефектам в организации цитоскелета. Предположительно, основная функция Srv2/CAP заключается во взаимодействии с другими актин-связывающими белками, такими как ADF/кофилин, и возвращении мономеров актина и ADF/кофилина в новые циклы ассоциации и диссоциации филаментов соответственно (Goode, 2007).

3.3 F-актин связывающие белки

F-актин связывающие белки изменяют характеристики актиновых филаментов, создавая различные актиновые сети для нужд клетки.

Тропомиозины связываются с филаментами, препятствуя их деполимеризации, кэпированию и ветвлению (Blanchoin et al., 2001). Классическая функция тропомиозина выполняется в саркомерах мышечных клеток. Вместе с тропонином он связан с актиновыми филаментами и играет важнейшую роль в Ca-зависимом мышечном сокращении, регулируя скольжение миозиновых головок вдоль F-актина.

Миозины — большое семейство актиноподобных молекулярных моторов, передвигающихся вдоль актиновых филаментов в заданном направлении. Миозины состоят из трёх доменов: моторного домена, взаимодействующего с актином и обладающего АТФазной активностью, "шарнирного" участка и стержневого участка, к которому прикрепляются другие молекулы. Этими молекулами могут быть актиновые филаменты, мРНК, мембранные везикулы и др. В немышечных клетках миозины участвуют, например, в сокращении стресс-фибрилл и формировании псевдоподий (Faiz and Rottner, 2006; Sellers, 2000).

Ещё одним важным F-актин связывающим белком является α-актинин. В

немышечных клетках он присутствует в стресс-фибриллах, ламеллоподиях, в межклеточных соединительных структурах. α-актинин представляет собой димер, мономеры которого состоят из N-концевого актин-связывающего участка, четырёх спектрин-подобных повторов, ответственных за димеризацию, и С-концевого кальмодулин-подобного домена, обеспечивающего чувствительность к ионам Ca (Witke et al, 1993). В миофибриллах α-актинин располагается в Z-дисках, связывая актиновые филаменты соседних саркомеров.

4 Актин в клетках

Актин формирует в клетках разнообразные динамичные филаментные структуры. Одна из их функций — поддержание клеточных органелл, молекулярных комплексов, молекул мРНК. Однако наиболее хорошо изученные актиновые структуры находятся не в объёме клетки, а на периферии. Традиционным примером процесса, в котором они играют важнейшую роль, является передвижение клетки (рис. 2).

4.1 Ламеллоподии

Передвижение клеток осуществляется в основном с помощью формирования выступающих актин-содержащих структур. называемых псевдоподиями. Наиболее выступающая структура на ведущем краю клетки называется ламеллоподией. На ламеллоподиях могут формироваться филоподии (рис.6). Обе эти структуры образованы актиновыми филаментами, направленными своими “+”-концами к плазматической мембране (Svitkina et al., 2003).

Толщина ламеллоподии около 200 нм, ширина до нескольких микрометров (Small and Resch, 2005). Она сформирована ветвящимися актиновыми филаментами, причём частота ветвления максимальна в непосредственной близости от мембраны. За лидирующим краем происходит деполимеризация филаментов и постепенно они сменяются другими поддерживающими структурами, такими как стресс-фибриллы. Ламеллоподии, не имеющие связи с субстратом, называются обычно мембранными складками. В движущихся фибробластах скорость полимеризации актина обычно больше, чем скорость движения клетки, поэтому актиновые филаменты сдвигаются назад (относительно субстрата). Это явление называется ретроградным потоком

актиновых филаментов.

Ламеллоподии образуются не только на лидирующем краю клетки, но и, например, в конусе роста нейритов и в процессе фагоцитоза у макрофагов. Очевидно, что необходимо большое число компонентов, чтобы регулировать формирование ламеллоподий и адаптировать его к различным клеточным функциям.

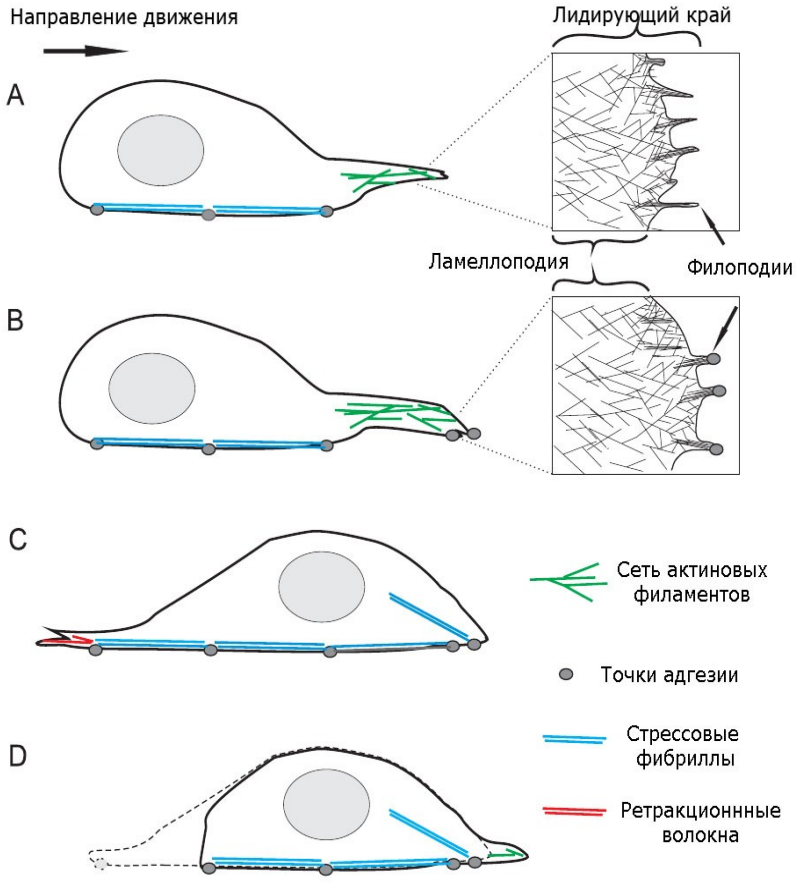


Рисунок 6: Схематическое представление процесса клеточного движения. A. Движение клетки начинается с формирования лидирующего края. Он состоит из ламеллоподий и выступающих из них филоподий, которые содержат актиновые филаменты с "+"-концами, направленными к мембране. B. Лидирующий край соединяется с субстратом. C. Содержимое клетки перемещается вперёд за счёт работы акто-миозиновых комплексов. D. Связи задней части клетки с субстратом исчезают и задний край втягивается.

4.2 Сократительные структуры клетки

Сократительные волокна состоят из антипараллельно расположенных актиновых филаментов, связанных с миозинами. Типичным примером такой структуры является актомиозиновый комплекс в саркомерах мышечных клеток, где F-актиновые филаменты наиболее стабильны. В немышечных клетках также встречаются подобные структуры, например, соединительные бляшки клеток эпителия,

сократительные кольца в делящихся клетках, разделяющие 2 дочерние клетки в ходе цитокинеза.

Характерной чертой эукариотических клеток является актиновый кортекс, располагающийся под мембраной. Подобно миофибрилле, кортекс может сокращаться за счет взаимодействия актиновых микрофиламентов с миозиновыми молекулами. Однако, в отличие от миофибриллы, в кортексе микрофиламенты далеко не всегда параллельны друг другу, часто они образуют сложные сети. Поэтому сжатие кортекса идет обычно в нескольких направлениях. Кроме того, в кортексе, в отличие от миофибриллы, микрофиламенты очень динамичны; кортекс все время обновляется и перестраивается путем полимеризации-деполимеризации нитей. Если средняя продолжительность жизни микрофиламента в миофибрилле более 7 дней, то в кортексе лейкоцита - всего лишь 5 с.

4.3 Ядерный актин

Роль актина в ядре долгое время оставалась неясной, во многом из-за того, что фаллоидин, широко использующийся для визуализации актина в клетках, не связывается с ядерным актином. Это может значить, что ядерный актин не образует филаменты или их структура отлична от цитоплазматических. Позже было показано, что ядерный актин необходим для эффективной транскрипции РНК-полимеразами 1, 2 и 3 (Fomproix and Percipalle, 2004; Hofmann et al., 2004; Hu et al., 2004; Philimonenko et al., 2004). В частности, предполагается, что актин играет роль в сборке комплекса инициации транскрипции и на стадии элонгации (Hofmann et al., 2004).

4.4 Передача сигналов цитоскелету — ГТФазы семейства Rho

Семейство ГТФаз Rho включает 22 белка, играющих главные роли в регуляции актинового цитоскелета. Они регулируют многие актин-связывающие белки, а также микротрубочки. Активной формой является ГТФ-связанная форма, неактивной — ГДФ-связанная. Переход из активной формы в неактивную происходит за счёт ГТФазной активности. Существует также ряд вспомогательных факторов, активирующих ГТФазы, проводящие замену ГДФ на ГТФ и др. ГТФазы Rho обычно содержат липид-связывающие мотивы и поэтому локализуются вблизи мембран. Наиболее хорошо изучены Rho ГТФазы млекопитающих Rac1, Cdc42 и RhoA.

Многочисленные исследования показали, что Cdc42 отвечает за формирование филоподий, но в некоторых типах клеток также участвует в образовании ламеллоподий. Функции Rac1 связывают с активацией Arp2/3 комплекса через снятие ингибирования с белков WAVE (Eden et al., 2002). Ингибирование Cdc42 или Rac1 приводит к нарушениям в образовании лидирующего края (Ridley, 2006). Cdc42 взаимодействует со многими белками, но наиболее чётко показана его роль в индукции Arp2/3-зависимой нуклеации через активацию белков WASP и N-WASP (Stradal and Scita, 2006).

RhoA индуцирует формирование стресс-фибрилл и точек адгезии. Этот белок инактивирует ADF/кофилины, а также активирует формины, по крайней мере mDia1 и mDia2.

4.5 Филоподии

Филоподии вовлечены в такие клеточные процессы как движение, заживление ран, прикрепление к внеклеточному матриксу, восприятие хемоаттрактанов, эмбрииональное развитие и др. Филоподия представляет собой пальцевидный выступ, построенный параллельно уложенным F-актином. Они различаются по длине, динамике и локализации. Существуют клеточные структуры, морфологически напоминающие филоподии и также образованные параллельно уложенными рядами F-актина, но они гораздо менее динамичны и выполняют другие функции. Сюда относятся микроворсинки энтероцитов и лимфоцитов, а также стереоцилии волосковых клеток.

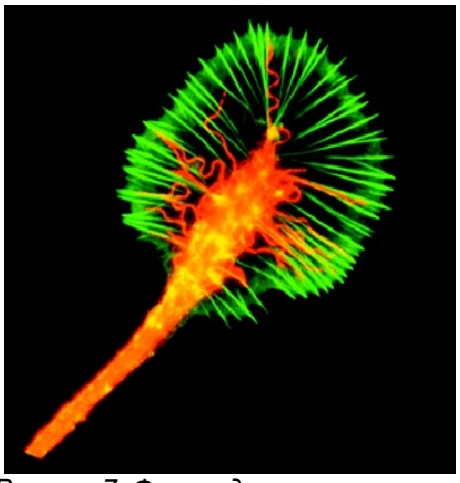


Рисунок 7: Филоподии на конусе роста нейронов (The Journal of Cell Biology, 2002, 157 (5))

Главной функцией филоподий считается восприятие клеточного окружения и поступающих клетке сигналов. На филоподиях расположены различные виды рецепторов и молекулы адгезии (интегрины и кадгерины). В конусе роста нейронов филоподии играют важную роль в определении правильного направления роста аксона и дендритов (рис 7). У макрофагов филоподии связываются с патогенами и притягивают их к клетке, после чего ламеллоподии формируют

фагоцитарный пузырёк.

В отличие от филоподий, микроворсинки менее динамичны и относительно постоянны в длине. Они находятся на апикальной поверхности многих эпителиальных клеток, а также на лимфоцитах и некоторых сенсорных клетках. В кишечнике их роль заключается в увеличении поверхности всасывания. Пример высокоспециализированных микроворсинок — стереоцилии волосковых клеток внутреннего уха. Стереоцилии воспринимают звуковые волны и сдвигаются, что приводит к открытию ионных каналов и передаче сигнала.

Для описания процесса формирования филоподий из ламеллоподий была предложена следующая модель. Ключевая роль здесь принадлежит Ena/VASP белкам, локализующимся в верхних частях филоподий. Предполагается, что они ассоциируются с "+"-концами филаментов, препятствуюя их кэпированию и стимулируя элонгацию (Gupton and Gertler, 2007; Welch and Mullins, 2002). Для формирования и поддержания структуры филоподий необходимы также белки, связывающие актиновые филаменты в пучки. Такими белками являются фасцин, α-актинин и ABP-280.

Существует и другой механизм формирования филоподий, при котором ламеллоподия не является платформой. Важную роль здесь играет формин Dia2. Его гиперэкспрессия индуцировала формирование филоподий во многих клеточных типах.

Не вполне ясная роль в формировании филоподий принадлежит миозинам. Гиперэкспрессия миозина X индуцировала формирование филоподий, при этом миозин располагался в их верхней части (Berg and Cheney, 2002). Миозин X также взаимодействует с VASP, PI(3,4,5)P3 и интегринами. Предположительно он транспортирует другие белки, такие как Ena/VASP и интегрины, в верхнюю часть филоподий.

5 Взаимодействие между цитоскелетом и плазматической мембраной

Многие актин-зависимые процессы, такие как формирование клеточных выступов, деление клеток, транспорт везикул, связаны с перестройками плазматической

мембраны или других мембранных структур. Недавние исследования показали, что мембранные фосфоинозитиды могут опосредовать сигналы актиновому цитоскелету.

5.1 PI(4,5)P_2 и PI(3,4,5)P_3

Локализация и активность огромного количества белков, регулирующих динамику актинового цитоскелета, контролируется фосфолипидами плазматической мембраны. Наиболее важными являются фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат (PI(4,5)P_2) (рис. 8) и фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат (PI(3,4,5)P_3).

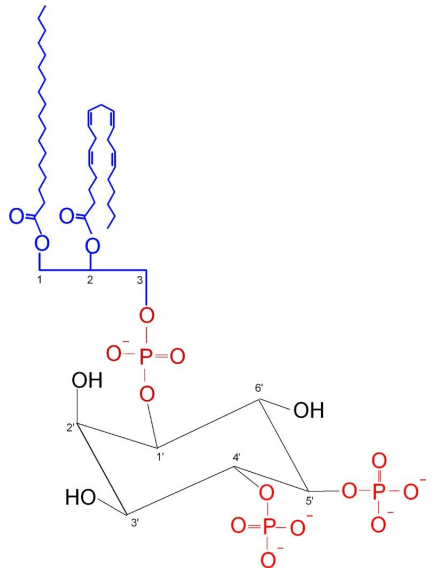


Рисунок 8: Фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат

Примерно 5% всех фосфоинозитидов в клетке форсфорилированы в 4 и 5 положении и на долю PI(4,5)P_2 приходится около 1% всех фосфолипидов клетки (McLaughlin et al., 2002; Rameh and Cantley, 1999). Локальная концентрация PI(4,5)P_2 составляет примерно 5мМ (Lemmon and Ferguson, 2000). Раньше PI(4,5)P_2 рассматривался как предшественник вторичных мессенджеров инозитол-1,4,5-трифосфата (IP_3) и диацилглицерола (ДАГ). Однако исследования показали, что PI(4,5)P_2 сам по себе способен взаимодействовать со множеством актин-связывающих белков и регулировать их активности. Было показано, что PI(4,5)P_2- или PI(3,4,5)P_3-богатые везикулы способны индуцировать полимеризацию актина в клеточных экстрактах Xenopus laevis (Ma et al., 1998). Кроме того, гиперэкспрессия PI(4,5)P_2-киназы индуцирует формирование F-актиновых структур, а гиперэкспресси PI(4,5)P_2-свзязывающего PLCδ PH домена ингибирует полимеризацию актина (Hilpela et al., 2004; McLaughlin et al., 2002).

Концентрация PI(4,5)P_2 в клетке остаётся примерно постоянной, но немного изменяется в процессе клеточной миграции. PIP-киназы, продуцирующие PI(4,5)P_2, располагаются в плазматической мембране и активируются ГТФазами семейства Rho. Исследование, проведённое на дрожжах Saccharomyces cerevisiae, показало, что количество PI(4,5)P_2 возрастает и уменьшается на разных стадиях клатрин-зависимого

эндоцитоза (Sun et al., 2007).

В целом, $PI(4,5)P_2$ инактивирует многих отрицательных регуляторов полимеризации актина и, соответственно активирует положительных. $PI(4,5)P_2$ активирует WASP и N-WASP и вызывает отсоединение гельзолина и кэп-белка от "+"-конца, что приводит к полимеризации актина в непосредственной близости от мембраны (Liepina et al., 2003; Schafer et al., 1996). ADF/кофилины ингибируются $PI(4,5)P_2$ и другими фосфоинозитидами (Paavilainen et al., 2004).

Было также показано, что $PI(4,5)P_2$ активирует белки семейства ERM, связывающие актиновые филаменты с мембранными белками. Кроме того, $PI(4,5)P_2$ участвует в активации белков фокальной адгезии, талина и винкулина, и различным образом регулирует активности белков, сшивающих актиновые филаменты (например, α-актинин активируется, а филамин ингибируется) (Hilpela et al., 2004).

Помимо регулирования активности белков, фосфоинозитиды также функционируют как сигналы локализации. $PI(3,4,5)P_3$, в отличие от своего предшественника $PI(4,5)P_2$, содержится в плазматической мембране в меньшем количестве и не так равномерно распределён, поэтому может служить пространственным маркёром для сигнальных путей (Insall and Weiner, 2001). Менее 0,25% от общего числа фосфоинозитидов фосфорилированы по 3 положению, и даже после стимуляции концентрация $PI(3,4,5)P_3$ остаётся в 20 раз ниже, чем $PI(4,5)P_2$, достигая предельной локальной концентрации 200 мМ (Lemmon and Ferguson, 2000).

PIP 3-киназа, фосфорилирующей $PI(4,5)P_2$ по 3 положению, необходима во многих процессах, связанных с самосборкой актина. Она активируется особыми факторами роста. Возрастание концентрации $PI(3,4,5)P_3$ приводит к усилению полимеризации актина и клеточной подвижности. Rho ГТФазы, например, являются эффекторами $PI(3,4,5)P_3$ и передают сигнал далее. Чтобы обеспечить краткосрочность сигнала, PIP 5-фосфатазы быстро дефосфорилируют $PI(3,4,5)P_3$. Несмотря на то, что большая часть эффектов $PI(3,4,5)P_3$ опосредована ГТФазами Rho, $PI(3,4,5)P_3$ может непосредственно взаимодействовать с миозином X (см. выше).

6 Суперсемейство белков BAR

За последнее десятилетие было найдено большое количество белков, способных создавать, поддерживать и воспринимать изгиб мембраны с помощью так называемых BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs) и F-BAR (FCH BAR) доменов. BAR и F-BAR доменные белки функционирует в частности в процессе эндоцитоза и многие из них взаимодействуют с регуляторами актинового цитоскелета.

6.1 BAR домены

Общей чертой BAR доменов является их способность объединяться в димеры и формировать трубчатые структуры из липосомной мембраны. При гиперэкспрессии BAR-доменных белков в клетках, трубчатые структуры формируются из плазматической мембраны. BAR домены также взаимодействуют с некоторыми ГТФазами, в том числе с Rac1 (Habermann, 2004; Itoh and De Camilli, 2006). BAR домены формируют димеры, взаимодействующие с отрицательно заряженными липидами мембраны группами положительно заряженных аминокислотных остатков на вогнутой стороне димера. Деформация мембраны достигается за счёт изгиба самого домена (рис. 9).

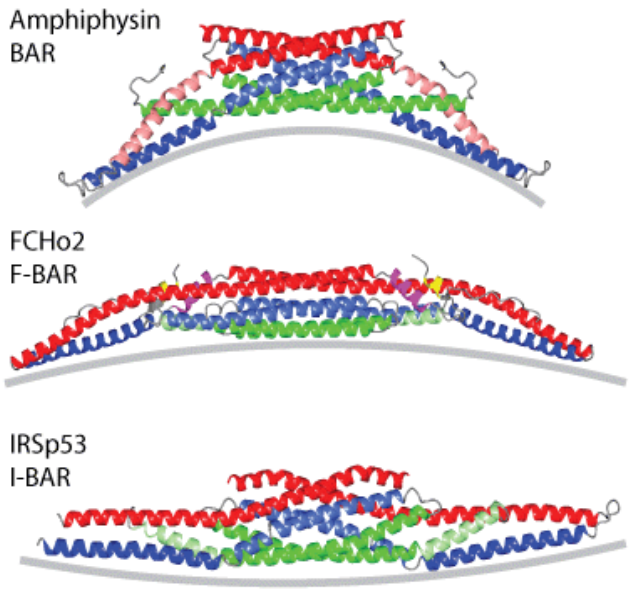


Рисунок 9: Суперсемейство BAR

Группа BAR доменов, называемых N-BAR доменами, содержит амфипатическую N-концевую спираль, которая встраивается в липидный бислой и способствует более сильному изгибу мембраны. Белки, содержащие N-BAR домены, возможно обеспечивают стабильный изгиб клеточной мембраны, тогда как другие BAR-доменные белки воспринимают его и привлекают другие белки к местам изгиба (Gallop et al., 2006; Masuda et al., 2006; Peter et al., 2004).

6.2 F-BAR домен

F-BAR доменные белки это ещё один класс белков, способных изгибать мембраны и формировать трубчатые структуры из липосом. F-BAR домен является гомологом BAR домена, но обладает более длинными спиралями и менее изогнут (рис. 9), что коррелирует с большим диаметром формируемых ими трубочек. Предполагается, что F-BAR и BAR доменные белки функционируют на разных этапах эндоцитоза, связываясь с разными участками формирующегося пузырька.

6.3 I-BAR домен

I-BAR домен (или IM домен) был найден в белках IRSp53 (Insulin receptor substrate p53) и MIM (Missing-in-metastasis), регулирующих динамику цитоскелета. Гиперэкспрессия этих белков в клетках приводила к усиленному формированию филоподий (Yamagishi et al., 2004). Согласно нескольким исследованиям, I-BAR домены связывают F-актин (Bompard et al., 2005; Dinsanza et al., 2006; Yamagishi et al., 2004), но позднее было показано, что эта активность является артефактом, возникающим из-за агрегации белков (Lee et al., 2007; Mattila et al., 2007). Было также показано, что I-BAR домен активирует Rac1 (Bompard et al., 2005; Miki et al., 2000). I-BAR домен обладает сходством с BAR и F-BAR доменами, но формирует изгиб мембраны в противоположную сторону (рис. 9).

IRSp53 взаимодействует со многими белками и предположительно функционирует как скаффолд-белок в механизме полимеризации актина. IRSp53 взаимодействует с Rac1 и Cdc42 N-концевой областью и с белками WAVE2 и белком Mena из семейства Ena/VASP своим центральным SH3 доменом. Преобладающая часть IRSp53 находится в районе клеточной мембраны (Suetsugu et al., 2006).

7 Белок MIM

Белок MIM (Missing-in-metastasis) был изначально определён как транскрипт, присутствующий в неметастазирующей линии клеток рака мочевого пузыря, но отсутствующий в метастазирующей (Lee et al., 2004). В дальнейшем его роль непосредственно в образовании метастаз не подтвердилась, однако многие

исследования показали, что уровень экспрессии MIM связан с поведением опухолевых клеток и различными типами опухолей (Callahan et al., 2004; Loberg et al., 2005; Ma et al., 2007). MIM экспрессируется только у позвоночных, хотя у некоторых беспозвоночных (Drosophila, Caenorhabditis elegans) есть белки со сходным строением N-концевой части.

7.1 Альтернативный сплайсинг у MIM

Было найдено 3 варианта мРНК, кодирующей MIM: MTSS1_v1 (белок MIM-CT), MTSS1_v2 (белок MIM) и MTSS1_v3 (белок MIM с делецией) (Loberg et al., 2005). Ген MTSS1 находится на хромосоме 8q24. Сравнение генетической последовательности и транскрипта MTSS1_v1 показало, что транскрипт содержит 4 экзона и длинную 5'-нетранслируемую область. Однако белковый продукт этого транскрипта не был выделен и существует вероятность, что MTSS1_v1 не кодирует белок, а является интермедиатом альтернативного сплайсинга. MTSS1_v2 содержит 15 экзонов и кодирует MIM полной длины. MTSS1_v3 отличается от MTSS1_v2 отсутствием экзона 7 длиной 12 нуклеотидов. Экзон 7 находится в области, кодирующей I-BAR домен. Эти 4 аминокислоты должны располагаться в петле между второй и третьей спиралью домена и оказывать незначительное влияние на его структуру.

Loberg в своей работе также исследовал экспрессию MTSS1 в различных тканях. В каждой ткани были найдены 3 описанных выше транскрипта, но их количество различалось. Больше всего было количество транскрипта MTSS1_v1, однако в одном из обзоров отмечалось, что использованные праймеры не могли отличить MTSS1_v1 от MTSS1_v2, т. к. связывались с общими для них участками (Machesky, Johnston, 2007). Интересно, что в нормальной ткани простаты содержание всех трёх транскриптов было в 1000-10000 раз выше, чем в линиях клеток рака простаты.

7.2 Структура и функции MIM. WH2 и I-BAR домены

MIM обладает мультидоменной структурой (рис. 10). На данный момент определены структуры C- и N-концевых доменов, но третичная структура целого белка не известна.

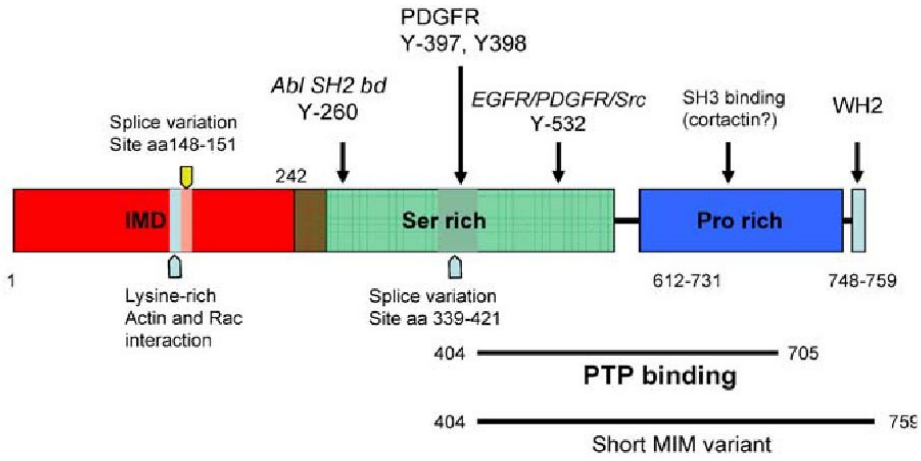


Рисунок 10: Доменная структура белка MIM

Наличие актин-связывающего WH2 (WASP-homology 2) домена предполагает вовлечённость в регуляцию актинового цитоскелета. Однако WH2-содержащие белки могут функционировать по-разному. Некоторые из них, например WASP, активируют Arp2/3-зависимую нуклеацию актиновых филаментов. Другие связывает G-актин или комплексы профилин-актин и вовлекают их в процесс полимеризации, способствуя их присоединению к "+"-концу филамента. Ещё один класс WH2-содераящих белков секвестирует мономеры актина, поддерживая концетрацию свободного G-актина на необходимом уровне (например, β-тимозин). Считается, что эти свойства зависят от аминокислотной последовательности, следующей за WH2 доменом. У белков MIM и IRSp53 рядом с WH2 доменом нет специфических доменов, ответственных за активацию полимеризации. Кристаллическая структура комплекса WH2 домена MIM с G-актином и ДНКазой-1 показала, что WH2 белка MIM обладает большим сходством с WH2 тимозина- β4, чем с WH2 белков WASP (Lee et al., 2007). В опытах in vitro MIM связывал актиновые мономеры, причём афинность к АТФ-G-актину была в 5 раз выше, чем к АДФ-G-актину (Mattila, 2007). Было также показано, что связанные с MIM мономеры АТФ-G-актина могут присоединяться к "+"-концу растущего филамента, но нуклеация филаментов de novo не происходит. Предполагается, что WH2 домен белка MIM не секвестирует актиновые мономеры и не участвует в нуклеации филаментов, а присоединяет MIM к специфическим цитоскелетным структурам (Lee at al., 2007).

N-концевую часть белка MIM занимает I-BAR домен. Некоторые работы указывали на его способность связываться с актиновыми филаментами (Yamagishi et al., 2004;

Millard et al., 2005). Однако позднее было показано, что эта активность скорее всего является артефактом, возникающим из-за агрегации белков при низких солевых концентрациях (75-100 мМ KCl) (Mattila, 2007). Другая активность I-BAR домена — взаимодействие с ГТФазой Rac1 (Bompard et al., 2005; Miki et al., 2000). В этой работе было показано, что гиперэкспрессия MIM в культуре клеток, подвергнутых сывороточному голоданию, вызывала формирование мембранных складок и активацию Rac1. Экспрессия I-BAR домена самого по себе также активировала Rac1, но мембранные складки не образовывались, что, возможно, говорит о необходимости взаимодействия с другими белками для полного ответа. Мутация четырёх лизинов (149, 150, 152 и 153 K на D) приводила к потере способности связывать Rac1.

Как уже было сказано выше, I-BAR домены связываются с отрицательно заряженными липидными мембранами и изгибают их. Гиперэкспрессия целого белка MIM или отдельно I-BAR домена в клетках вызывает усилленное формирование филоподий (Yamagishi et al., 2004; Bompard et al., 2005). В опытах с синтетическими липосомами, содержащими PI(4,5)P2, I-BAR домен вызывал формирование проинкающих внутрь трубок диаметром 78 нм (рис. 11). Количество трубок коррелировало с концентрацией PI(4,5)P2: в отсутствии PI(4,5)P2 трубки практически не образовывались, при 3-5% они были заметны, при 10-30% концентрации их количество было значительным (Mattila et al., 2007)

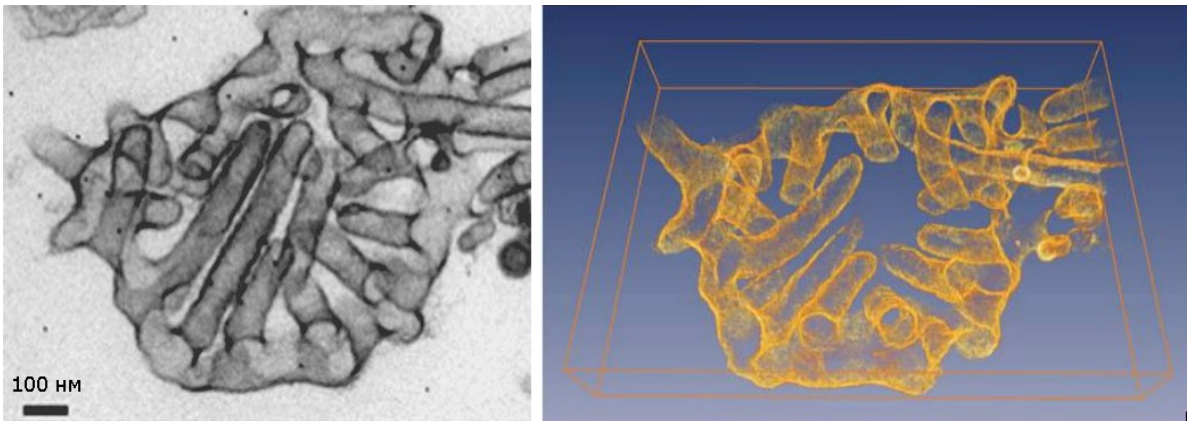


Рисунок 11: I-BAR домен вызывает образование трубчатых структур из PI(4,5)P2-содеражщих липосом. Справа — ЭМ снимок, слева — трёхмерная реконструкция (Mattila et al., 2007)

Сайты связывания PI(4,5)P2 были определены с помощью введения мутаций в I-BAR домен. Было создано 19 мутантов, в каждом из которых от одной до трёх расположенных на поверхности полярных или гидрофобных аминокислот были

заменены на аланин. Способность связывать фосфолипиды определялась с помощью высокоскоростного седиментационного анализа. В результате снижение аффинности к фосфолипиду показали мутанты со следующими заменами:

1. R73A, E74A -6
2. K124A, D125A – 10
3. E129A, K131A, K132A -11
4. K138A, K139A - 12
5. K146A, K149A, K150 -15
6. K152A, K153A, R159A -16
7. L145A, L147A - 14
8. L170A -17
9. D143A -13

Таким образом, сайты связывания PI(4,5)P2 находятся на дистальных участках димера и образованы группой положительно заряженных аминокислот и тремя гидрофобными лейцинами (рис. 12). Это подтвердилось тем, что нейтрализация отрицательного заряда на этом участке (мутация D143A) вызвала увеличение афинности к PI(4,5)P2.

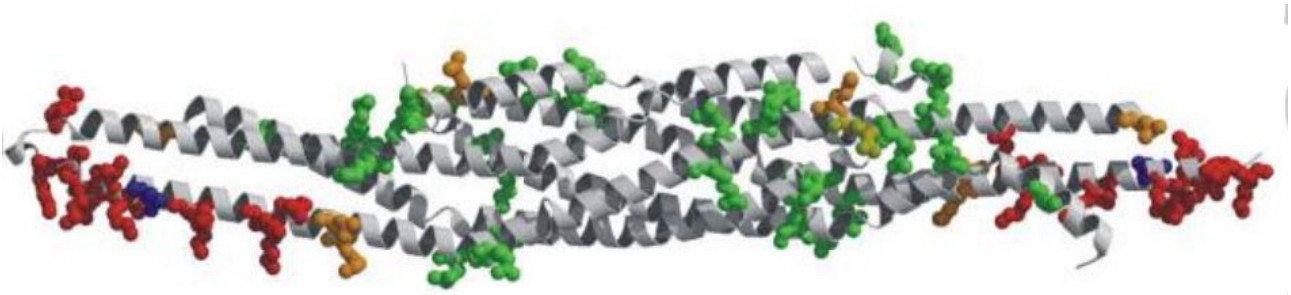


Рисунок 12: Определение сайтов связывания с PI(4,5)P2 на I-BAR домене белка MIM. Красным показаны аминокислоты, замена которых приводила к снижению аффинности; зелёным - аминокислоты, замена которых не влияла на связывание PI(4,5)P2; синим отмечен остаток аспартата, замена которого привела к повышению аффинности.

Глава 2. Материалы и методы

Одним из методов вычислительного эксперимента является метод молекулярной динамики, широко применяющийся в прикладных задачах биотехнологии, биоинженерии, нанотехнологии, фармакологии и др.

1 Физические основы метода молекулярной динамики

В основе метода модельное представление о многоатомной молекулярной системе, в которой все атомы представляют собой материальные точки. Поведение отдельного атома описывается классическими уравнениями движения и имеет вид:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} = \vec{F}_i \qquad (1)$$

i – номер атома ($1 \le i \le n$), n – полное число атомов в системе, m_i - масса атома, $\mathbf{r_i}$– радиус-вектор атома, $\mathbf{F_i}$– равнодействующая сил, действующих на атом.

Равнодействующая сила складывается из двух составляющих:

$$\vec{F}_i = -\frac{\partial U(\vec{r}_1,\ldots,\vec{r}_n)}{\partial \vec{r}_i} + \vec{F}_i^{ex} \qquad (2)$$

U – потенциальная энергия системы, $\mathbf{F_i^{ex}}$– сила, определяемая взаимодействиями с молекулами среды.

Первая составляющая – сила, действующая на данный атом со стороны всех остальных атомов. Взаимодействие между атомами является потенциальным, и поэтому первая сила записана как градиент потенциальной энергии системы. Потенциальную энергию системы можно представить в виде суммы вкладов от различных типов взаимодействий между атомами:

$$U = U_b + U_\nu + U_\varphi + U_f + U_{qq} + U_{VW} + U_{Hb} \qquad (3)$$

U_b – потенциальная энергия валентных связей (4), U_v – валентных углов (5), U_φ – торсионных углов, U_f– плоских групп и псевдоторсионных углов (6), U_{qq} – кулоновских сил (7), U_{vw} – взаимодействий Ван-дер-Ваальса (8), U_{Hb} – водородных

связей (9).

Для каждого типа взаимодействий вводится свой феноменологический закон.

Энергия валентных взаимодействий и энергия колебаний валентных углов описывается параболическими потенциалами (4), (5).

$$U_b(r) = \frac{1}{2}\sum_{i=1}^{N_b} K_{b,i}(r_i - r_{o,i})^2 \quad (4)$$

$K_{b,i}$ – эффективная жёсткость валентной связи, i – номер связи в молекуле, N_b – полное число валентных связей, r_i – длина связи, $r_{o,i}$ – равновесная длина связи.

$$U_v(\alpha) = \frac{1}{2}\sum_{i=1}^{N_v} K_{v,i}(\alpha_i - \alpha_{o,i})^2 \quad (5)$$

$K_{v,i}$ – эффективная упругость валентного угла, i – номер валентного угла, N_v – полное число валентных углов, α_i – значение валентного угла, $\alpha_{o,i}$ – его равновесное значение.

Замена реального потенциала, описывающего валентные взаимодействия, на параболический оправдана тем, что при комнатных температурах колебания валентных связей малы. В то же время, в ряде задач необходимо проводить модельные расчёты при высоких температурах, и тогда использование параболического потенциала не приводит к разрыву валентных связей.

Потенциальная энергия для торсионных углов, плоских групп и псевдоторсионных углов задается общим выражением (6), представляющим собой ряд Фурье. Было установлено, что во всех случаях достаточно оставлять не более четырёх членов ряда (включая нулевой).

$$U_\varphi(\alpha) = \frac{1}{2}\sum_{\varphi=1}^{\Phi}\sum_{l=1}^{L} K_{\varphi,l}\left[1 + g_{\varphi,l}\cos(n_{\varphi,l}\alpha_\varphi)\right] \quad (6)$$

$K_{\varphi,l}$ – константа, φ – номер торсионного угла, l – номер гармоники, $g_{\varphi,l}$ – вклад гармоники в потенциал торсионного угла ($-1 < g_{\varphi,l} < 1$), $n_{\varphi,l}$ – кратность гармоники. Потенциалы U_f и U_φ отличаются константами.

Потенциальная энергия взаимодействия заряженных атомов характеризуется

электростатическим потенциалом:

$$U_{qq}(\vec{r}_i,\vec{r}_j)=\sum_{i\neq j}\frac{q_i q_j}{\varepsilon r_{i,j}} \tag{7}$$

$\mathbf{r_i}$, $\mathbf{r_j}$ – координаты взаимодействующих атомов, qi, qj – их парциальные заряды, ε – диэлектрическая проницаемость среды (для вакуума ε = 1), .

Взаимодействие между атомами, не связанными валентной связью, описываются с помощью потенциала Леннард-Джонса (8)

$$U_{VW}(\vec{r}_i,\vec{r}_j)=\sum_{i\neq j}\left[\frac{A}{r_{i,j}^{12}}-\frac{B}{r_{i,j}^{6}}\right] \tag{8}$$

A и B – константы, определяющие глубину потенциальной ямы и расположение её минимума, $r_{i,j}=|\mathbf{r_i}-\mathbf{r_j}|$, где r_i, r_j – координаты взаимодействующих атомов.

2 Расчёт координат атомов. Численное интегрирование

Существуют различные численные методы решения системы классических уравнений движения. В молекулярной динамике широко используется метод Верле, являющийся компромиссом между точностью процедуры и скоростью её реализации:

Силы, действующие на атом, находятся как производные потенциальной энергии:

$$\vec{F}_i=-\vec{\nabla}_i\sum_j u(r_{ij}) \tag{9}$$

Затем рассчитываются новые координаты атомов, из которых определяются равнодействующие силы:

$$\vec{r}_i\left(t+\Delta t\right)=\vec{r}_i(t)+\vec{v}_i(t)\Delta t+\frac{a_i(t)}{2}\Delta t^2 \tag{10}$$

Здесь a – ускорение, $a(t+\Delta t)=F(t+\Delta t)/m$.

Далее определяются скорости атомов:

$$v(t+\Delta t)=v(t)+\left(\frac{a(t+\Delta t)+a(t)}{2}\right)\Delta t \tag{11}$$

Одной из наиболее существенных проблем процедуры интегрирования является выбор шага. При большом шаге погрешности интегрирования могут быть значительными, что приведёт к нестабильности траектории. При малом шаге существенно увеличивается время расчёта. В уравнениях движения, описывающих изменения по различным степеням свободы, временные характеристики существенно отличаются друг от друга. Для достаточно точного вычисления решения по быстрым и медленным переменным шаги интегрирования по ним могут различаться. По быстрым переменным может быть выбран значительно больший шаг. В методе Верле шаг интегрирования берётся единым, оптимальным считается шаг 1- 1,5 фс, что является примерно десятой частью периода самых быстрых молекулярных колебаний.

Начальные скорости атомов выбираются с помощью генератора случайных чисел в соответствии с распределением Максвелла при заданной температуре.

3 Температура и термостаты

В реальных экспериментах интересующие нас молекулы обычно находятся в растворах и активно взаимодействуют с молекулами растворителя. Температура системы поддерживается за счёт энергообмена с внешней средой. Детальный учёт взаимодействия молекулы с внешней средой часто невозможен. Для учёта эффектов энергообмена с внешней средой используются специальные алгоритмы – термостаты.

В молекулярной динамике температура молекулярной системы вводится через удельное среднее значение кинетической энергии. Выражение для средней кинетической энергии системы имеет вид:

$$E = \frac{\sum_{n=1}^{N} m_n v_n^2}{2N} \tag{12}$$

m – молекулярная масса атома, v – скорость атома, N – полное число атомов.

Из статистической физики известно, что кинетическая энергия системы и ее температура связаны следующим соотношением:

$$E = \frac{3k_B T}{2} \tag{13}$$

$k_Б$ – постоянная Больцмана.

Из (12) и (13) получаем мгновенное значение "температуры":

$$T = \frac{\sum_{n=1}^{N} m_n v_n^2}{3Nk_Б} \tag{14}$$

Далее, проведя усреднение по времени, получим значение температуры в молекулярно-динамическом эксперименте:

$$\bar{T} = \frac{1}{3Nk_Б\tau} \int_{t_0}^{t_0+\tau} \sum_{n=1}^{N} m_n v_n^2 \, dt \tag{15}$$

Часто, для того чтобы ускорить сканирование репрезентативной точкой конфигурационного пространства расчёты проводятся при относительно высоких температурах.

Использование термостата особенно важно на этапе релаксации системы. В случае установившегося термодинамического равновесия температура термостата и средняя температура молекулярной системы должны совпадать. Энергии подсистем обычно много меньше энергии термостата, это является условием практического равновесия. При изучении молекулярной динамики обычно фиксируют температуру термостата. Температура молекулярной системы может при этом меняться вследствие различных причин. Например, из-за конечного шага интегрирования частица может оказаться в классически запрещённой области. Это приведет к резкому скачку энергии, а затем и температуры.

3.1 Термостат Берендсена.

Алгоритм Берендсена основан на введении знакопеременного трения. Отклонения температуры (T) от её равновесного значения (T_0) корректируются согласно уравнению Ландау-Теллера:

$$\frac{dT(t)}{dt} = \frac{T_0 - T(t)}{\tau} \tag{16}$$

T(t) – текущее значение температуры.

Отклонения в значении температуры экспоненциально убывают с характерным временем τ. Изменение кинетической энергии моделируется путем перемасштабирования скоростей атомов молекулярной системы на каждом шаге:

$$\lambda = \sqrt{1 + \frac{\Delta t}{\tau_1}\left(\frac{T_0}{T(t - \frac{\Delta t}{2})} - 1\right)} \tag{17}$$

λ – коэффициент пересчёта скоростей, τ_1 – постоянная времени порядка 1 пс.

Известно, что использование термостата Берендсена, особенно для относительно небольших систем и на длинных траекториях, приводит к физически некорректным результатам, связанным с неравномерным распределением энергии по степеням свободы.

3.2 Коллизионный (столкновительный) термостат

В этой модели термостата вводится среда виртуальных частиц, взаимодействующих с частицами изучаемой молекулярной системы [8,9]. Столкновения происходят по закону упругих шаров. Варьируя массу виртуальных частиц и частоту столкновений с атомами системы, добиваются наилучшего совпадения с экспериментальными данными. При расчёте в вакууме обычно задают массу виртуальных частиц 18 а.е.м, а частоту столкновений 55–60 пс–1. Такая среда по вязкостным свойствам близка к воде при н.у.

Температура термостата определяет функцию распределения виртуальных частиц по скоростям:

$$f(v) = \left(\frac{m}{2\pi kT}\right)^{3/2} v^2 \exp\left(-\frac{mv^2}{2kT}\right) \tag{18}$$

f(v) – функция распределения вероятности виртуальных частиц по скоростям (f(v)dv – вероятность того, что абсолютная величина скорости виртуальной частицы находится в интервале от v до v+dv), m – масса виртуальной частицы, k – константа Больцмана,

T – температура термостата.

Частота столкновений задаётся распределением Пуассона:

$$p(r) = \left(\frac{\xi t}{r!}\right)^r e^{-\xi t} \tag{19}$$

p(r) – вероятность того, что за промежуток времени (0,t) произойдет r столкновений, ξ – частота столкновений.

4 Поддержание постоянного давления

Наиболее распространёнными баростатами являются баростаты Берендсена и Парринелло-Рамана.

Тензор давления P может быть вычислен с помощью вириальной теоремы Клаузиуса как

$$\mathbf{P} = \frac{2}{V}(\mathbf{E}_{kin} - \Xi) \tag{20}$$

где V — объём ячейки, E_{kin} — кинетическая энергия системы, а вириал рассчитывается как

$$\Xi = -\frac{1}{2}\sum_{i<j} r_{ij} \cdot F_{ij} \tag{21}$$

Баростат Берендсена в конце каждого шага пересчитывает координаты и линейные размеры ячейки, чтобы привести систему к заданному давлению P_0:

$$x' = x - \frac{\Delta t}{3\tau}\beta\left(P_0 - P(t)\right) \tag{22}$$

где бета — сжимаемость, т — коэффициент баростатирования, P_0 — заданное давление, P(t) — текущее давление.

Баростта Парринелло-Рамана допускает изменение не только объёма вычислительной ячейки, но и её формы.

5 Метод крупнозернистой (coarse-grained) молекулярной динамики

Одной из главных проблем вычислительного эксперимента является ограниченность доступного времени расчёта и размера системы. Одним из методов решения проблемы является менее детализированное ("крупнозернистое") представление системы. Это значительно уменьшает затрачиваемые на вычисления ресурсы и позволяет на порядки увеличить времена расчёта и размеры системы. В зависимости от параметров конкретной системы и допустимой степени детализации, можно использовать разные подходы к созданию крупнозернистой модели.

5.1 Создание крупнозернистой модели на основе формы (shape-based coarse graining)

Этот подход был разработан для моделирования крупномасштабных движений макромолекулярных комплексов (Arkhipov, Freddolino, Schulten, 2006). Белки и другие биомолекулы представляются как можно меньшим числом зёрен. Обычно молекула белка состоит из компактных доменов и неупорядоченных участков цепи. Данный метод позволяет с одинаковой точностью моделировать и домены и неупорядоченные участки, сохраняя вторичную структуру белка.

Одно зерно обладает массой и зарядом входящих в его состав частиц. Взаимодействие вязанных зёрен описывается гармоническим потенциалом, а несвязанных — потенциалами Ленарда-Джонса и Кулона. Молекулы растворителя задаются неявно, с использованием уравнения Ланжевена. Параметризация проводится на основе полноатомных вычислений и экспериментальных данных.

Этот подход применяется и для липидов (Arkhipov, Yin, Schulten, 2008). Один крупнозернистый липид состоит из двух зёрен: одно зерно — полярные головки нескольких липидов, другое — липидные хвосты (рис. 13). Эта модель успешно передаёт такие характеристики липидного бислоя как толщина, площадь на один липид и жёсткость.

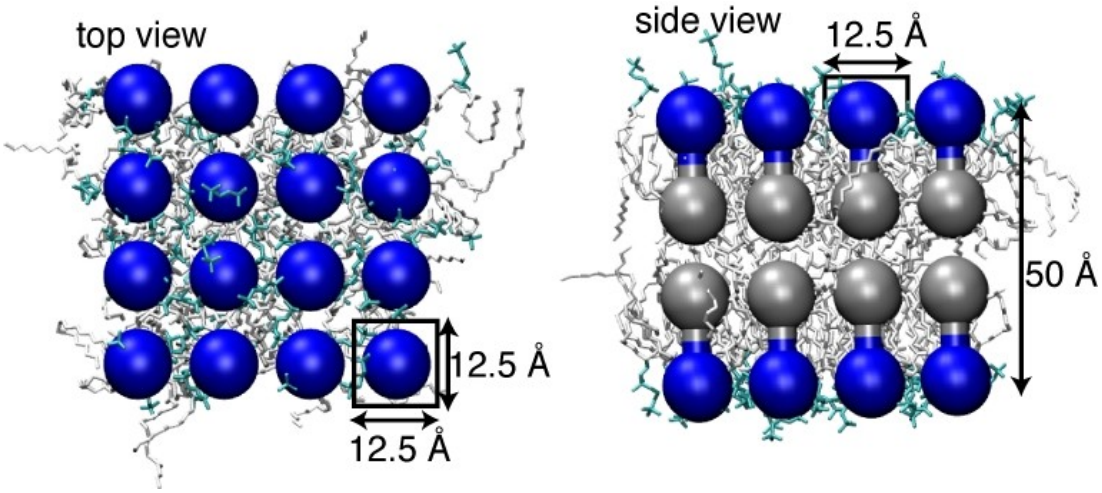


Рисунок 13: Крупнозернистое представление липидного бислоя

5.2 Создание крупнозернистой модели на основе остатков (residue-based coarse graining)

Изначально этот подход был разработан для липидов (Marrink et al., 2004), а затем адаптирован и для белков. Группа размером порядка 10 атомов (включая атомы водорода) представляется как одно зерно; 4 молекулы воды становятся одним "водным" зерном; ион вместе со своей гидратной оболочкой становится "ионным" зерном. Молекула липида представляется несколькими зёрнами, а остаток аминокислоты двумя (один для основной цепи белка и один для боковой цепи). Взаимодействия между зёрнами описываются теми же уравнениями, что и в полноатомной системе. Значения углов и длины связей получаются из усреднённых значений для полноатомной структуры. На рис. 14 показан общий вид полипептида в данном представлении.

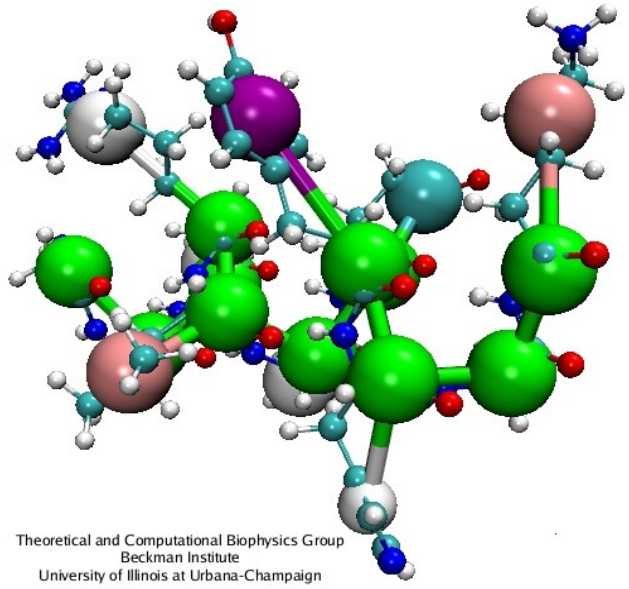


Рисунок 14: Полипептидная цепь в крупнозернистом представлении

Глава 3. Исследование взаимодействия I-BAR домена белка MIM с отрицательно заряженной липидной мембраной

1 Цели и задачи

Целью данной работы было исследование взаимодействия димеризованного I-BAR домена белка MIM с отрицательно заряженной липидной мембраной методом крупнозернистой молекулярной динамики. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Расчёт молекулярной динамики двух систем "мембрана — димер", отличающихся ориентацией димера (длина траектории — 500 нс);
2. Расчёт молекулярной динамики мембраны без белка (500 нс);
3. Расчёт молекулярной динамики системы "мембрана — N-концевой пептид" (500 нс);
4. Анализ результатов.

2 Сборка систем и постановка расчётов

Модельные липидные бислои, состоящие из 448 молекул фосфатидилхолинлипидов, были собраны в программе Bilayer. Состав бислоёв: 80% POPC (пальмитоил-олеил-фосфатидилхолин) и 20% PIP(4,5)PC (фосфоинозитид (4,5) фосфатидилхолин) (рис. 15). Такое процентное соотношение липидов было выбрано в соответствии с результатами экспериментов с синтетическими липосомами (Mattila et al., 2007).

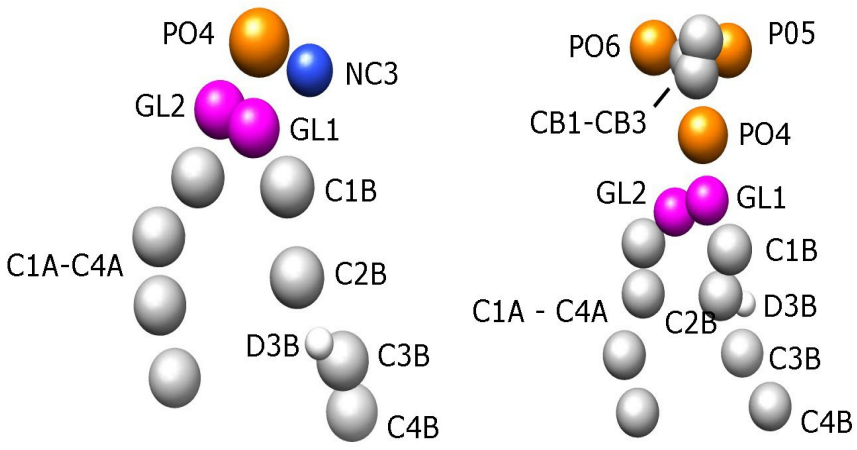


Рисунок 15: Крупнозернистое представление липидов POPC (слева) и PIP(4,5)PC (справа).

Структура димеризованного I-BAR домена была взята из базы Protein Data Bank (код 2D1L). Далее при помощи программы Gromacs 3.3.1 из неё была получена крупнозернистая модель (рис. 16).

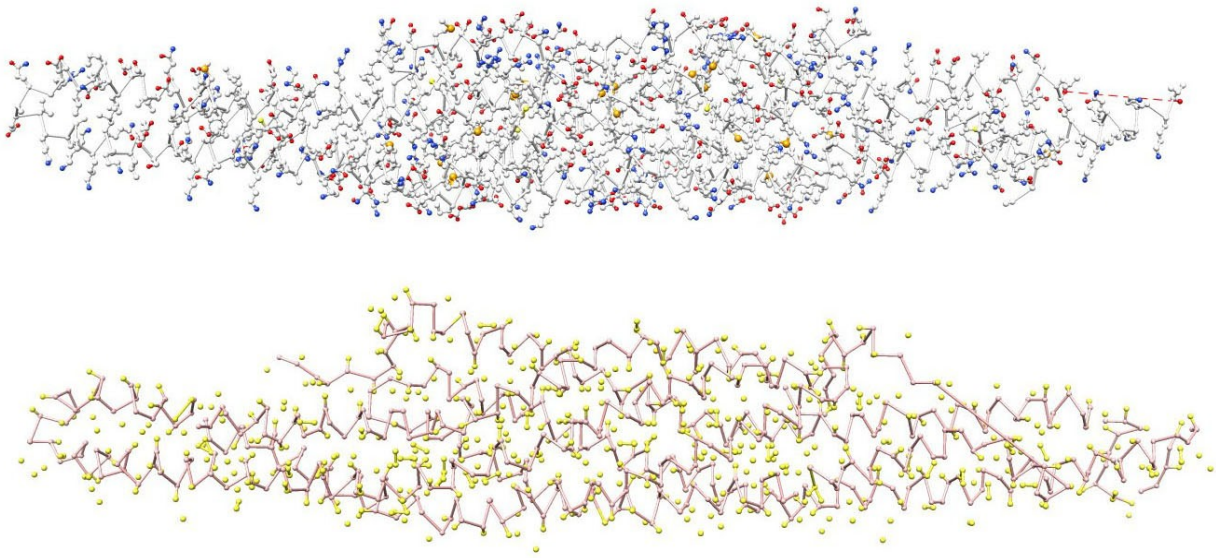


Рисунок 16: Структура I-BAR домена белка MIM из базы Protein Data Bank (сверху) и её крупнозернистое представление (снизу)

С помощью программы Chimera крупнозернистая модель была помещена над поверхностью мембраны на расстоянии 0,5 нм в двух положениях: 1) С-концы димера направлены от мембраны и 2) С-концы направлены к мембране (рис. 17).

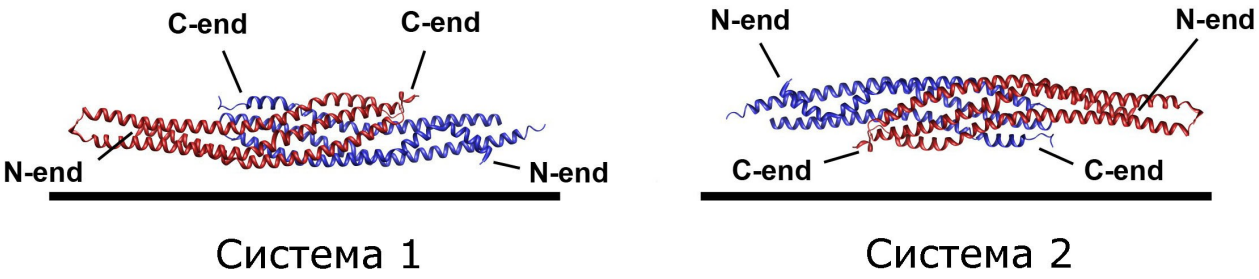


Рисунок 17: Системы "мембрана-димер", различающиеся ориентацией димера.

Из полученной крупнозернистой модели I-BAR домена был взят N-концевой пептид длиной 50 ак и расположен над липидным бислоем, состоящим из 50 молекул POPC и 202 молекул PIP(4,5)PC. Ко всем системам были добавлены молекулы воды и ионы Na^+ для нейтрализации отрицательно заряда.

Расчёты проводились в пакете Gromacs 3.3.1 с силовым полем MARTINI. Протокол молекулярной динамики приведён в таблице 1. Визуализация результатов проводилась

с использованием программ VMD (http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd) и Chimera (http://www.cgl.ucsf.edu/chimera), графики строились в программе Scilab (http://www.scilab.org).

Потенциальное поле	MARTINI
Тип интегратора	Молекулярная динамика
Шаг интегрирования	10 фс
Шаг записи в траекторный файл	10 пс
Длина траектории	500 нс
Термостат	Берендсена
Температура термостата	325 К
Баростат	Берендсена
Давление баростата	1 бар
Постоянная баростатирования	0,2 пс
Радиус обрезания кулоновских взаимодействий	1,2 нм
Радиус обрезания взаимодействий Ван-дер-Ваальса	1,2 нм

Таблица 1: Протокол молекулярной динамики

3 Результаты и обсуждение

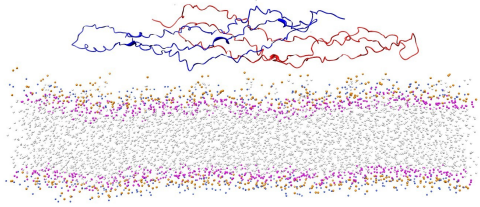
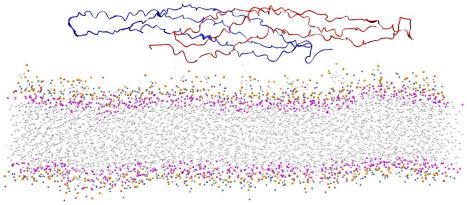
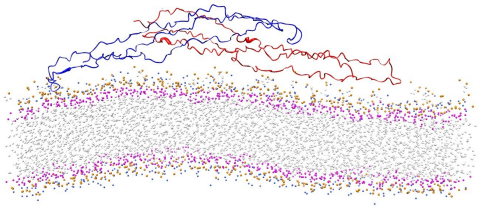
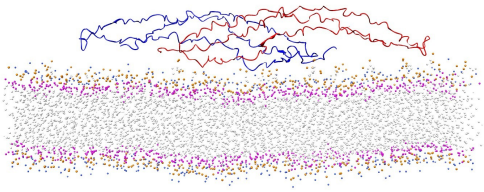
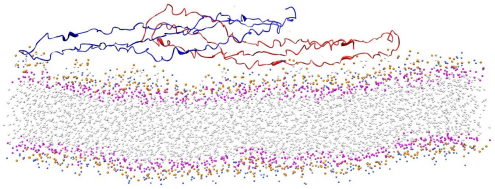
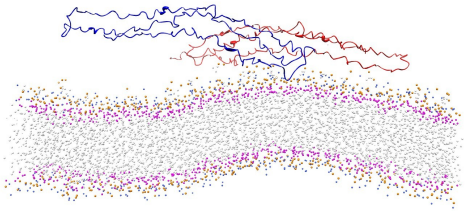
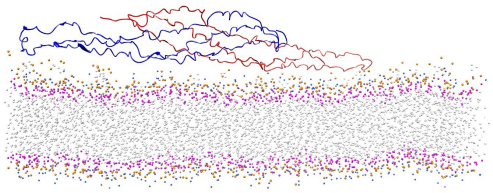
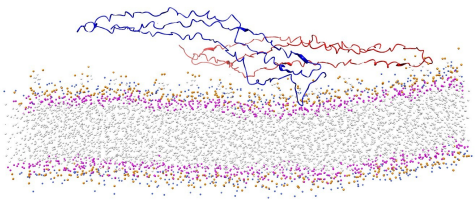
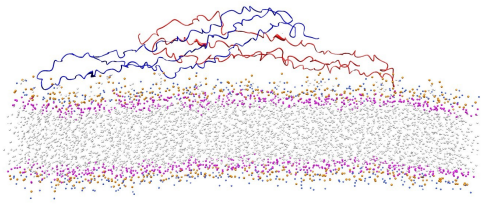
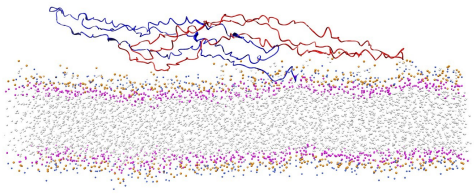
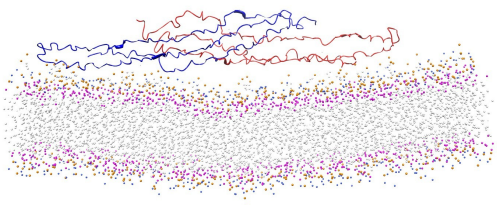
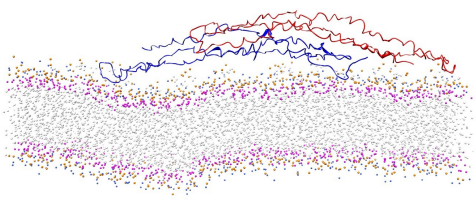
3.1 Системы "мембрана — димер"

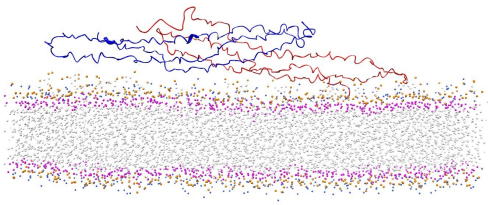
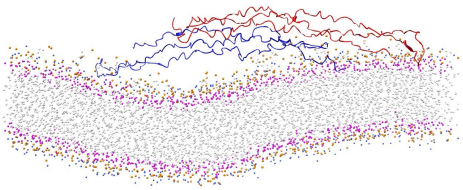
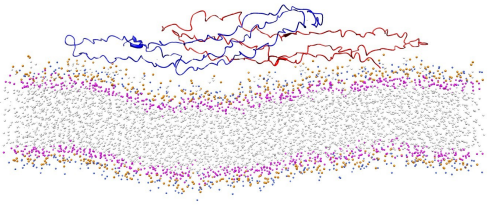
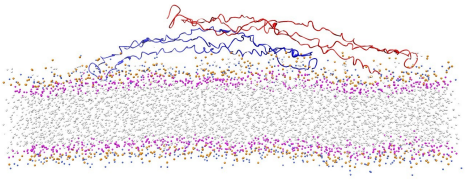
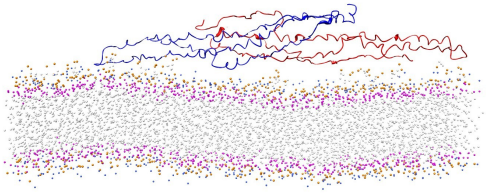
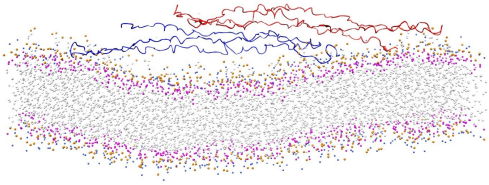
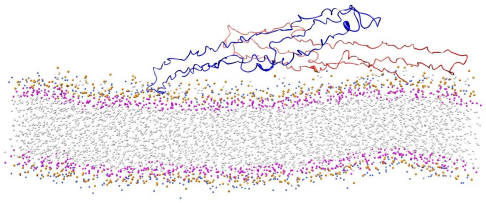
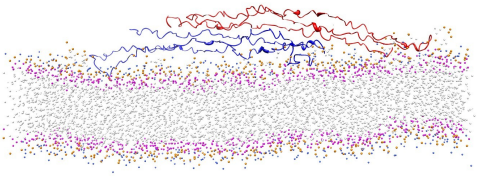
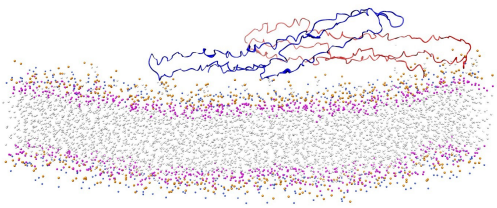
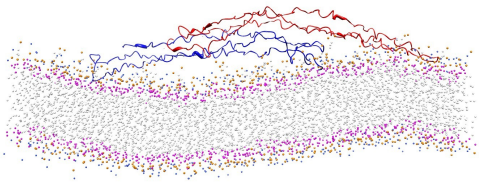
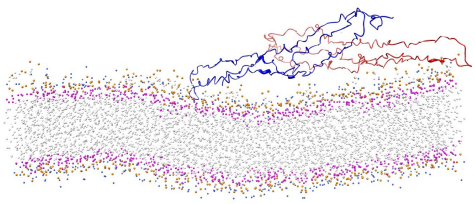
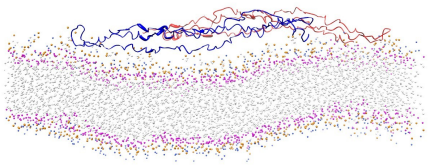
Результаты проведения динамики проиллюстрированы в таблице 2. Взаимодействие I-BAR домена с мембраной в системе 1 (С-концы от мембраны) наблюдалось уже через 10 нс после начала проведения динамики: дистальный конец приблизился к липидным головкам. На протяжении всего последующего времени в первой системе с мембраной взаимодействовали в основном дистальные участки димера. Это согласуется с экспериментальными данными о том, что там находятся сайты связывания с $PI(4,5)P_2$. К мембране также иногда приближался N-конец одного домена, но в мембрану не встраивался. Изгиб мембраны преимущественно был отрицательным, но нестабильным. Возможно это означает, что для образования стабильных изгибов необходимо взаимодействие нескольких димеров. Это подтверждается исследованиями, показавшими, что в искусственной системе *in vitro* F-BAR домены

образуют сплошной цилиндр вокруг липидной тубулы только при взаимодействии друг с другом (Frost et al., 2008; Shimada et al., 2007).

Во второй системе (C-концы к мембране) через 25 нс с мембраной начал взаимодействовать C-конец одного из доменов. Через 45 нс к ней приблизился N-конец другого домена. Далее димер постепенно поворачивался вокруг своей оси и через 150 нс повернулся примерно на 90 градусов, в результате чего один I-BAR домен оказался над другим. С мембраной, как и в первой системе, взаимодействовали дистальные участки димера и N-конец одного домена (находящегося сверху), но кроме этого наблюдалось связывание с мембраной C-концевого участка другого домена. Это может быть обусловлено наличием на C-конце положительно заряженных остатков гистидина и лизина и удобным для взаимодействия пространственным расположением, но в случае целого белка MIM взаимодействие этого участка белка с мембраной представляется маловероятным.

Таким образом, с мембраной в основном взаимодействуют дистальные и N-концевые участки I-BAR доменов и эти взаимодействия носят электростатический характер.

Время, нс	Система 1	Система 2	Время, нс
0			0
10			10
27			25
50			45
100			85
143			150

200			165
210			200
235			235
275			275
295			300
356			350

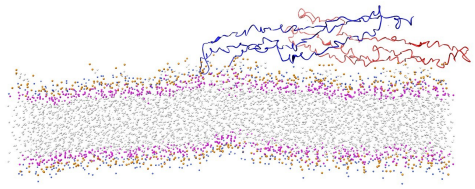
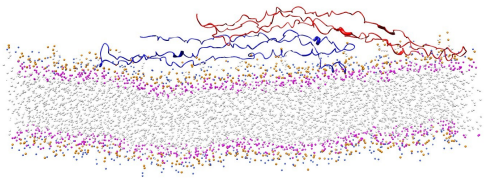
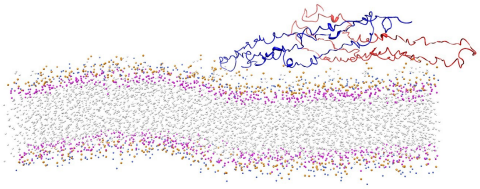
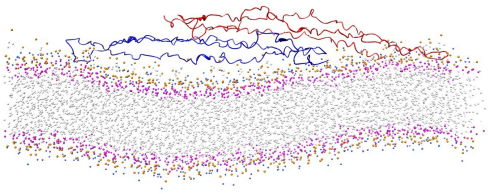
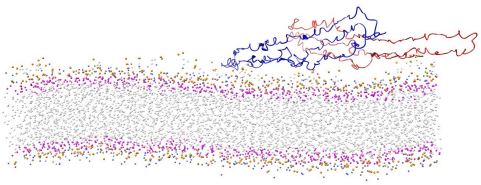
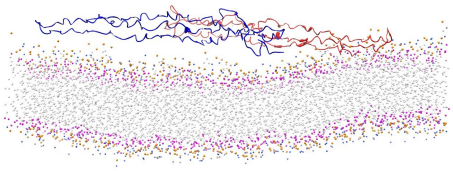
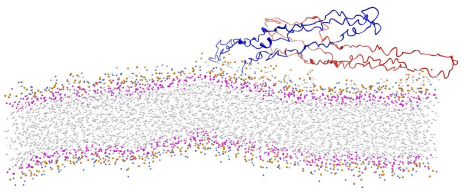
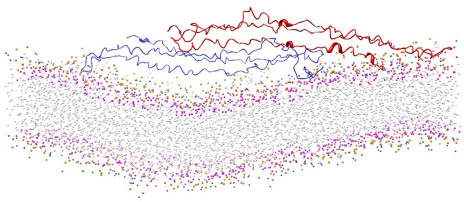
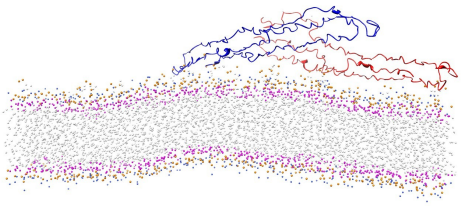
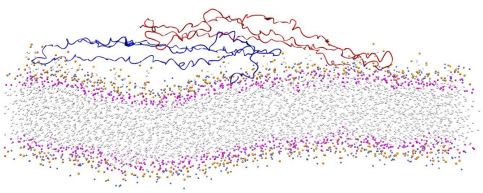
375			375
400			400
425			425
457			450
500			500

Таблица 2: Взаимодействие димеризованного I-BAR домена в двух положениях с отрицательно заряженной липидной мембраной. Мономеры обозначены красным и синим цветом.

3.2 Аминокислотные остатки, взаимодействующие с мембраной

На основе результатов молекулярной динамики был проведён сравнительный анализ аминокислот, взаимодействующих с заряженной мембраной в системе 1 (табл. 3).

		Заряженные аминокислоты, взаимодействующие с заряженной мембраной в системе 1								
I-BAR моно-мер	Аминокислоты, идентифицированные по данным литературы (Mattila et al., 2007)	10 нс	100 нс	143нс	210 нс	295 нс	356 нс	400 нс	457 нс	500 нс
1	73R 74E 124K 125D 129E 131K 132K 138K 145L 146K 147L 149K 150K 152K 153K 159R 170L	31E 143D 145L 146K 147L 149K 150K 152K 153K 155D 159R 161D	31E 131K 132K 134R 136E 138K 140K 143D 145L 146K 147L 149K 150K 152K 153K 155D 159R	31E 131K 132K 134R 136E 138K 140K 143D 145L 146K 147L 149K 150K 152K 153K 155D	131K 132K 134R 136E 138K 140K 143D 145L 146K 147L 149K 150K 152K 153K 155D	140K 143D 145L 146K 147L 149K 150K 152K 153K 155D	131K 132K 134R 136E 138K 140K 143D 145L 146K 147L 149K 150K 152K 153K 155D 159R	2E 31E 32D 36K 39K 40L 140K 143D 145L 146K 147L 149K 150K 152K 153K 155D 159R 161D	2E 6E 7K 8E 12L 15L 145L 146K 147L 149K 150K 152K 153K 155D 159R	2E 138K 140K 143D 145L 146K 147L 149K 150K 152K 153K 155D 159R 161D
2	 323R 324E 374K 375D 379E 381K 382K 388K 395L 396K 397L 399K 400K 402K 403K 409R 420L	360E 363E 364E 366K 367K 372L 373D 374K 375D 378K 379E	378K 379E 381K 382K 384R 386E 388K 390K 393D 395L 396K 397L 399K 400K 402K 403K 405D	252E 256E 257K 258E	252E 256E 257K 258E	252E 256E 257K 258E 386E 388K 390K 393D 395L 396K 397L 399K 400K 402K 403K 405D 409R	386E 388K 390K 393D 395L 396K 397L 399K 400K 402K 403K 405D 409R	252E 256E 257K 258E 386E 388K 390K 393D 395L 396K 397L 399K 400K 402K 403K	374K 375D 378K 379E 381K 382K 384R 386E 388K 390K 393D 395L 396K 397L 399K 400K 402K 403K 405D	360E 363E 364E 366K 367K 372L 373D 374K 375D 378K 379E 381K 382K 384R 386E 388K 390K 393D 395L 396K 397L 399K 400K 402K 403K 405D

Таблица 3: Аминокислотные остатки, взаимодействующие с мембраной в системе 1

Красным цветом выделены аминокислоты, совпадающие с идентифицированными в опытах по связыванию PI(4,5)P_2-липидов мономерами I-BAR (Mattila et al., 2007). Как видно из таблицы, на протяжении всей динамики с мембраной в основном взаимодействуют остатки 145L, 146K, 147L, 149K, 150K, 152K, 153K, расположенные на дистальных участках димера.

3.3 Расчёт зависимости кривизны мембраны от времени

Для оценки воздействия I-BAR домена на мембрану строился график зависимости кривизны мембраны от времени для систем "мембрана-димер" и "мембрана без белка". Кривизна мембраны вычислялась следующим образом (рис. 18).

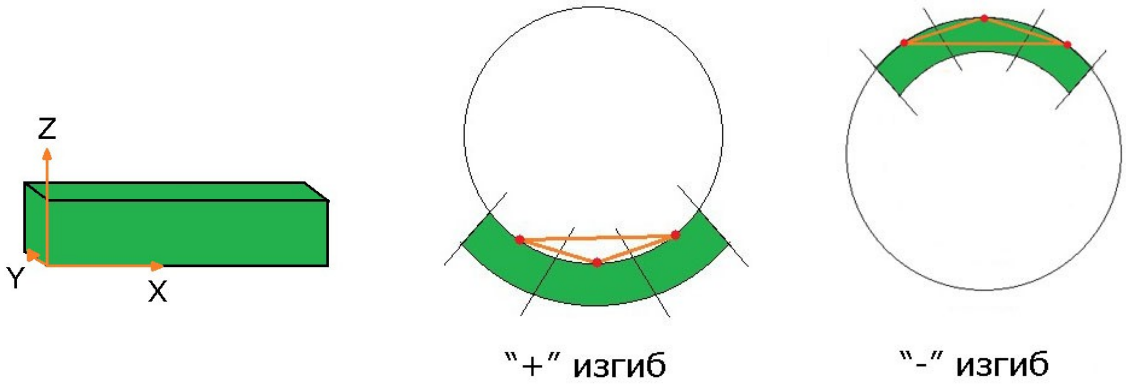


Рисунок 18: Схема вычисления кривизны мембраны

Мембрана разбивалась на 3 равных сегмента и в каждом сегменте для фосфатных групп фосфолипидов (атомов PO4) верхнего монослоя производилось усреднение координат по X (ось, параллельная плоскости мембраны) и по Z (ось, перпендикулярная плоскости мембраны). В результате получались 3 точки с координатами (x, z), вокруг которых описывалась окружность. Кривизна мембраны рассчитывалась как обратный радиус этой окружности со знаком "+" или "-" в зависимости от направления изгиба. Алгоритм расчёта приведён в приложении 1. Графики строились в программе Scilab.

На рис. 19 приведены полученные графики зависимости кривизны мембраны от времени.

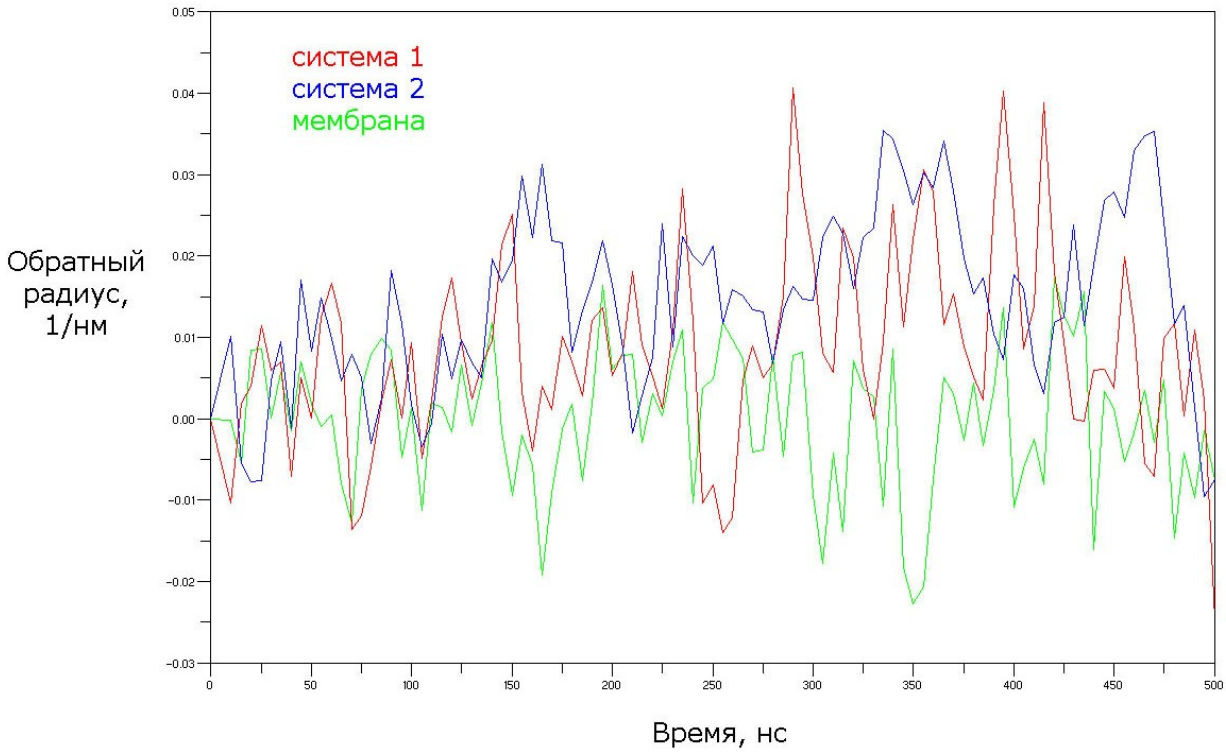


Рисунок 19: Зависимость кривизны мембраны (обратного радиуса изгиба) от времени для системы 1 (С-концы вверх), системы 2 (С-концы вниз) и мембраны без белка.

Из графиков видно, что в отсутствии белка кривизна мембраны флуктуирует в диапазоне от -0,02 до +0,02 $нм^{-1}$. При наличии белка кривизна мембраны преимущественно положительна и достигает наибольших значений на промежутке от 275 нс до 425 нс. Значения кривизны на этом этапе приведены на диаграмме (рис. 20). Им соответствуют средние радиусы 58 нм, 52 нм и 505 нм для системы 1, системы 2 и мембраны соответственно.

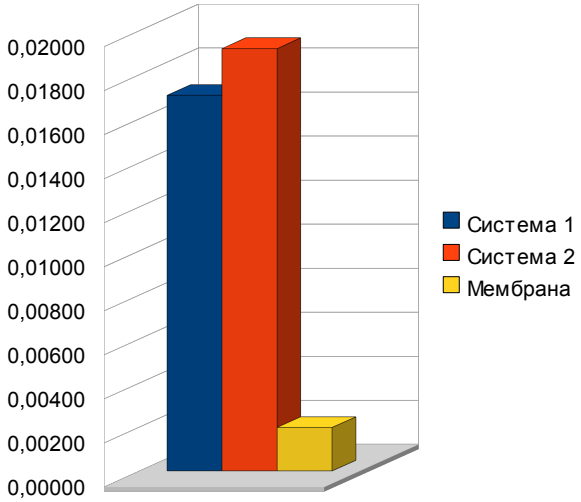


Рисунок 20: Средние значения кривизны мембраны на промежутке от 275 до 425 нс.

3.4 Система "мембрана — N-концевой пептид"

По некоторым данным димеризованный I-BAR домен белка MIM для стабилизации своего положения в мембране заякоривается в неё N-концами. В ходе молекулярной динамики систем "мембрана - I-BAR димер" N-конец взаимодействовал с мембраной, но встраивания его не происходило. Для оценки способности I-BAR домена встраиваться в мембрану был проведён расчёт молекулярной динамики системы из отрицательно заряженного липидного бислоя и N-концевого пептида белка MIM длиной 50 аминокислотных остатков. Однако самопроизвольного проникновения пептида в бислой также не наблюдалось: через 50 нс он полностью погрузился в область липидных головок и оставался там все последующие 450 нс (рис. 21).

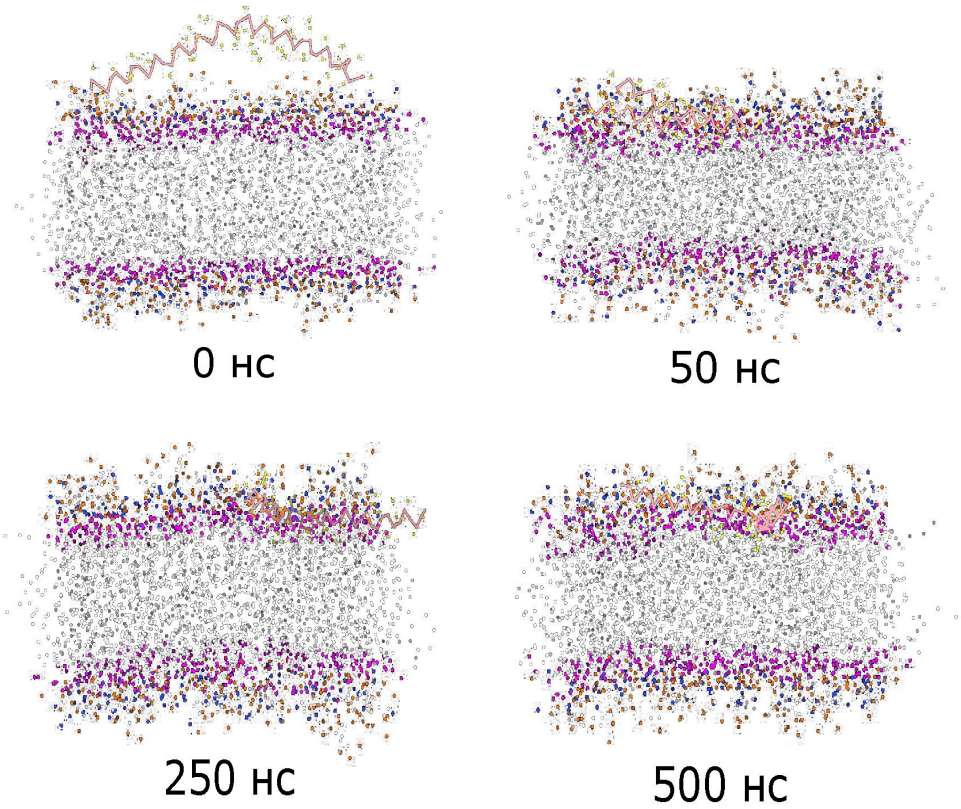


Рисунок 21: Взаимодействие N-концевого пептида (50 ак) белка MIM с отрицательно заряженной липидной мембраной

В таблице 4 приведено сравнение N-концевых аминокислот белка MIM и эндофилина, для которого было экспериментально показано, что N-концевая амфипатическая спираль способна встраиваться в мембрану (Gallop et al., 2006). Аминокислотная последовательность эндофилина была взята из базы Uniprot (код Q99962). Красным

цветом выделены гидрофобные аминокислоты (A, V, L, I, F, M, V, P), чёрным — гидрофильные неполярные (G, S, T, Y, N, Q, C), голубым — гидрофильные отрицательно заряженные (E, D) и сиреневым — гидрофильные положительно заряженные (K, R, H).

	№ 1-11	№ 12-50
MIM	MEAVIEKECSA 5 2 1 3	LGGLFQTIISDMKGSYPVWEDFINKAGKLQSQLRTTVVA
Эндофилин	MSVAGLKKQFH 5 3 3 0	KATQKVSEKVGGAEGTKLDDDFKEMERKVDVTSRAVMEI

Таблица 4: Сравнение N-концевых аминокислотных остатков белков MIM и эндофилина

Из таблицы 4 следует, что для обоих белков соотношение гидрофильных и гидрофобных аминокислот на N-концевом участке равно примерно 1:1. Однако у MIM там имеются 3 отрицательно заряженных аминокислоты, а у эндофилина 3 положительно заряженных. Так как в мембране присутствуют отрицательно заряженные липиды, то это может способствовать проникновению N-концевого участка эндофилина и затруднять проникновение N-концевого участка MIM. Последнему, возможно, для встраивания в мембрану необходимы дополнительные силы или локальные изменения в её структуре.

Выводы

1. Взаимодействие димеризованного I-BAR домена белка MIM с мембраной наблюдалось уже через 10 нс после начала проведения динамики.
2. Взаимодействия носят электростатический характер. Положение белка стабилизовано взаимодействием с мембраной положительно заряженных аминокислотных остатков, расположенных на дистальных участках димера (145L, 146K, 147L, 149K, 150K, 152K, 153K).
3. I-BAR домен, изначально ориентированный C-концами к мембране, в ходе динамики поворачивался вокруг своей оси на 90^{o} и также взаимодействовал с мембраной дистальными участками.
4. Возникающие изгибы мембраны нестабильны, что свидетельствует о необходимости взаимодействия нескольких димеров для образования стабильных инвагинаций.
5. В системах с белком мембрана изгибается преимущественно в одну сторону, а средние радиусы изгиба составляют 58 и 52 нм. В отсутствии белка изгиб мембраны происходит в обе стороны с равной вероятностью и средний радиус составляет более 500 нм.
6. Не наблюдалось самопроизвольного проникновения N-концевого пептида белка MIM в мембрану. Возможно для этого необходимы дополнительные силы или локальные изменения в структуре мембраны.

Приложение 1. Скрипт для расчёта кривизны мембраны

```
import sys
from math import hypot, sqrt

#==========================
def getLen(a, b, msg):
    l = hypot(b[0]-a[0], b[1]-a[1])
    if l >= 1e-5:
        return l
    raise ValueError ( "Too short " + msg )

#==========================
def curv(a,b,c, msg):
    lA = getLen(c,b, msg+"::l0")
    lB = getLen(b,a, msg+"::l1")
    lC = getLen(a,c, msg+"::l2")

    p = (lA + lB + lC)/2
    S = sqrt(p*(p-lA)*(p-lB)*(p-lC))

    if b[1] > a[1] and b[1] > c[1]:
        return 4*S / (lA*lB*lC)
    else:
        return -4*S / (lA*lB*lC)
#==========================
def testIt():
    a0 = ( 0., 1.)
    a2 = ( sqrt(1./2), sqrt(1./2))

    for idx in range(10):
        x  = .1 * idx
        a1 = ( x, sqrt(1-x*x))
        try:
            print x, curv( a0, a1, a2, "[%d]" % idx)
        except ValueError, v:
            print x, "*", str(v)

#==========================
#testIt()

#==========================
def arrange(FF, argMinX, argMaxX, argN):
    N = int(argN)
    assert N>0
    points = []
    for L in open(FF):
        pars = L.split()
        for idx in range(len(pars)-1):
            if pars[idx]=='-':
```

```
                del pars[idx]
                pars[idx] = "-" + pars[idx]


        if len(pars)<2 or pars[0][0]=='#':
            continue
        points.append([float(pars[0]), float(pars[1])])
    if argMinX == "*":
        minX = min([p[0] for p in points])
        print >> sys.stderr, "minX:", minX
    else:
        minX = float(argMinX)
    if argMaxX == "*":
        maxX = max([p[0] for p in points]) + 1e-10
        print >> sys.stderr, "maxX:", maxX
    else:
        maX = float(argMaX)

    D2 = (maxX - minX)/2/N
    assert D2>1e-10

    stat = []
    for idx in range(N):
        stat.append ( [0., 0, minX + D2*(2*idx + 1)] )

    lost = 0
    for p in points:
        nn = int((p[0] - minX) / (D2))
        print >> sys.stderr, "p:",p, "nn=", nn
        if nn<0 or nn>=2*N:
            lost += 1
            continue
        nn /= 2
        stat[nn][0] += p[1]
        stat[nn][1] += 1

    if lost>0:
        print >> sys.stderr, "Lost points:", lost

    lost2 = 0
    for st in stat:
        if st[1] == 0:
            lost2 += 1
            continue
        print st[2], st[0]/st[1]

    if lost2>0:
        print >> sys.stderr, "Lost intervals:", lost2

#=========================
#arrange("/dev/stdin", "*", "*", "10")
```

```
#==========================
def makeCurv(FF):
    points = []
    for L in open(FF):
        pars = L.split()
        if len(pars)<2 or pars[0][0]=='#':
            continue
        points.append([float(pars[0]), float(pars[1])])

    for idx in range(1, len(points)-1):
        x = points[idx][0]
        try:
            print x, curv( points[idx-1],
                           points[idx],
                           points[idx+1],
                           "[%f]" % x)
        except ValueError, v:
            print x, "*", str(v)

#==========================
def usage():
    print >> sys.stderr, "Usage: "
    print >> sys.stderr, "\tarrange count [minX=* [maxX=*]] < fin
> fout"
    print >> sys.stderr, "\tcurv < fin > fout"
    sys.exit(1)

if len(sys.argv)<2:
    usage()

if sys.argv[1]=="arrange":
    arrange("/dev/stdin",
            sys.argv[3] if len(sys.argv)>3 else "*",
            sys.argv[4] if len(sys.argv)>4 else "*",
            sys.argv[2])

elif sys.argv[1] == "curv":
    makeCurv("/dev/stdin")

else:
    usage()
```

Список использованной литературы

1. Amy Y. Shih, Peter L. Freddolino, Anton Arkhipov, and Klaus Schulten. Assembly of lipoprotein particles revealed by coarse-grained molecular dynamics simulations. Journal of Structural Biology, 157:579-592, 2007.
2. Anton Arkhipov, Ying Yin, and Klaus Schulten. Four-scale description of membrane sculpting by BAR domains. Biophysical Journal, 95:2806-2821, 2008. (PMC: 2527247)
3. Aspenstrom, P. 2005. The verprolin family of proteins: regulators of cell morphogenesis and endocytosis. FEBS Lett. 579:5253-9.
4. Berg, J.S., and R.E. Cheney, 2002. Myosin-X is an unconventional myosin that undergoes intrafilopodial motility. Nat Cell Biol. 4:246-50.
5. Blanchoin, L., T.D. Pollard, and S.E. Hitchcock-DeGregori, 2001. Inhibition of the Arp2/3 complex-nucleated actin polymerisation and branch formation by tropomyosin. Curr Biol. 11:1300-4.
6. Boczkowska M., Rebowski G., Petoukhov M.V., Hayes D.B., Svergun D.I. & Dominguez R. 2008. X-ray Scattering Study of Activated Arp2/3 Complex with Bound Actin-WCA. Structure 16:695-704.
7. Bompard, G., S.J. Sharp, G. Freiss, and L.M. Machesky. 2005. Involvement of Rac in actin cytoskeleton rearrangements induced by MIM-B. J Cell Sci. 118:5393-403.
8. Bray, D. 2001. Cell movements: from molecules to motility. Garland publishing, New York
9. Burns, S., G.O. Cory, W. Vainchenker, and A.J. Thrasher. 2004. Mechanisms of WASp-mediated hematologic and immunologic disease. Blood. 104:3454-62.
10. Callahan, C.A., T. Ofstad, L. Horng, J.K. Wang, H.H. Zhen, P.A. Coulombe, and A.E. Oro. 2004. MIM/BEG4, a Sonic hedgehog-responsive gene that potentiates Gli-dependent transcription. Genes Dev. 18:2724-9.
11. Dinsanza, A., S. Mantoani, M. Hertzog, S. Gerboth, E. Frittoli, A. Steffen, K. Berhoerster, H.J. Kreienkamp, F. Milanesi P.P. Di Fiore, A. Celeberto, T.E. Stradal, and G. Scita. 2006. Regulation of cell shape by Cdc42 is mediated by the synergic actin-bundling activity of the Eps8-IRSp53 complex. Nat Cell Biol. 8:1337-47.
12. Dominguez, R. 2007. The beta-Thymosin/WH2 Fold: Multifunctionality and Structure. Ann N Y Acad Sci. 1112:86-94.
13. Eden, S., R. Rohatgi, A.V. Podtelejnikov, M. Mann, and M.W. Kirschner. 2002. Mechanism

of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. Nature, 418:790-3.
14. Faix, J., and K. Rottner. 2006. The making of filopodia. Curr Opin Cell Biol. 18:8-25.
15. Fomproix, N., and P. Percipalle. 2004. An actin-myosin complex on actively transcribing genes. Exp Cell Res. 294:140-8.
16. Frittoli, E., Disanza, A., Scita, G. 2007. Wasp and WAVE family proteins. Actin-Monomer-Binding Proteins; Landes Bioscience and Springer Science+Business media, LLC:83-96.
17. Gallop, J.L., C.C. Jao, H.M Kent, P.J. Butler, P.R. Evans, R. Langen, and H.T. McMahon. 2006. Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. Embo J. 25:2898-910.
18. Goode, B.L., and M.J. Eck. 2007. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. Annu Rev Biochem. 76:593-627.
19. Gupton, S.L., and F.B. Gertler. 2007. Filopodia: the fingers that do the walking. Sci STKE. 2007:re5.
20. Habermann, B. 2004. The BAR-domain family of proteins: a case of bending and binding? EMBO Rep. 5:250-5.
21. Hannappel, E., Huff, T., Safer, D. 2007. Intracellular beta-thymosins. Actin-Monomer-Binding Proteins; Landes Bioscience and Springer Science+Business media, LLC:61-81.
22. Helfer, E., E.M. Nevalainen, P. Naumanen, S. Romero, D. Didry, D. Pantaloni, P. Lappalainen, and M.F. Carlier. 2006. Mammalian twinfilin sequesters ADP-G-actin and caps filament barbed ends: implications in motility. Embo J. 25:1184-95.
23. Herrmann, H., H. Bar, L. Kreplak, S.V. Strelkov, and U. Aebi. 2007. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. Nat Rev Mol Cell Biol. 8:562-73.
24. Hilpela, P., M.K. Vartiainen, and P. Lappalainen. 2004. Regulation of the actin cytoskeleton by PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3. Curr Top Microbiol Immunol. 282:117-63.
25. Hofmann, W.A., L. Stojiljkovic, B. Fuchsova, G.M. Vargas, E. Mavrommatis, V. Philimonenko, K. Kysela, J.A. Goodrich, J.L. Lessard, T.J. Hope, P. Hozak, and P. de Lanerolle. 2004. Actin is part of preinitiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. Nat Cell Biol. 6:1094-101.
26. Hu, P., S. Wu, and N. Hernandez. 2004. A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription. Genes Dev. 18:3010-5.
27. Innocenti, M., A. Zucconi, A. Disanza, E. Frittoli, L.B. Areces, A. Steffen, T.E. Stradal, P.P. Di Fiore, M.F. Carlier, and G. Scita. 2004.Abil is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. Nat Cell Biol. 6:319-27.

28. Insall, R.H., and O.D. Weiner. 2001. PIP3, PIP2, and cell movement – similar messages, different meanings? Dev Cell. 1:743-7.

29. Itoh, T., and P. De Camilli. 2006. BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. Biochim Biophys Acta. 1761:897-912.

30. Lee, S.H., F. Kerff, D. Chereau, F. Ferron, A. Klug, and R. Dominguez. 2007. Structural basis for the actin-binding function of missing-in-metastasis. Structure. 15:145-55.

31. Lee, Y.G., J.A. Macoska, S. Korenchuk, and K.J. Pienta. 2002. MIM, a potential metastasis suppressor gene in bladder cancer. Neoplasia. 4:291-4.

32. Lemmon, M.A., and K.M. Ferguson. 2000. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. Biochem J. 350 Pt 1:1-18.

33. Liepina, I., C. Czaplewski, P. Janmey, and A. Liwo. 2003. Molecular dynamics study of a gelsolin-derived peptide binding to a lipid bilayer containing phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. Biopolymers. 71:49-70.

34. Loberg, R.D., C.K. Neeley, L.L. Adam-Day, Y. Fridman, L.N. St John, S. Nixdorf, P. Jackson, L.M. Kalikin, and K.J. Pienta. 2005. Differential expression analysis of MIM (MTSS1) splice variants and a functional role of MIM in prostate cancer cell biology. Int J Oncol. 26:1699-705.

35. Ma, L., L.C. Cantley, P.A. Janmey, and M.W. Kirschner. 1998. Corequirement of specific phosphoinositides and small GTP-binding protein Cdc42 in inducing actin assembly in Xenopus egg extracts. J Cell Biol. 140:1125-36.

36. Ma, S., X.Y. Guan, T.K. Lee, and K.W. Chan. 2007. Clinicopathological significance of missing in metastasis B expression in hepatocellular carcinoma. Hum Pathol. 38:1201-6.

37. Machesky, L. M., S.A. Johnston. 2007. MIM: a multifunctional scaffold protein. J Mol Med. 85:569-576.

38. Masuda, M., S. Takeda, M. Sone, T. Ohki, H. Mori, Y. Kamioka, and N. Mochizuki. 2006. Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms. Embo J. 25:2889-97.

39. Mattila, P. 2007. Missing-in-metastasis (MIM) regulates cell morphology by promoting plasma membrane and actin cytoskeleton dynamics. University of Helsinki.

40. Mattila, P.K., A. Pykäläinen, J. Saarikangas, V.O. Paavilainen, H. Vihinen, E. Jokitalo, and P. Lappalainen. 2007. Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI(4,5)P2-rich membranes by an inverse BAR domain–like mechanism. J Cell Biol. 2007 March 26; 176(7): 953–964.

41. McLaughlin, S., J. Wang, A. Gambhir, and D. Murray. 2002. PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 31:151-75.

42. Miki, H., H. Yamaguchi, S. Suetsugu, and T. Takaenawa. 2000. IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. Nature. 408:732-5.

43. Mullins, R.D. 2000. How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures. Curr Opin Cell Biol. 12:91-6.

44. Paavilainen, V.O., E. Bertling, S. Falck, and P. Lappalainen. 2004. Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. Trends Cell Biol. 14:386-94.

45. Peter, B.J., H.M. Kent, I.G. Mills, Y. Vallis, P.J. Butler, P.R. Evans, and H.T. McMahon. 2004. BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. Science. 303:495-9.

46. Pollard, 1986. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. J Cell Biol. 103:2747-2754.

47. Prehoda, K.E., J.A. Scott, R.D. Mullins, and W.A. Lim. 2000. Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex. Science. 290:801-6.

48. Pruyne, D., M. Evangelista, C. Yang, E. Bi, S. Zigmond, A. Bretscher, and C. Boone. 2002. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. Science. 297:612-5.

49. Rameh, L.E., and L.C. Cantley. 1999. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. J Biol Chem. 274:8347-50.

50. Ridley, A.J. 2006. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. Trends Cell Biol. 16:522-9.

51. Schafer, D.A., P.B. Jennings, and J.A. Cooper. 1996. Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides.J Cell Biol. 135:169-79.

52. Sellers, J.R. 2000. Myosins: a diverse superfamily. Biochim Biophys Acta. 1496:3-22.

53. Shimada, A., H., Niwa K. Tsujita, S. Suetsugu, K. Nitta, K. Hanawa-Suetsugu, R. Akasaka. 2007. Curved EFC/F-BAR-domain dimers are joined end to end into a filament for

membrane invagination in endocytosis. Cell. 129:761-72.

54. Small, J.V., and G.P. Resch. 2005. The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility. Curr Opin Cell Biol. 17:517-23.
55. Stradal, T.E., G. Scita. 2006. Protein complexes regulating Arp2/3-mediated actin assembly. Curr Opin Cell Biol. 18:4-10.
56. Suetsugu, S., S. Kurisu, T. Oikawa, D. Yamazaki, A. Oda and T. Takenawa. 2006. Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac. J Cell Biol. 173:571-85.
57. Sun, Y., S. Carroll, M. Kaksonen, J.Y. Toshima, D.G. Drubin. 2007. PtdIns(4,5)P2 turnover is required for multiple stages during clathrin- and actin-deprendent endocytic internalization. J Cell Biol. 177:355-67.
58. Svitkina, T.M., E.A. Bulanova, O.Y. Chaga, D.M. Vignjevic, S. Kojima, J.M. Vasiliev, and G.G. Borisy. 2003. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendric network. J Cell Biol. 160:409-21.
59. Wegner, A. 1982. Treadmilling of actin at physiological salt concentration I An analysis of the critical concentrations of actin filaments. J Mol. Biol. 161:607-615.
60. Welch, M.D., and R.D. Mullins. 2002. Cellular control of actin nucleation. Annu Rev Cell Dev Biol. 18:247-88.
61. Witke, W., A. Hofmann, B Koppel, M. Schleicher, and A.A. Noegel. 1993. The Ca(2+)-binding domains in non-muscle type alpha-actinin: biochemical and genetic analysis. J Cell Biol. 121:599-606.
62. Yamagishi, A., M. Masuda, T. Ohki, H. Onishi, and N. Mochizuki. 2004. A novel actin bundling/filopodium-forming domain conserved in insulin receptor tyrosine kinase substrate p53 and missin in metastasis protein. J Biol Chem. 279:14929-36.
63. Zigmond, S.H., M. Evangelista, C. Boone, C Yang. A.C. Dar, F. Sicheri, J. Forkey, and M. Pring. 2003. Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins. Curr Biol. 13:1820-3.
64. Шайтан К. В., Терёшкина К. Б. 2004. Молекулярная динамика белков и пептидов. Методическое пособие. М: МГУ.
65. Левцова О.В, Давлетов И.Д., Соколова О.С., Шайтан К.В. Молекулярная динамика взаимодействий домена I-BAR белка IRSp53 с отрицательно заряженными мембранами