

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 547.96 + 577.112.083 + 577.112.7 + 577.151.34 + 577.152.1 + 548.73

ОТ ГЕНА К СТРУКТУРЕ. БЕЛКОВАЯ ФАБРИКА НБИКС-ЦЕНТРА КУРЧАТОВСКОГО ИНСТИТУТА

© 2013 г. К. М. Бойко^{1, 2}, А. В. Липкин¹, В. О. Попов^{1, 2}, М. В. Ковальчук¹

¹ НБИКС-Центр НИЦ “Курчатовский институт”, Москва

² Институт биохимии РАН, Москва

E-mail: vpopov@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 22.04.2012 г.

В НБИКС-Центре НИЦ “Курчатовский институт” в 2010 г. создано специальное подразделение – Белковая фабрика, которое во взаимодействии с Центром синхротронного излучения обеспечивает проведение работ в области структурной биологии. Рассмотрены технологические платформы, реализованные на базе Белковой фабрики, и возможности, которые она предоставляет исследователям. Кратко представлены основные проекты, которые реализуются в рамках Белковой фабрики в настоящее время.

DOI: 10.7868/S0023476111050043

ВВЕДЕНИЕ

Структурная биология является одним из важнейших разделов современной физико-химической биологии. Без нее давно невозможно представить развитие наук о жизни. Не случайно именно за исследования в области разработки новых методов анализа структуры биологически активных соединений и макромолекул, за выяснение строения важнейших компонентов клетки и биологических наномашин, таких как фотосинтетические центры, АТФ-аза и рибосома, в последние 50 лет присуждено восемь нобелевских премий в области химии, физиологии и медицины.

Без привлечения данных о структуре макромолекул (белков, нуклеиновых кислот) и их комплексов практически невозможно проводить на современном уровне работы по разработке новых лекарственных препаратов, выяснению механизмов ферментативных реакций, исследованию функционирования сложных биологических комплексов, ответственных за большинство процессов в живой клетке, получению и оптимизации новых биокатализаторов для различных областей биотехнологии и т.п.

Существует большое разнообразие физико-химических методов, которые позволяют исследовать те или иные особенности структурной организации макромолекул, например ближайшее окружение ионов металлов в молекулах белков или специально введенных в них меток, флуоресцентных или парамагнитных, доступность тех или иных фрагментов макромолекулы молекулам растворителя и т.п. [1]. Однако только некоторые из подходов позволяют выяснить общее строение исследуемого объекта и детали его атомной и молекулярной структуры. К таковым в настоящее

время относятся рентгеноструктурный анализ (РСА), метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР), метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и криоэлектронная микроскопия (КЭМ) (табл. 1).

Каждый из данных методов имеет свои преимущества и ограничения. Основным ограничением РСА, например, является необходимость работы с кристаллами макромолекул, получение которых представляет собой сложную самостоятельную задачу [2]. Несмотря на значительный прогресс в методологии ЯМР, который дает информацию о структуре макромолекул непосредственно в растворе, все еще существует проблема исследования этим методом крупных биомолекул. Но в целом при совместном использовании все эти подходы позволяют получить достаточно детальную структурную информацию даже о весьма сложно организованных биологических объектах. Например, получив общее представление о форме объекта методом МУРР или КЭМ, можно, разобрав методами молекулярной биологии объект исследования на части, изучить на более тонком уровне структуру отдельных фрагментов объекта (доменов, отдельных белков) методами ЯМР или РСА, а потом воссоздать все детали структурной организации, основываясь на комбинировании информации, полученной всеми использованными методами.

Существует значительное количество биологических объектов, структурные исследования которых по тем или иным причинам особенно затруднены. К ним относятся, например, мембранные белки (до 25% всех белков клетки), с трудом поддающиеся кристаллизации, или так называемые белки с неупорядоченной структурой (до

Таблица 1. Сравнение основных методов исследования пространственной организации макромолекул

Метод	Степень детализации	Ограничения	Доля структур в банке данных (www.rcsb.org), полученных данным методом, %
РСА	Положение отдельных атомов	Хорошо дифрагирующие кристаллы, статическая картина	86
ЯМР	Положение отдельных атомов	Сложность расчета крупных молекул	13
МУРР	Общая форма молекулы/комплекса		<1
ЭМ	Крупные объекты, надмолекулярные комплексы	Статическая картина	<1

10% всех белков клетки), приобретающие определенную структуру лишь в процессе осуществления своей биологической функции, например при взаимодействии со своими физиологическими белковыми партнерами, т.е. при образовании белок-белкового комплекса.

Бурное развитие методологической базы структурных исследований, в частности внедрение более мощных источников рентгеновского излучения, например лазера на свободных электронах (XFEL), позволяет надеяться, что в скором времени биологам будут доступны принципиально новые подходы для исследования строения сложных нерегулярных биологических объектов [3].

Статистика банка данных пространственных структур макромолекул Protein Data Bank (www.rcsb.org) показывает (табл. 1), что основным методом структурных исследований на сегодняшний день является метод РСА, которым получено около 86% всех исследованных структур. Курчатовский исследовательский центр обладает развитой научной инфраструктурой, в частности имеет в своем распоряжении источник синхротронного излучения, на базе которого реализуются проекты, связанные с использованием методов РСА и МУРР. В 2013 г. вводится в эксплуатацию комплекс ЯМР-спектрометров, в процессе реализации находится создание исследовательской базы, которая позволит применять методы КЭМ для исследования структуры макромолекул, что позволит значительно расширить круг решаемых задач. Таким образом, НБИКС-Центр Курчатовского института, где сосредоточены все эти технологии и исследовательские установки, является уникальным центром по проведению исследований в области структурной биологии.

СТРУКТУРНАЯ БИОЛОГИЯ В НБИКС-ЦЕНТРЕ

Белковая фабрика НБИКС-Центра

Летом 2010 г. в НБИКС-Центре НИЦ “Курчатовский институт” начал функционировать специальный отдел – Белковая фабрика (рис. 1), основным назначением которого является проведение всего комплекса работ по структурно-функциональной характеристике макромолекул, в первую очередь методом РСА.

От постановки задачи – выбора объекта исследования, например гена, кодирующего определенный белковый продукт, или белка с неизвестной структурой или функцией, до получения конечного результата – решенной структуры целевого белка или белкового комплекса, необходимо пройти ряд этапов: провести клонирование выбранного гена, добиться экспрессии функционального белкового продукта, провести его выделение и очистку, получить кристаллы, провести рентгенографический эксперимент, обработать данные, решить и уточнить структуру макромолекулы. Каждая из стадий такого проекта является, как правило, отдельной сложной научной задачей, где стопроцентный успех не гарантирован. Развитие современных технологий молекулярной и структурной биологии в последние годы значительно повысило шансы исследователей на конечный успех (<http://olenka.med.virginia.edu/psi/>, <http://sbkb.org/metrics/>), тем не менее существует определенная вероятность неудачи практически на каждом из указанных этапов. В частности, одной из самых непредсказуемых, особенно для белков, отличающихся сложной пространственной организацией и/или наличием простетических групп, является стадия экспрессии белкового продукта в правильном функциональном состоянии и в количествах, которые позволяют

перейти к его структурной и физико-химической характеристике [4]. Другой не менее сложной стадией является кристаллизация образца. Необходимость получения кристаллов является основным ограничением метода РСА, поскольку кристаллизация макромолекул в отсутствие адекватной теории, позволяющей сопоставить определенному объекту конкретные условия кристаллизации, до сих пор остается наиболее проблемной и наименее прогнозируемой стадией структурного исследования данным методом. Чаще всего задача решается прямым перебором большого числа вариантов условий кристаллизации, что требует значительных затрат времени и труда.

Таким образом, лишь относительно небольшая часть инициированных структурных проектов заканчивается успешным получением структурной информации за разумный период времени. В случае “несложных” белков типа гидролаз, оксидоредуктаз, не содержащих ковалентно связанных простетических групп и т.п., общий “процент успеха” колеблется в среднем от 10 до 30%. Как уже отмечалось, наиболее проблемными являются стадии экспрессии белкового продукта (до 60% неудач) и получения кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного эксперимента (до 90% неудач) [5].

Основной задачей Белковой фабрики является обеспечение стабильного потока качественных белковых кристаллов для станции “Белок”, расположенной на источнике синхротронного излучения. Объекты, которые принимаются в работу, могут появляться на различных уровнях реализации проектов. Это могут быть, например, данные полногеномного секвенирования, полученные в геномном подразделении НБИКС-Центра; готовые генетические конструкции для экспрессии конкретных белков; белки различной степени очистки или даже их готовые кристаллы.

В настоящее время в подразделении реализован ряд технологических платформ (табл. 2), которые позволяют осуществлять весь комплекс исследований от клонирования целевых генов, экспрессии и очистки их белковых продуктов до получения кристаллов, проведения рентгеноструктурного эксперимента и кристаллографического уточнения структур макромолекул. В сотрудничестве с нашими партнерами возможно проведение экспериментов по молекулярному моделированию макромолекул, проведению докинга малых молекул *in silico* и т.п. [6, 7].

Отдельно хотелось бы остановиться на возможностях, которыми располагает Белковая фабрика в области оптимизации условий кристаллизации белков и их комплексов.

Для решения задач по оптимизации условий кристаллизации макромолекул в распоряжении

Таблица 2. Технологические платформы, реализованные в отделе “Белковая фабрика” НБИКС-Центра НИЦ “Курчатовский институт”

Этап работы	Технологии
Клонирование/экспрессия	Бактериальная, дрожжевая, бакуловирусная системы экспрессии
Выделение/очистка	До четырех белков в неделю
Кристаллизация	Роботизированная система поиска первоначальных условий и оптимизации условий кристаллизации; ручная кристаллизация; кристаллизация в условиях микрогравитации
Съемка	Станция белковой кристаллографии “Белок” на пучке синхротронного излучения накопителя “Сибирь-2”

Белковой фабрики помимо традиционной ручной кристаллизации методами встречной диффузии и диффузии в парах имеются два мощных инструмента – система роботизированной кристаллизации и возможность проведения экспериментов по кристаллизации в условиях микрогравитации (в космическом эксперименте).

Система роботизированной кристаллизации (Ригаку, Япония) предназначена для поиска первоначальных условий кристаллизации образцов в автоматическом режиме. Все операции по подбору условий кристаллизации, за исключением стадий переноса образцов между отдельными элементами комплекса, которые проводятся оператором, начиная от приготовления исходных кристаллизационных растворов и заканчивая фотомониторингом и документированием процесса кристаллизации, проводятся в автоматическом режиме.

Комплекс состоит из трех роботизированных модулей, объединенных в единую систему посредством сервера и специализированного программного обеспечения. Основными достоинствами данного комплекса по сравнению с возможностями ручной кристаллизации являются: высокая производительность; прецизионность дозирования растворов и сниженный расход экспериментальных образцов (до 10 раз); возможность готовить кристаллизационные растворы по заданному рецепту; хранить кристаллизационные планшеты при заданной температуре и проводить их фотомониторинг и документирование по заданному расписанию (одновременно до 1400 планшетов, 134400 условий кристаллизации) с возможностью удаленного доступа к результатам экспериментов через Интернет.

Кристаллизация в условиях микрогравитации является дополнительной возможностью улучшить качество кристаллов, образующихся в про-

цессе кристаллизации стандартными (наземными) методами. Известно, что качество белкового кристалла существенно зависит от характера транспорта вещества к растущему кристаллу, который может осуществляться конвекционным путем или посредством диффузии. В условиях микрогравитации, где конвекция практически отсутствует, превалирует диффузионный транспорт. Вокруг кристалла устанавливается стабильный концентрационный градиент, так что кристалл растет в наиболее благоприятных условиях, при минимальном пересыщении. Отсутствие седиментации предотвращает опускание кристалла на дно сосуда, что обеспечивает равномерный доступ вещества ко всем растущим граням и способствует образованию в невесомости более изометрических кристаллов [8].

Данный подход применим к ситуации, когда для объекта уже подобраны условия кристаллизации, но требуется получить кристаллы более высокого качества (низкая мозаичность, отсутствие двойникования и др.). В настоящее время эксперименты по кристаллизации в условиях микрогравитации проводятся на борту Международной космической станции в рамках международного сотрудничества Роскосмоса с Японским космическим агентством (JAXA).

Проекты, реализуемые Белковой фабрикой

В рамках Белковой фабрики в середине 2010 г. начата реализация нескольких пилотных проектов.

Ферменты экстремофилов

Целью проекта является поиск и структурно-функциональная характеристика ферментов с полиэкстремофильными свойствами: термостабильностью, галотолерантностью и устойчивостью к органическим растворителям. Исходными данными послужили геномы термофильных архей (коллекция ИНМИ РАН), секвенированные в НБИКС-Центре и Центре “Биоинженерия” РАН [9, 10]. В рамках данного проекта, выполняемого совместно с лабораторией геномики НБИКС-Центра, на основании анализа геномов нескольких термофильных архей ведется отбор ферментов, представляющих интерес для целей биотехнологии и медицины. В число первоначально отобранных ферментов вошли гликозидазы (амилазы, эндо/экзо-глюканазы, гликозилтрансферазы и т.д.), оксидоредуктазы (алкогольдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы, супероксиддисмутаза и т.д.), протеазы (Хаа-Pro пептидаза, лейцинаминопептидаза, широкоспецифичная аминопептидаза и т.д.) и ДНК-лигазы [11–15]. Гены предварительно отобранных ферментов были клонированы, рекомбинантные целевые белки экспрессированы в

штаммах *E. coli*, очищены до гомогенного состояния стандартными биохимическими методами и после контроля активности и степени чистоты полученных препаратов направлены на процедуру подбора условий кристаллизации с помощью роботизированной системы. В настоящее время в рамках проекта получены кристаллы 12 различных белков. Для восьми из них собраны наборы кристаллографических данных, позволившие перейти к решению и уточнению структуры. Семь белковых структур (пролидаза, две β -гликозидазы, две ДНК-лигазы, алкогольдегидрогеназа, супероксиддисмутаза) уточнены и депонированы в банке белковых структур. Достаточно большой разрыв между количеством закристаллизованных объектов и количеством кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного эксперимента, объясняется особенностью белков из термофильных организмов – высокой степенью гидратации поверхности белка, что снижает качество контактов белка в кристалле и ухудшает дифракционную картину.

Большинство из исследованных ферментов обладают исключительно высокой термостабильностью, сохраняя активность в течение нескольких часов при 80–90°C, а некоторые обладают поистине уникальными свойствами. Так, алкогольдегидрогеназа из *Thermococcus sibiricus*, имеет период полуинактивации при 100°C около 1 ч и сохраняет активность как в 4 М солевом растворе так и в присутствии 50% органических растворителей, что делает этот фермент весьма привлекательным для биотехнологических приложений [13].

Структурные исследования сложных олигомерных белков

В рамках данного проекта проводится структурно-функциональная характеристика мультисубъединичных белков, в том числе включающих различные протетические группы и металлические центры.

Одним из примеров является цитохром *c* нитритредуктаза из галоалкалифильных бактерий рода *Thioalkalivibrio* (TvNiR). Как известно, цитохром *c* нитритредуктазы (NrfA) катализируют одну из самых сложных химических реакций – 6-электронное восстановление нитрита до аммиака и сульфита до сульфида [16]. Это хорошо изученная группа гомологичных белков с подробно описанными каталитическими свойствами, структурами гена и оперона, пространственной структурой, а также физиологической функцией в клетке [17–20]. Эти ферменты представляют собой однодоменные белки с молекулярными массами 55–65 кДа, содержащие пять гемов типа *c*. Функциональной единицей этих белков в клетке является димер.

TvNiR, выделенная из близкородственных штаммов γ -рода *Thioalkalivibrio*, является восьми-

гемовым цитохромом *c*, катализирующим реакции восстановления нитрит иона и гидроксилamina до аммиака без высвобождения промежуточных интермедиатов и характеризующимся максимальной нитритредуктазной активностью по сравнению с известными нитритредуктазами [21]. Показано, что первичная последовательность данного белка существенно отличается от последовательностей известных NrfA. Более того, оказалось, что геномы ряда бактерий наряду с генами NrfA содержат последовательности, гомологичные последовательности TvNiR [22].

Были исследованы физико-химические, кинетические и спектральные свойства TvNiR в растворе, а также получено 16 структур высокого (1.4–2.0 Å) разрешения для апофермента и его комплексов с субстратами и ингибиторами [22–25]. Фермент содержит 48 гемов типа *c*, является наиболее активным из известных к настоящему времени нитритредуктаз и абсолютным рекордсменом по числу гемов, приходящихся на молекулу белка. В отличие от пятигемовых нитритредуктаз TvNiR существует в растворе и кристалле в виде симметричного и стабильного гексамера (рис. 2), построенного по типу димера тримеров, который представляет собой наночастицу размерами 15 × × 12 нм и содержит в центре молекулы значительные полости и пустоты.

Активный центр TvNiR включает в себя каталитический гем типа *c*, координированный остатком лизина в проксимальном положении, и остатки Tyr, His и Arg, расположенные с дистальной стороны гема. Высокое разрешение, с которым получены структуры TvNiR и ее комплексы, указывают на ряд важных черт активного центра, в частности ковалентную связь каталитически важного остатка тирозина с соседним остатком цистеина, объясняющих высокую эффективность катализа.

Сложная четвертичная структура TvNiR приводит к образованию уникального ансамбля из 48 взаимодействующих гемов. При этом восемь гемов *c*, содержащихся в каждом из мономеров TvNiR, образуют каноническую пространственную укладку, характерную для других мультигемовых цитохромов.

Белки с известной структурой, но неизвестной функцией

В результате бурного развития структурной геномики в последнее время накоплено значительное количество экспериментальных данных по структурам различных белков [26]. В частности, существует большое число белков, для которых уже известна пространственная структура, но не выяснена функция. В то же время показано, что многие из подобных объектов ассоциированы с

проявлением патологических состояний организма и представляют, таким образом, потенциальный интерес для биомедицины. Одним из подходов к определению функции белка является поиск его физиологического лиганда или выявление его физиологической активности (ферментативной, в сигнальных каскадах и т.п.). Распространенные методы поиска лигандов сводятся к перебору различных соединений, способных связываться с исследуемым объектом, и, как правило, выявляют лишь лиганды, обладающие высоким сродством. В отличие от них методы белковой кристаллографии позволяют выявлять лиганды, обладающие изначально достаточно низким сродством к центрам связывания. В рамках развиваемого подхода [27] проводится настаивание кристаллов исследуемого белка с неизвестной функцией с рядом соединений — потенциальных физиологических лигандов, представляющих низкомолекулярные клеточные метаболиты или их фрагменты, с целью поиска (путем анализа данных рентгеноструктурного эксперимента) соединений, способных к взаимодействию с белком. Дальнейшая целенаправленная модификация структуры исходного соединения с целью улучшения параметров связывания и тестирование соответствующих белок-лигандных комплексов, в том числе кристаллографическими методами, должно позволить сделать вывод о том, какое соединение является физиологическим лигандом изучаемого белка.

Для выполнения проекта было отобрано 16 белков с известной пространственной структурой, но не выясненной функцией, 15 из которых были успешно экспрессированы и очищены. Для 10 из них получены кристаллы, а для семи — сняты наборы дифракционных данных и решены структуры, в том числе отличные от имеющихся в банке данных пространственных структур. На рис. 3 приведены примеры структур белков с неизвестной функцией, полученных в рамках данного проекта. В настоящее время ведется работа по настаиванию полученных кристаллов с библиотеками метаболитов для поиска потенциальных физиологических лигандов.

Кристаллизация в условиях микрогравитации

Как и любой метод, кристаллизация в условиях микрогравитации не гарантирует рост качественных кристаллов любых молекулярных объектов. Тем не менее у Белковой фабрики имеется успешный опыт использования данной технологии.

Уридинфосфорилаза из бактерии Shewanella oneidensis

Уридинфосфорилазы относятся к классу пиримидиновых нуклеозидфосфорилаз. Фермент представляет значительный практический инте-

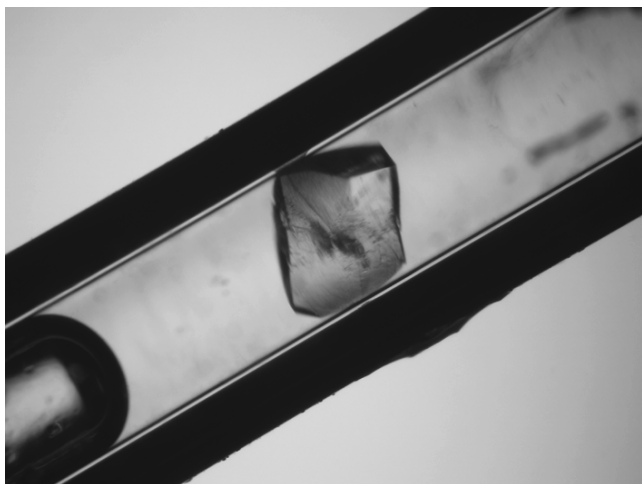


Рис. 4. Кристалл уридинфосфорилазы из бактерии *S. oneidensis*, выросший в капилляре в условиях микрогравитации.

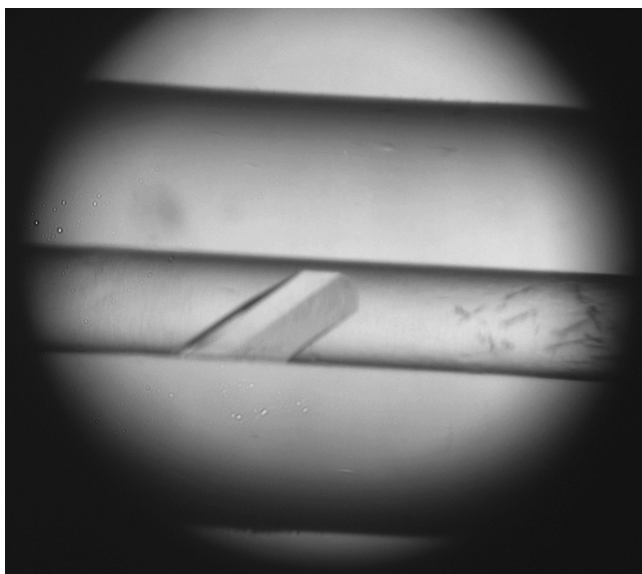


Рис. 5. Кристалл ДНК-лигазы из термофильной археи *T. sibiricus*, полученный методом встречной диффузии в капилляре в условиях микрогравитации.

рес, поскольку может быть использован, с одной стороны, в качестве биокатализатора для синтеза нуклеозидов – потенциальных противовирусных и противораковых лекарств. С другой стороны, уридинфосфорилаза сама является белком-мишенью для разработки терапевтических препаратов [28, 29].

Ранее были получены кристаллы данного фермента. Предварительный рентгеноструктурный эксперимент, проведенный на станции “Белок” НИЦ “Курчатовский институт”, показал, что выращенные кристаллы дифрагируют до разрешения 1.75 Å. С целью получения более совершенных кристаллов фермента принято решение использовать метод кристаллизации в условиях микрогравитации. Адаптация условий кристаллизации, полученных в наземных экспериментах, и последующий эксперимент в условиях “невесомости” позволили получить кристаллы (рис. 4), дифрагирующие до атомного разрешения 0.95 Å [30]. В настоящее время кристаллографическое уточнение структуры уридинфосфорилазы завершено, и структура депонирована в банк данных.

шенных кристаллов фермента принято решение использовать метод кристаллизации в условиях микрогравитации. Адаптация условий кристаллизации, полученных в наземных экспериментах, и последующий эксперимент в условиях “невесомости” позволили получить кристаллы (рис. 4), дифрагирующие до атомного разрешения 0.95 Å [30]. В настоящее время кристаллографическое уточнение структуры уридинфосфорилазы завершено, и структура депонирована в банк данных.

ДНК-лигаза из термофильной археи Thermococcus sp.1519

ДНК-лигазы являются представителями семейства нуклеотидилтрансфераз. Эти мультидоменные ферменты представляют как фундаментальный интерес, связанный со сложной последовательностью конформационных превращений, происходящих в белке в процессе катализа, так и практический, так как являются перспективными для применения в молекулярной диагностике. Ранее была получена кристаллическая структура этого белка с разрешением 2.9 Å [31]. При этом не все элементы структуры белка могли быть идентифицированы на картах электронной плотности, в частности полностью отсутствовал один из трех структурных доменов белка. Использование метода кристаллизации в условиях микрогравитации позволило получить новый кристалл этого фермента (рис. 5), с которого был получен набор дифракционных данных. Несмотря на близкий наземным экспериментам уровень разрешения, на картах электронной плотности удалось идентифицировать все три домена белковой молекулы и выявить их особую пространственную укладку, отличную от мезофильных аналогов данного фермента [15].

ВЫВОДЫ

За первые два года работы Белковой фабрики успешно экспрессировано, выделено и очищено более 40 белковых препаратов (без учета сторонних белков, переданных на кристаллизацию в очищенном виде); 29 из них (70%) успешно закристаллизованы. Получено более 80 наборов дифракционных данных (включая комплексы с лигандами) для 22 индивидуальных белков. Депонировано в банк данных 27 структур, при этом более 70% всех полученных структур имеют разрешение выше 2 Å.

В заключение хотелось бы отметить, что Белковая фабрика, являясь частью инфраструктуры НБИКС-Центра НИЦ “Курчатовский институт”, представляет собой мощный инструмент, позволяющий проводить структурно-функциональные исследования макромолекул на современном методическом уровне.

Проекты Белковой фабрики поддержаны грантами Минобрнауки в рамках ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009-2013 (ГК 02.740.11.0765, П1197, Соглашение 8795), а также Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 12-04-33246 и 12-04-31450).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kessel A., Nir Ben-Tal* // CRC Press, Taylor & Francis Group. 2010. P. 209.
2. *Helliwell J.R.* // Acta Cryst. D. 2005. V. 61(6). P. 793.
3. *Chapman H.N., Fromme P., Barty A. et al.* // Nature. 2011. V. 470(7332). P. 73.
4. *Georgiou G., Valax P.* // Curr. Opin. Biotechnol. 1996. V. 7(2). P. 190.
5. *Chayen N.E., Saridakis E.* // Nat. Methods. 2008. V. 5(2). P. 147.
6. *Nilov D.K., Shabalin I.G., Popov V.O. et al.* // J. Biomol. Struct. Dynam. 2012. V. 30(2). P. 170.
7. *Stroganov O.V., Novikov F., Stroylov V.S. et al.* // J. Chem. Inf. Model. 2008. V. 48. P. 2371.
8. *Куранова И.П.* // Поверхность. 2004. № 6. С. 6.
9. *Ravin N.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V. et al.* // J. Bacteriol. 2009. V. 191(7). P. 2371.
10. *Mardanov A.V., Svetlitchnyi V.A., Beletsky A.V. et al.* // Appl. Environ Microbiol. 2010. V. 76(16). P. 5652.
11. *Petrova T.E., Bezsudnova E.Y., Dorokhov B.D. et al.* // Acta Cryst. F. 2012. V. 68. P. 163.
12. *Слуцкая Э.С., Безsudнова Е.Ю., Марданов А.В. et al.* // Докл. РАН. 2012. Т. 42. № 4. С. 551.
13. *Bezsudnova E.Y., Boyko K.M., Polyakov K.M. et al.* // Biochemie. 2012. V. 94. № 12. P. 2628.
14. *Petrova T.E., Bezsudnova E.Y., Boyko R.M. et al.* // Acta Cryst. F. 2012. V. 68. P. 1440.
15. *Слуцкая Э.С., Безsudнова Е.Ю., Марданов А.В. и др.* // Биохимия. 2012. Т. 77. № 12. С. 1681.
16. *Simon J.* // FEMS Microbiology Rev. 2002. V. 26. P. 285.
17. *Schumacher W., Hole U., Kroneck P.M.H.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994. V. 205. P. 911.
18. *Roldan M.D., Sears H.J., Cheesman M.R. et al.* // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 28785.
19. *Einsle O., Stach P., Messerschmidt A. et al.* // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 39608.
20. *Cole J.A.* // Biochim. Biophys. Acta. 1968. V. 162. P. 356.
21. *Boyko K.M., Tikhonova T.V., Slutsky A. et al.* // Biochim. Biophys. Acta. 2006. V. 1764. № 4. P. 715.
22. *Polyakov K.M., Boyko K.M., Tikhonova T.V. et al.* // J. Mol. Biol. 2009. V. 389. № 5. P. 846.
23. *Trofimov A.A., Polyakov K.M., Tikhonova T.V. et al.* // Acta Cryst. D. 2012. V. 68. P. 144.
24. *Tikhonova T.V., Trofimov A.A., Tikhonov A.V. et al.* // FEBS Journal. 2012. V. 279. № 21. P. 4052.
25. *Тихонова Т.В., Трофимов А.А., Попов В.О. и др.* // Биохимия. 2012. Т. 77. С. 1362.
26. http://www.rcsb.org/pdb/statistics/histogram.do?mdcat=pdbx_SG_project&mditem=full_name_of_center&numOfbars=30&name=Structural%20Genomics%20Centers
27. *Горбачева М.А., Ярош А.Г., Дороватовский П.В. и др.* // Биоорган. химия. 2012. Т. 38. № 1. С. 1.
28. *Roosild T.P., Castronovo S., Fabbiani M. et al.* // BMC Struct. Biol. 2009. V. 9. P. 16.
29. *Renck D., Ducati R.G., Palma M.S. et al.* // Arch. Biochem. Biophys. 2010. V. 497. P. 35.
30. *Safonova T.N., Mordkovich N.N., Polyakov K.M. et al.* // Acta Cryst. F. 2012. V. 68. P. 1387.
31. *Bezsudnova E.Y., Kovalchuk M.V., Mardanov A.V. et al.* // Acta Cryst. F. 2009. V. 65. № 4. P. 368.

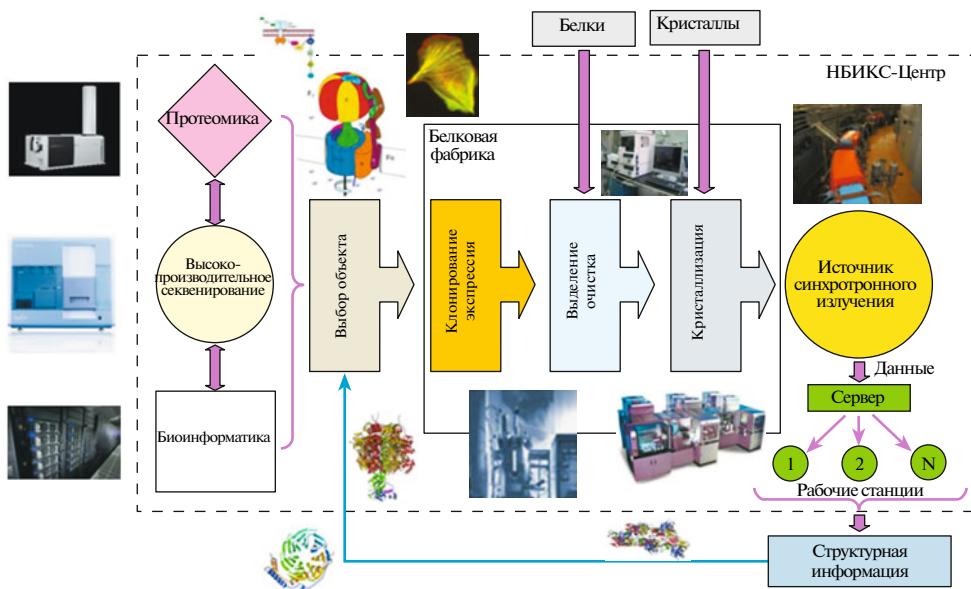


Рис. 1. Схема Белковой фабрики и ее место в структуре работ НБИКС-Центра НИЦ “Курчатовский институт”.

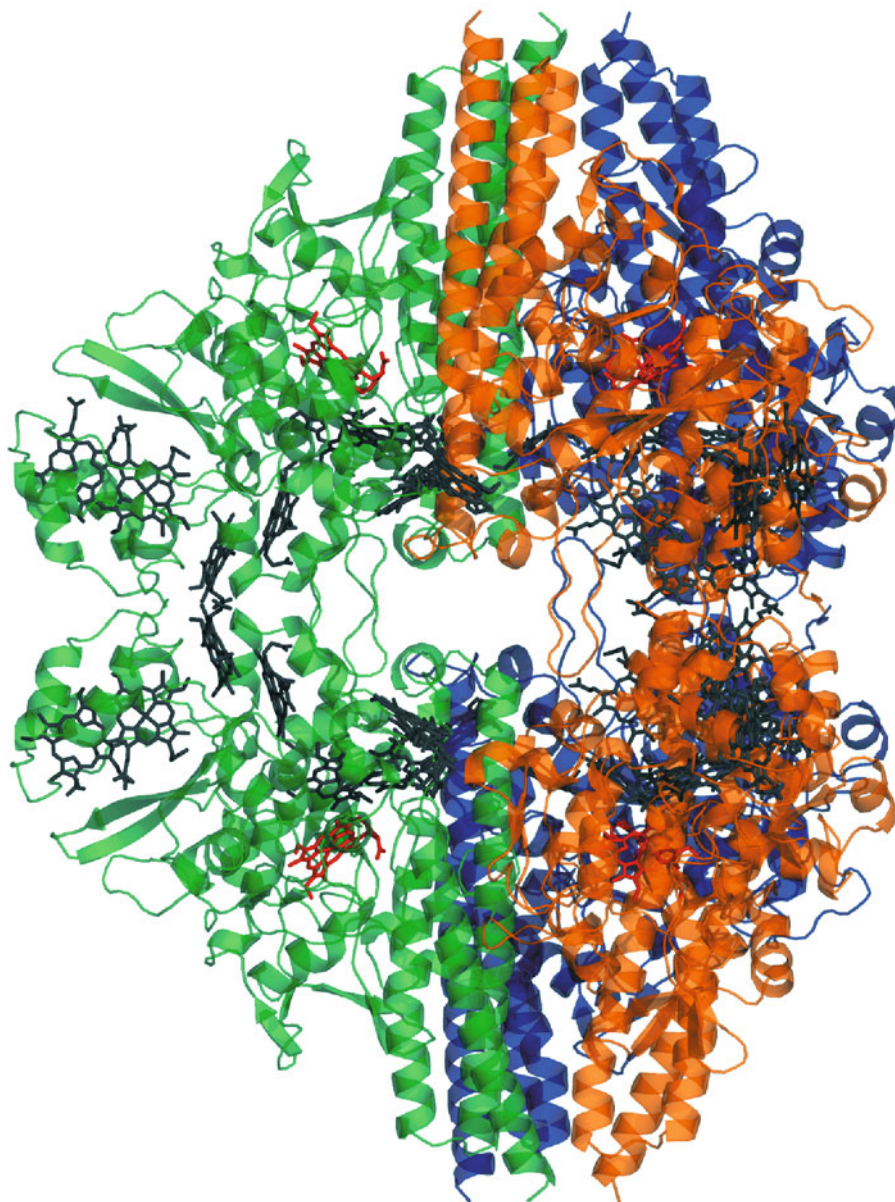


Рис. 2. Структура цитохром *c* нитритредуктазы из *Tv. nitratreducens*, содержащей 48 гемов типа *c*, при разрешении 1.5 Å. Мономеры, образующие димер из независимой части элементарной ячейки, показаны одинаковым цветом. Каталитические гемы показаны красным, остальные – черным.

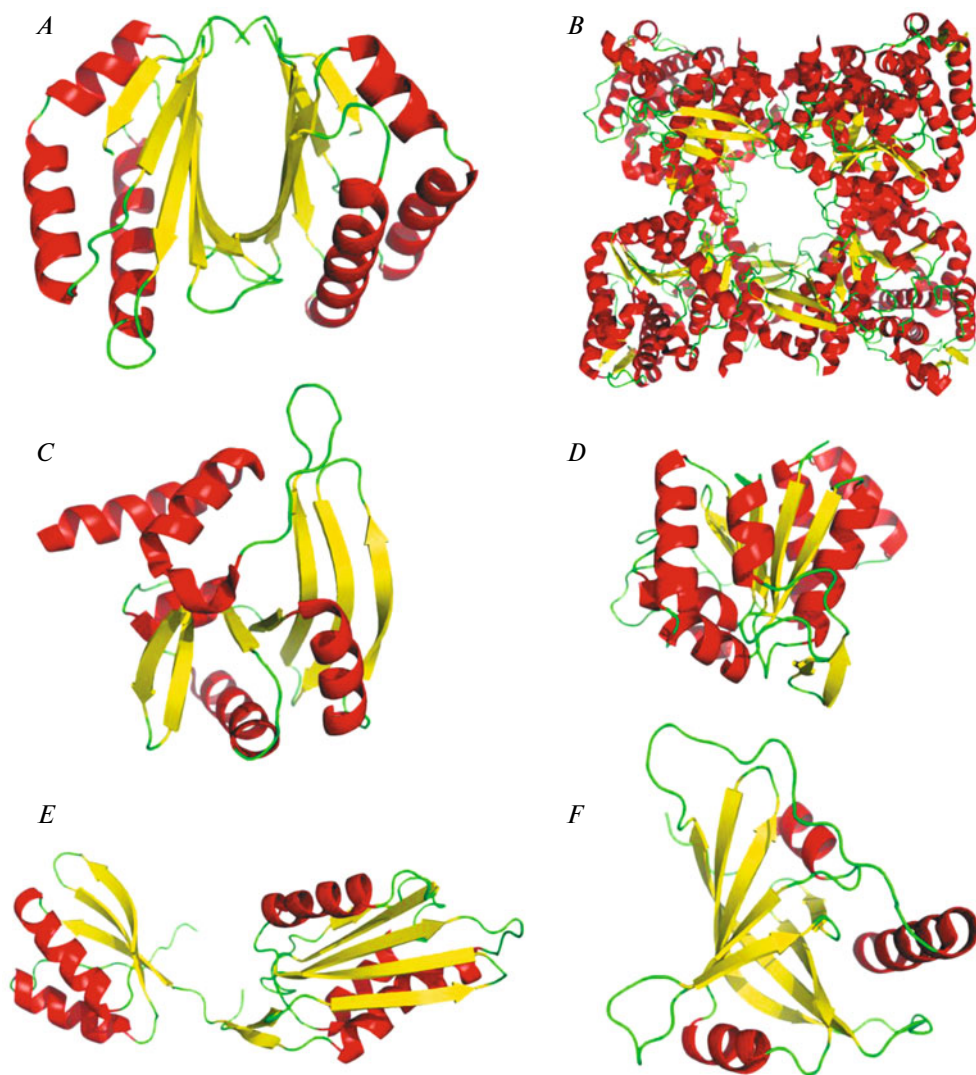


Рис. 3. Пространственные структуры белков с неизвестной функцией. *A* – димер предполагаемой монооксигеназы из *Deinococcus radiodurans*; *B* – тетрамер предполагаемого нуклеотидсвязывающего белка из *Vibrio cholerae*; *C* – мономер предполагаемой нуклеотидилтрансферазы из *Thermotoga maritima*; *D* – мономер белка DJ-1 из *H. sapiens*, ассоциированного с болезнью Паркинсона; *E* – мономер белка с неизвестной функцией и уникальной пространственной укладкой из *E. coli*; *F* – мономер предполагаемой оксидоредуктазы из *Exiguobacterium sibiricum*. Модели окрашены в соответствии с элементами вторичной структуры: α -спирали показаны красным, β -слои – желтым, остальные области – зеленым.