

Секция «Биоинженерия и биоинформатика»

УДК 537.531

Выделение аномальной активности в записи магнитной энцефалограммы у больных паркинсонизмом

Бердникова А.П., Махортых С.А.

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

Магнитная энцефалография (МЭГ) – быстро развивающаяся область экспериментального изучения высшей нервной деятельности человека, функциональных областей мозга и диагностики различных патологий. Причиной этого является возможность неинвазивного получения данных о процессах, происходящих как в коре головного мозга, так и в глубоких его отделах. При этом МЭГ отличается от распространенной в настоящее время электрической энцефалографии существенно большей чувствительностью и меньшей требовательностью к знанию физической структуры изучаемой системы.

Реальный сигнал МЭГ представляет собой сложный (нерегулярный и нестационарный) временной ряд длиной $10^5 - 10^6$ точек. На протяжении записи, которая длится десятки минут, можно наблюдать переключение между качественно различными типами активности. Например, для синдрома Паркинсона характерна спонтанно возникающая спайкоподобная активность в записи сигнала. В настоящей работе предлагается метод автоматического выделения участков с различным типом поведения из общей записи МЭГ. Представлены результаты, полученные с использованием модельных сигналов различного типа, а также результатов измерений с клинически подтвержденными диагнозами патологии церебральной деятельности у пациентов и с вызванной активностью в записях МЭГ у здоровых испытуемых.

Для выделения полезного сигнала (сигнала с заданными характеристиками) разработан метод, основанный на переходе к спектральному представлению в нескольких базисных системах функций. Используются дискретные полиномы Шарлье, Гана, Кравчука, Майкснера, многочлены непрерывного аргумента Чебышева, Лежандра, Лагерра. Разработан алгоритм выбора оптимального базиса и выделения наиболее информативных признаков, получена зависимость качества классификации и сложности реализации процедур от уровня внешнего шума.

УДК 577.2

Поиск вырожденных тандемных повторов в последовательностях ДНК и оценка их статистической значимости

Боева В.А., Макеев В.Ю.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Вырожденные тандемные повторы часто встречаются в прокариотических и эукариотических геномах. Существует множество примеров, когда функционально важные участки демонстрируют периодическую структуру. Большинство программ, разработанных, для определения тандемно повторяющихся мотивов, недостаточно эффективны для поиска сильно вырожденных повторов. Часто такие повторы трудно отличить от случайного фона, без использования соответствующих статистических критериев.

Мы описали метод, позволяющий находить «точные» и вырожденные тандемные повторы мотивов в последовательности ДНК и оценить их статистическую значимость. Оценка статистической значимости повторяющегося мотива служит для решения двух задач: (i) она помогает отличить сильно вырожденные тандемные повторы от «случайного шума», и (ii) позволяет выбрать один из нескольких повторов, найденных на одном участке последовательности. Значимость оценивается путем подсчета вероятности (p-value) встретить найденные тандемные структуры в случайной последовательности. Для вычисления p-value мы получили и использовали комбинаторные формулы для вероятностей «встретить данный мотив, повторенный не менее чем заданное число раз в случайной последовательности фиксированной длины, при условии что мы его нашли хотя бы раз» (на основе [1]) и «встретить периодическую структуру, аналогичную данной» в случайной последовательности фиксированной длины. Мы рассматривали геометрическую модель распределения букв А,Т,Г,С в последовательности ДНК.

Статистическую значимость можно оценивать, применяя любую из двух формул (например положив Ст.Знач. = $-\log(p\text{-value})$).

Мы воплотили алгоритм в компьютерной программе SWAN, которая ищет сильно вырожденные тандемные повторы.

1. Regnier, M., Presented at BGRS'02; 2002, submitted.

УДК 577.112.6

Введение и снятие N-защитных групп в пептидном синтезе пенициллинацилазой

Буданова Ю.А., Химюк А.Я., Ушаков Г.А., Гуранда Д.Т.

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Исследована возможность ферментативного введения и снятия защиты аминокислотных групп в пептидном синтезе при использовании пенициллинацилазы. В качестве защитных групп рассмотрены традиционные группы ацильного и уретанового типа, а также производные фенилуксусной кислоты (фенилацетил-, Д-фенилглицил-, феноксиацетил-). Реакции ферментативного ацилирования аминокислот методом ацильного переноса и гидролиза их N-ацильных производных, катализируемых пенициллинацилазой, проводили в водных растворах при щелочных (9.5-10) и нейтральных (7.0-7.5) значениях pH, соответственно. Ферментативное введение и снятие феноксиацетильной, Д-фенилглицильной и фенилацетильной групп протекает с высокой скоростью (в этом ряду скорость возрастает от единиц до нескольких сотен обратных секунд в расчете на активный центр фермента). Снятие бензильной карбонильной защиты аминокислотной группы протекает значительно медленнее, а N-ацетильные и N-бензоильные производные аминокислот в данных условиях не гидролизуются. Эффективность исследованных реакций определяется специфичностью фермента к

ацильной части субстрата и его химической природой. Пенициллинацилаза проявляет широкую специфичность по отношению к структуре аминокислоты, и в качестве аминокислоты могут выступать природные аминокислоты, их элементарноорганические аналоги, олигопептиды, аминокислоты, амины. Введение и снятие N-защитных групп при использовании пенициллинацилазы протекает в мягких условиях с высокой скоростью и стереоселективностью, фермент обладает высокой хемоселективностью и не расщепляет пептидные связи, что исключает процессы образования побочных продуктов и рацемизации, которые имеют место при использовании традиционных химических методов.

Работа поддержана Федеральной целевой программой "Интеграция", грант № Я0071-Я0080.

УДК 577.15, 577.151.04

Влияние ионной силы и природы неорганических анионов на кинетику реакций ацильного переноса, катализируемых пенициллинацилазой

Буханов А. Л., Шаповалова И. В., Юшко М. И.

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

В последние годы наблюдается все возрастающий интерес к применению биокаталитических процессов в органическом синтезе. Одним из ярких примеров успешного практического применения ферментов является получение полусинтетических β-лактамов антибиотиков с использованием пенициллинацилазы (ПА). Несмотря на то, что за последние годы в данной области получены впечатляющие результаты, позволившие предложить конкурентноспособные методы ферментативного синтеза ряда полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов, ведется интенсивная оптимизация биокаталитических процессов и изучение различных факторов, влияющих на эффективность синтетических превращений [1,2]. В настоящей работе проведено изучение влияния ионной силы раствора и различных неорганических анионов на эффективность катализируемых ПА реакций ацильного переноса в присутствии добавленного нуклеофила. В частности, проведено определение параметров нуклеофильности 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК) при различных значениях ионной силы раствора и показано существенное ухудшение эффективности ферментативного синтеза при ее возрастании. Обнаружен эффект селективного влияния добавленного аниона на нуклеофильную реакционную способность 6-АПК и получены количественные характеристики влияния ряда распространенных неорганических анионов, таких как галоген-анионы, сульфат, фосфат, нитрат и др., на эффективность биокаталитического превращения. Полученные результаты свидетельствуют о том, что эффект, наблюдаемый в присутствии различных солей, не может быть сведен только к влиянию ионной силы раствора. Факт селективного влияния анионов неорганических солей на реакцию катализируемого ПА переноса ацильной группы на нуклеофил является принципиально новым наблюдением и говорит о потенциальной возможности избирательного связывания данных анионов вблизи активного центра ПА. Работа поддержана грантом РФФИ 03-04-48472

1. Юшко М. И., Буханов А. Л., Шведас В. К., *Биохимия*, 2003, 68, вып. 3, 405-410.

2. M. I. Youshko, N. M. Moody, A. L. Bukhanov, W. H. J. Boosten and V. K. Švedas, *Biotechnol. Bioeng.* 2004, 85 (3), 323-329.

УДК 577.151.042

pH-Стабильность пенициллинацилазы из *Escherichia coli*

Воловик Т. С., Суплатов Д. А., Гуранда Д. Т.

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

Исследована кинетика инактивации пенициллинацилазы из *Escherichia coli* при 25 и 50°C в широком интервале pH. Фермент стабилен в нейтральной среде, однако быстро теряет активность в кислых и щелочных средах. Во всех случаях инактивация описывалась кинетикой реакции первого порядка. Анализ pH-зависимости эффективной константы инактивации указывает на ключевую роль ионных пар для поддержания стабильной конформации пенициллинацилазы. Разрушение солевых мостиков в результате протонирования/депротонирования аминокислотных остатков, образующих ионные пары, обуславливает инактивацию за счет образования нестабильных "кислотных" EH_4^{3+} , EH_3^{2+} , EH_2^+ и "щелочной" E^- форм фермента. При повышении температуры выше 35°C в структуре фермента происходит конформационный переход, который сопровождается разрушением одного из солевых мостиков и изменением каталитических свойств. Значение эмпирической энергии активации гидролиза цветного субстрата p-нитро-м-карбоксиванилида фенилуксусной кислоты двумя конформерами составляет 26 кДж/моль и 40 кДж/моль, соответственно. В рамках предложенной кинетической схемы количественно описано влияние кислотности среды на стабильность пенициллинацилазы. Наблюдаемый процесс инактивации полностью обусловлен инактивацией его кислотных и щелочной форм даже в условиях наибольшей стабильности фермента, когда суммарная концентрация инактивирующихся форм ничтожно мала по сравнению с нейтральной, чрезвычайно стабильной формой. Сравнение стабильности фермента и ряда его мутантов позволило выявить те аминокислотные остатки, которые играют важную роль в обеспечении стабильной конформации активного центра пенициллинацилазы.

Работа поддержана Федеральной целевой программой "Интеграция", грант № Я0071-Я0080.

УДК 577.218.577.577.121.9

Компьютерное предсказание потенциальных участков связывания

Герасимова А. В.

Государственный научный центр ГосНИИГенетика

Известно, что в бактерии *Escherichia coli* регуляторные белки FNR и ArgA отвечают за экспрессию генов, вовлеченных в аэробно-анаэробный метаболизм, однако выступают в качестве активаторов, или репрессоров транскрипции в зависимости от концентрации кислорода. Экспрессия многих генов из генома *Escherichia coli* регулируется совместно и FNR и ArgA. Ген argA входит в регулон FNR в *Escherichia coli*, наряду с генами других глобальных регуляторов, такими, как narL, modE [1].

Участок ДНК, распознаваемый FNR, известен и имеет вид палиндрома TTGATnnnnATCAA [1]. Сайт связывания ArgA представляет собой тандемный повтор GTTAAAnnnnTGTTAA [2].

Целью настоящей работы являлось подробное изучение FNR- и ArcA-регулонов в *Escherichia coli* и других менее изученных организмах.

Стандартными методами сравнительной геномики [3], был проведен поиск потенциально регулируемых генов более чем в двадцати геномах гамма-протеобактерий.

В данной работе впервые проведено попарное сравнение всех геномов внутри семейства. Таким образом нам удалось предсказать потенциальную регуляцию для генов, не имеющих ортологов в *Escherichia coli*, но представленных, например, в *Pasteurellaceae*, или в *Vibrionaceae*.

Наши результаты дают возможность предполагать авторегуляцию гена *arcA* в семействе *Enterobacteriaceae*, а также ArcA-регуляцию генов *fng* и *nqrBCDEF* в группе геномов *Pasteurellaceae*.

Работа выполнена под руководством М.С. Гельфанда и А.А. Миронова.

Мы благодарны А. Фаворову за предоставленное программное обеспечение и Д. Равчееву за полезное обсуждение.

1. Neidhardt F.C., Cellular and Molecular Biology. Washington, 1996, p.217–261.
2. Герасимова А., Макеев В., Гельфанд М., Миронов А., Фаворов А., Биофизика, 2004, (в печати).
3. Mironov A.A., Koonin E.V., Roytberg M.A., Gelfand M.S., Nucleic Acids Research, 1999, 27, p.2981–2989.

УДК 577.3

Влияние параметров МД протокола на динамические свойства водной среды

Голик Д. Н.

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова

Изучались особенности моделирования жидкой воды методом молекулярной динамики. Анализировались различные молекулярно-динамические модели воды при вариации значений параметров и протоколов молекулярной динамики. Основные результаты:

Уменьшение количества молекул воды в капле с 530 до 16 почти не сказывается на плотности, теплоёмкости и средней энергии.

Увеличение шага интегрирования до 1,5 фс практически не сказывается на статистических свойствах системы. При дальнейшем увеличении шага растёт среднее значение и флуктуации энергии. При шаге 2,6 фс система теряет устойчивость.

Как термостат Берендсена, так и баростат Берендсена оказывают на систему весьма неоднозначное воздействие. При переходе от столкновительного термостата к термостату Берендсена флуктуации температуры и энергии увеличиваются в десятки раз, что говорит о нарушении распределения Максвелла – Больцмана по скоростям и энергиям. Функции радиального распределения атомов в термостате Берендсена имеют в несколько раз более высокие и узкие пики, по сравнению с результатами, полученными с использованием столкновительного термостата. Это свидетельствует о сильном торможении термостатом Берендсена поступательно-вращательного движения молекул воды относительно соседних молекул. При варьировании характерного времени термостата Берендсена наблюдалось изменение свойств системы, в то время как столкновительный термостат показал устойчивость к вариации параметров.

При уменьшении времени релаксации баростата Берендсена наблюдались сходные явления: увеличение пиков радиальных функций распределения, увеличение флуктуаций энергии, повышение плотности и уменьшение энергии.

Работа выполнена на кафедре биоинженерии Биологического факультета. Авторы признательны РФФИ (04-04-49645) и Минобрнауки (программа «Интеграция») за поддержку.

УДК 509.68; 681.3.06

Средство быстрой классификации ДНК бактерий

Грехов С.С.

Новосибирский государственный университет

Успехи современной биологии позволили расшифровать последовательности ДНК, кодирующие полные геномы более сотни организмов. Наиболее представительные группы организмов – одноклеточные, представленные бактериями и археобактериями. Исследования таких простейших организмов представляет большой интерес.

ДНК этих организмов представляет собой цепочку нуклеотидов (A,T,G и C), в которой закодирована вся информация, необходимая для функционирования клетки. Некоторые районы ДНК разных бактерий могут быть весьма похожи, так как кодируют сходные РНК или белки. Идентификация этих участков по принадлежности к различным районам одного или нескольких геномов представляет собой актуальную задачу.

Один из возможных вариантов решения проблемы – провести последовательное сравнение этого участка с известными геномами. Однако этот подход достаточно трудоемкий, поэтому в нашей работе предлагается подход к быстрой классификации на основе сравнения частотного состава нуклеотидных подпоследовательностей разной длины.

Для решения было предложено использовать методы дискриминантного и кластерного анализа: классификация с помощью расстояния Махаланобиса [1] и алгоритм CAST, описанный в работе [2]. В работе также обсуждаются некоторые принципиальные аспекты использования упомянутого алгоритма таксономии при решении данной задачи: замена коэффициента корреляции мерами «несходства» и проблема заикливания, обусловленная эвристичностью алгоритма. При тестировании использовались данные о 97 выявленных бактериях и археобактериях. Полученные результаты вполне согласуются с теорией. Разработано программное средство для классификации нуклеотидных последовательностей на основе методов дискриминантного и кластерного анализа. Проведено тестирование программы на реальных данных и получены положительные результаты.

1. Clustering Gene Expression Patterns, A. Ben-Dor, R. Shamir, Z. Yakhini; Journal of Computational Biology, №6, 1999.

2. Факторный, дискриминантный и кластерный анализ (пер. с англ.), Дж.-О. Ким, Ч. У. Мьюллер, У. Р. Клекка, М. С. Олдендерфер, Р. К. Блэшфилд; М. «Финансы и статистика», 1989.

УДК 577.3

Программа для выявления геометрического ядра и классификации пространственных структур эволюционно родственных белков

Грибков М.А.

Московский инженерно-физический институт (Государственный университет)

Трехмерные структуры белковых доменов оказываются гораздо более консервативными, чем их аминокислотные последовательности. Этот хорошо известный факт приводит к мысли о целесообразности проверки эволюционных связей в белковых семействах на основе сравнения трехмерных структур.

Мы представляем метод оценки сходства родственных трехмерных структур белков или ДНК-белковых комплексов и для разбиения их на подсемейства. Представляемый метод основан на оригинальном эвристическом алгоритме нахождения геометрического ядра семейства структур. Геометрическим ядром [1] называется подмножество атомов для каждой структуры, таких, что атомы этих подмножеств находятся во взаимно-однозначном соответствии, и все расстояния между ними приблизительно равны для различных структур.

Представляемый метод реализован в виде программы "LifeCore", открытой через Интернет. Работа программы LifeCore протестирована на ряде семейств и показала хорошие результаты.

Данная работа поддерживается РФФИ (грант 03-07-90157).

1. Gelfand I., Kister A., Kulikowski C., Stoyanov O. "Geometric invariant core for the V(L) and V(H) domains of immunoglobulin molecules" // Protein Eng. 1998, N11, C. 1015-1025.

УДК 577.214.625

Программа поиска повторов и элементов симметрии в последовательностях биополимеров R P ATS.

Друца А.В., Королева О.Н.

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Поиск корреляций между структурой и функцией биополимеров (нуклеиновых кислот и белков) является одной из важнейших задач современной биоинформатики. В ДНК большинства живых организмов часто встречаются гомологичные участки, повторы и элементы симметрии, которые могут нести ту или иную функциональную нагрузку. Для выявления подобного рода структурных особенностей в настоящее время широко используются специальные компьютерные программы. Однако доступные в настоящее время программы не обеспечивают всех потребностей ученых, работающих в области молекулярной биологии и геномной инженерии.

Ранее нами были обнаружены несовершенные (в том числе, перекрывающиеся) повторы в последовательностях сигналов инициации транскрипции (промоторов), узнаваемых РНК-полимеразой *E.coli*. В связи с этим, целью данной работы явилось создание компьютерной программы REPEATS, позволяющей быстро и легко находить такие повторы в составе фрагментов ДНК длиной около 100-200 звеньев. В основу написания программы REPEATS положен известный метод точечных матриц, в котором анализируемая последовательность располагается горизонтально (по оси X) и вертикально (по оси Y). Повторяющиеся в составе последовательности фрагменты будут выглядеть при этом как кластер точек, параллельный основной диагонали матрицы. Для устранения «фона», затрудняющего выявление нужных мотивов, был разработан оригинальный алгоритм, обеспечивающий «фильтрацию» результатов. Программа позволяет находить также палиндромы и элементы зеркальной симметрии.

Анализ более 200 последовательностей промоторов, проведенный с использованием программы REPEATS, подтвердил наличие несовершенных повторов в большинстве структур. Предположительно, такие повторы служат местами контакта промотора с РНК-полимеразой и отражают ее перемещение вдоль фрагмента на начальных стадиях инициации транскрипции.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 01-04-48616).

УДК 577.1

Высокоспецифические субстраты для определения активности пенициллинацилазы из *Bacillus megaterium*

Дыбов А.В., Кудрявцев П.А., Гуранда Д.Т., Швядас В.К.

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Изучен ряд реакций, катализируемых пенициллинацилазой из *Bacillus megaterium*, приводящих к образованию окрашенных продуктов. Определена абсолютная концентрация активных центров фермента методом титрования фенилметилсульфонилфторидом. Определены кинетические параметры (K_M и $k_{кат}$) для девяти субстратов - шести производных фенилуксусной кислоты (п-нитроанилид, п-нитрофениловый эфир, п-нитро-м-карбоксиханилид, п-нитро-о-карбоксиханилид, п-нитро-о-гидроксианилид, м-нитро-п-карбоксиханилид), двух производных D-фенилглицина (п-нитроанилид, п-нитро-м-карбоксиханилид), а также п-нитрофенилового эфира уксусной кислоты (п-нитрофенилацетат). Слежение за остаточной активностью по отношению к разным субстратам в ходе титрования активных центров фермента показало, что изученные соединения являются высокоспецифичными хромогенными субстратами пенициллинацилазы с сильно различающейся реакционной способностью (значение $k_{кат}/K_M$ изменяется в интервале от 10 до 5000 $мМ^{-1} \cdot сек^{-1}$). Эффективность ферментативной реакции существенным образом зависит как от структуры ацильной, так и уходящей групп. Введение карбоксильной группы в мета- или пара-положения хромофора приводит к двойному положительному эффекту: увеличению реакционной способности субстрата и существенному повышению его растворимости, что позволяет проводить определение активности препаратов пенициллинацилазы в условиях насыщения фермента субстратом и, таким образом, увеличить чувствительность и точность спектрофотометрического определения. В качестве наиболее подходящих субстратов для высокочувствительного определения активности препаратов пенициллинацилазы различной степени очистки следует рекомендовать п-нитро-м-карбоксиханилид фенилуксусной кислоты и D-фенилглицина.

Работа поддержана грантом РФФИ 03-04-39012-ГФЕН.

УДК 577.3

Сравнительное изучение динамического поведения аминокислотных остатков в воде, метаноле и столкновительной среде

Егорова К.Б., Левцова О.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Проводилось сравнительное изучение молекулярной динамики природных аминокислотных остатков, связанных для устранения краевых эффектов с С-конца с н-метиламином, а с N-конца с ацетиллом. Изучались также ближайшие гомологи и изомеры природных аминокислотных остатков. Использовалось силовое поле AMBER-99. Была использована модель воды ТРЗР. Параметры для модели метанола находились из квантово-химических расчётов ограниченным методом Хартри-Фока с базисом 6-31ГФ (2d,p). Плотность раствора метанола составляла 0.7928 г/см³. Использовался столкновительный термостат и периодические граничные условия с размером ящика 20x20x20Å. Длины траекторий составляли 20нс (при T = 2000K) и 100нс (при T= 300K).

Динамические характеристики молекулярных структур характеризовались 2D и 3D картами уровней свободной энергии в пространстве торсионных углов [2]. Вводилась Евклидова метрика для определения различий между картами уровней свободной энергии для выявления одноптипных объектов и классификации конформационных степеней свободы. Проводился одномерный кластерный анализ. Для построения кластерного дерева использовался алгоритм поиска минимальных расстояний.

Обнаружено однотипное поведение и сходство структуры карт уровней свободной энергии для большого числа конформационных степеней свободы природных аминокислотных остатков, как в столкновительной среде, так и в растворителях. Сходство в динамическом поведении более выражено в растворителях.

Работа выполнена на кафедре биоинженерии Биологического факультета. Авторы признательны РФФИ (04-04-49645) и Минобразования (программа «Интеграция») за поддержку.

1. K.V. Shaitan, M.D. Ermolaeva, S.S. Saraikin, Ferroelectrics, 2000, N220, С. 205-220.

2. К. В. Шайтан, А. А. Беляков, К. М. Леонтьев, С. С. Сарайкин, М. Г. Михайлюк., К. Б. Егорова, М. В Орлов, Хим. физ., 2003, N 22 (2), С. 57-68.

УДК 577.3

Молекулярная динамика трансмембранных доменов ТМ2 альфа 1 субъединицы глицинового рецептора и бета 2 субъединицы ацетилхолинового рецептора.

Егорова К.Б.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

В работе разработаны новые подходы к молекулярному моделированию мембранных рецепторов. Мембраны моделировались гидрофобной столкновительной средой. Сборка α -спиральных фрагментов осуществлялась с помощью специального углеводородного каркаса. Отдельно изучалась динамика α -спиральных фрагментов при различных температурах (300K и 2000K) [1,2] со следующими параметрами МД протокола: силовое поле AMBER-99; длина траектории 20 нс, столкновительный термостат (частота 55 пс⁻¹, масса - 18 аем) и термостат Берендсена (0.5 пс); радиус обрезания взаимодействий Кулона 20Å, Ван-дер-Ваальса 16Å.

Изучалось динамическое поведение $\beta 2$ субъединицы второго трансмембранного домена никотинового ацетилхолинового рецептора, а также $\alpha 1$ субъединицы второго трансмембранного домена глицинового рецептора. Были взяты аминокислотные последовательности, содержащие 28 остатков и соответствующие внутримембранной части рецептора и 5 остаткам внеклеточной области. Для ацетилхолинового рецептора: EKMTLCISVLLALTVFLLISKIVPPTS, для глицинового рецептора: APARVGLGITVLTMTTQSSGSRASLPK [3,4].

Проведён количественный анализ конформационных состояний аминокислотных остатков. Обнаружена индивидуальность в динамическом поведении остатков пролина и чувствительность других остатков к ближайшему окружению. Проанализировано влияние аминокислотной последовательности и динамических особенностей α -спиральных фрагментов Na и Cl ионных каналов.

Работа выполнена на кафедре биоинженерии Биологического факультета. Авторы признательны РФФИ (04-04-49645) и Минобразования (программа «Интеграция») за поддержку.

I. K.V. Shaitan, M.D. Ermolaeva, S.S. Saraikin, Ferroelectrics, 2000, N220, С. 205-220.

II. К. В. Егорова, К. В. Шайтан, А. У. Ермилов, ИЖС, 2004, N94, С. 219-225

III. V.E. Yushmanov et al, Biochemistry, 2003, N42, P.13058

IV. V.E. Yushmanov et al., Biochemistry, 2003, N42, P. 3989

УДК 507.1

Консервативные взаимодействия гомеодоменов с ДНК в пространственных структурах ДНК-белковых комплексов.

Ершова А.С.

Московский институт сельскохозяйственной биотехнологии

Гомеодомен — это ДНК-связывающий домен, входящий в состав многих эукариотических факторов транскрипции, участвующих в регуляции ключевых процессов развития.

Для связывания с ДНК гомеодомены используют структурный мотив спираль-поворот-спираль (helix-turn-helix, НТН). Гомеодомены очень консервативны по первичной, вторичной и третичной структуре, поэтому можно говорить о единых принципах и механизмах узнавания последовательности нуклеиновой кислоты.

Целью данной работы являлся анализ имеющихся структур комплексов ДНК - гомеодомен для выявления механизмов специфического взаимодействия, поиска консервативных взаимодействий.

В ходе работы были использованы пространственные структуры из банка PDB, программные продукты RasMol, SwissPDBviewer, GenDoc. Анализ гидрофобных взаимодействий производился программой CluD (http://math.belozersky.msu.ru/~mlt/HF_page.html). Проанализировано 39 структур из 9 подсемейств семейств гомеодоменов. Анализировались водородные связи и гидрофобные взаимодействия на интерфейсе белок-ДНК.

Гомеодомен связывается с ДНК, образуя контакты по большой и малой бороздке и с фосфатным остовом.

Были получены следующие результаты.

1. Контакты по большой бороздке ДНК.
 - 1.1 В большой бороздке ДНК всегда наблюдаются гидрофобные ДНК-белковые кластеры. Выделяется несколько консервативных в подсемействах кластеров:
 - а) Val/Ile в позиции 47 образуют гидрофобный кластер с T104. Наблюдается в семействах Antp, En, Eve, MatA1, Msh, NK-2, PAX/Prd, POU.
 - б) Cys/Gln - 50 всегда образует кластер с C200. Кластер 200-50 встречается только вместе с кластером 104-47.
 - в) Ile/Met - 54 обычно образует кластер с A200 или C200. Такой кластер наблюдается в семействах Antp, Eve, MatA1, Tale.
 - г) Arg/Tyr- 454 всегда образует гидрофобный кластер с T/A201.
 - 1.2. Водородные связи в большой бороздке.
 - а) всегда наблюдается консервативная связь Asn51 с A103.
 - б) контакт Gln/Arg-54 с G/A202 характерен для семейств Matalpha2, POU.
 - в) контакт Arg55 с G102 характерен для семейств белков MatA1, Tale
2. Контакты с фосфатным остовом ДНК.

Взаимодействие белка с остовом ДНК происходит за счет образования водородных связей.

 - а) Q/T-6 образует водородную связь с A103. Такая ситуация наблюдается в семействах Antp, En, Eve, Msh, Pax/Prd, POU.
 - б) Lys/Tyr-25 контактирует с 200 остатком ДНК в семействах Antp, En, Matalpha2, Msh, NK-2, POU, Tale.
 - в) Arg/Lys57 взаимодействует с 201 основанием ДНК. Это довольно консервативное взаимодействие наблюдается в семействах Antp, En, Matalpha2, Msh, Pax/Prd, POU, Tale.
3. Контакты по малой бороздке ДНК.

Взаимодействие белка с малой бороздкой ДНК происходит за счет водородных связей.

 - а) Консервативный контакт 5 аминокислотного остатка Arg со 101 основанием ДНК(А, С, Т) характерен для всех семейств белков, кроме Matalpha2.
 - б) Только в семействе Matalpha2 наблюдается водородная связь Arg-7 с А/Т-100

Также надо отметить большую роль связей гомеодомена с ДНК через воду (результаты будут представлены в докладе).

Полученные результаты позволяют сделать выводы о значении различных остатков гомеодомена для специфического узнавания последовательности ДНК. Также по результатам работы для подсемейств гомеодоменов можно предсказать предпочтительность определенных оснований ДНК в узнаваемых ими сайтах.

УДК 577.2

Аминокислотные остатки, образующие специфические контакты между субъединицами при образовании тетрамера мембранного канала GlpF

Калинина О.В.¹, Гельфанд М.С.^{2,3}, Миронов А.А.^{1,2}, Рахманинова А.Б.¹

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,² Государственный научный центр ГосНИИГенетика,³ Институт проблем передачи информации РАН

Бактериальные белки семейства MIP (Major Intrinsic Protein) принято делить на два подсемейства – аквапорины (каналы, проводящие воду) и глицeroаквапорины (каналы, проводящие в основном глицерин). Эти белки функционируют в виде тетрамеров с проводящими каналами в центре каждого мономера. В настоящее время разрешены пространственные структуры нескольких белков семейства MIP, в том числе глицeroаквапорина GlpF из *E. coli* [1].

Ранее нами был предложен метод определения позиций, отвечающих за различия в специфичности к субстрату (*специфичность-детерминирующие позиции, СДП*) для белковых семейств с принципиально сходной функцией [2]. Для тестирования были выбраны семейства, включающие белки с известной пространственной структурой. В случае семейства MIP при наложении предсказанных СДП на пространственную структуру GlpF из *E. coli* [1] оказалось, что большинство аминокислотных остатков, соответствующих СДП, выстилают канал, а пять остатков – 20Leu, 24Phe, 43Glu, 108Tyr и 193Ser – лежат на внешней стороне мономера. В данной работе показано, что эти пять остатков участвуют в образовании потенциальных контактов (расстояние <4.5Å) с другими субъединицами. При этом предсказанные остатки образуют пространственные кластеры двух типов: один кластер, образованный 43Glu из всех четырех субъединиц и 4 одинаковых кластера, образованных 20Leu, 24Ile, 108Tyr из одной субъединицы и 193Ser из другой.

Полученные данные позволяют сделать предположение, что давление отбора на тип аминокислоты в сайтах олигомеризации, скоррелировано с давлением отбора на тип аминокислоты в позициях, обеспечивающей селективность связывания с субстратом. Обнаруженные кластеры СДП позволяют предположить, что мы имеем дело с некими «стыковочными узлами», необходимыми для распознавания правильных партнеров и предотвращения образования химерных олигомеров аквапоринов и глицeroпоринов.

1. Fu D, Libson A, Miercke, LJ, Weitzman C, Nollert P, Krucinski J, Stroud RM., Science, 2000, 290, 481-486.
2. Kalinina OV, Mironov AA, Gelfand MS, Rakhmaninova AB, Protein Sci, 2004, 13, 443-456.

УДК 579.22:579.852.11:577.218

Регуляция биосинтеза внеклеточной рибонуклеазы из *B. amyloliquefaciens* - барназы

Каюмов А.Р., Харитонова М.А.

Казанский государственный университет

Многие бациллы (*B. intermedius*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. circulans*) секретируют гуанилспецифичные рибонуклеазы, гидролизующие РНК до 3'-фосфонуклеозидов, которые могут быть подразделены на биназо- и барназоподобные. Сотрудниками НИЛ ББФ КГУ было показано, что биосинтез биназоподобных РНКаз (биназа, РНКазы Вр) подавляется неорганическим фосфатом (Фн) на 90% и регулируется наподобие генов РНО-регулона *B. subtilis*. Промоторы генов барназоподобных РНКаз (барназы и Vci) обладают высокой степенью гомологии, но синтез этих ферментов исходными штаммами - продуцентами различен. Синтез РНКазы Vci подавляется Фн на 70%, а накопление барназы от Фн не зависит. При этом секреция барназы происходит посттрансляционно и менее эффективно, чем у ряда других секретируемых ферментов бацилл.

Задачей данного исследования является установление вклада промотора (П) и лидерной последовательности (ЛП) в регуляцию экспрессии гена барназы. Для этого были использованы плазмиды с химерными генами, в которых П

барназы состыкован с кодирующей областью РНКазы Вр (pMZ62), биназы (pMZ60), а также ЛП РНКазы Вр заменена ЛП барназы (pMZ61).

Замена ЛП РНКазы Вр на ЛП барназы привела к ~10-кратному снижению РНКазной активности в обедненной и обогащенной Фн средах. В среде без избытка Фн П барназы обеспечивает уровень экспрессии генов биназы и РНКазы Вр, сходный с уровнем барназы в полном гене. В то же время на среде с Фн биосинтез биназы и РНКазы Вр с П барназы понижается вдвое по сравнению со средой без Фн. Это позволяет предположить подверженность П барназы негативной регуляции со стороны Фн, а также нивелирующее влияние неэффективной ЛП барназы на регуляцию биосинтеза на уровне промотора.

Ингибитор транскрипции актиномицин Д (АД) в малых дозах подавляет рост клеток и вызывает увеличение биосинтеза РНО-регулируемых гуанилспецифичных РНКаз в среде без Фн. Приводятся данные о влиянии АД на экспрессию генов РНКаз с промотора барназы.

Работа поддержана грантом РФФИ 03-04-96274

УДК 577.2.

Компьютерный анализ GCN4-регулона дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida albicans*

Ковалева Г.Ю., Makeev В.Ю., Гельфанд М.С.

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

Сайты связывания транскрипционных регуляторов в клетках эукариот очень короткие, и специфичность связывания активаторных белков достигается за счет наличия в регуляторной области гена «кластера сайтов связывания одного типа» [1; 2]. Мы проанализировали кластеризацию сайтов связывания глобального регулятора аминокислотного обмена Gcn4p в регуляторных областях девяти регулируемых генов в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* [3; 4; 5] и в ортологичных им генах из филогенетически далекого организма *Candida albicans*. Несмотря на различия в параметрах, характеризующих описанные кластеры, в большей части исследованных регуляторных областей генов кластеризация сайтов связывания Gcn4p сохраняется, что подчеркивает эволюционную значимость данного феномена. Более того, анализ выборки из более чем ста генов, для которых не было оснований предполагать регуляцию фактором Gcn4p, дает основания сделать вывод о неслучайности кластеризации сайтов связывания Gcn4p в регулируемых им генах.

1. Hertel K.J., Lynch K.W., Maniatis T., Current Opinions in Cell Biology, 1997, N9, С. 350-357.
2. Kim J.G., Takeda Y., Matthews B.W., Anderson W.F., Journal of Molecular Biology, 1987, N196, С. 149-158.
3. Hinnebusch A.G., Natarajan K., Eukaryotic Cell, 2002, N1, С. 22-32.
4. Drysdale C.M., Duenas E., Jackson B.M., Reusser U., Braus G.H., Hinnebusch A.G., Molecular and Cellular Biology, 1995, N15, С. 220-1233.
5. Natarajan K., Meyer M.R., Jackson B.M., Slade D., Roberts C., Hinnebusch A.G., Marton M.J., Molecular and Cellular Biology, 2001, N21, С. 4347-4368.

УДК 543.632.562.1

Новые SH-реагенты для количественного определения энантиомеров аминокислот при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии

Кудрявцев П.А., Химюк А.Я., Гуранда Д.Т.

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Хемоэнзиматическим синтезом, основанным на региоселективном ацилировании аминокислотной группы (S)-цистеина, катализируемом пенициллинацилазой, получены новые тиолы – N-ацильные производные (S)-цистеина (N-фенилацетил-, N-(R)-манделил-, N-(S)-манделил-, N-фенилацетил-(R)-фенилглицил-(S)-цистеин), которых использовали для определения энантиомеров первичных аминокислот методом обращено-фазовой ВЭЖХ с предколонной модификацией о-фталевым альдегидом. Проведено сравнительное изучение предложенных меркаптанов и классического SH-реагента N-ацетил-(S)-цистеина при анализе стереоизомеров аминокислот и нефункционализированных первичных аминов. При модификации НАС хроматография образующихся изоиндолов характеризуется низкой диастереоселективностью и удовлетворительного разделения стереоизомеров удается достичь лишь для некоторых алифатических аминокислот. Применение новых оптически активных тиолов позволяет улучшить хроматографический анализ стереоизомеров аминокислот и провести энантиомерный анализ нефункционализированных первичных аминов. Близкая природа боковых радикалов аминокислотной группы и тиолового реагента способствует разделению диастереомеров.

Определены условия количественной модификации аминокислот. Дериватизация исследованных аминокислот и первичных аминов протекает в течение 10-15 мин. Молярный коэффициент поглощения образующихся изоиндолов одинаков для обоих стереоизомеров аминокислот, не зависит от природы N-ацильной части SH-реагента и составляет $\epsilon_{340} 6000 \pm 100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Образующиеся изоиндольные аддукты обладают высокой стабильностью, что в значительной степени способствует разработке эффективного метода количественного хирального анализа. Метод успешно использовали для определения абсолютной концентрации отдельных энантиомеров аминокислот и первичных аминов в многокомпонентных смесях и в ходе стереоселективных ферментативных реакций.

Работа поддержана Федеральной целевой программой "Интеграция", грант № Я0071-Я0080.

УДК 577.3

Кинематика конформационных переходов природных аминокислотных остатков

Левцова О.В., Егорова К.Б.

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

Методом молекулярной динамики изучаются особенности конформационной подвижности аминокислотных остатков, соединенных с N-конца с ацетильной группой, с C-конца с метиламином. Получены 20 нс траектории для всех 20 остатков как в водной, так и в виртуальной столкновительной среде при 300 и 2000К. Проведено сравнительное исследование кинематики конформационных степеней свободы с использованием автокорреляционных функций

единичных векторов поворота по торсионным углам. Анализ массива данных проводился с помощью построения кластерного дерева. Получены следующие результаты.

1. Кинематика поворотов по торсионным углам в подавляющем большинстве аминокислотных остатков является практически одинаковой несмотря на существенные различия в химическом составе боковых радикалов. Исключение составляют пролин и глицин. Первое обусловлено циклизацией боковой группы. В случае глицина наблюдается сверхподвижность вследствие отсутствия массивного заместителя.
2. В водной среде различие между динамическим поведением аминокислотных остатков уменьшается, что обусловлено, по-видимому, увеличением сил вязкого трения.
3. Наибольшее существенное влияние водная среда оказывает на динамику заряженных аминокислотных остатков.

Работа выполнена на кафедре биоинженерии Биологического факультета. Авторы признательны РФФИ (04-04-49645) и Минобрнауки (программа «Интеграция») за поддержку.

УДК 579.8:576.8

Выделение и характеристика внеклеточных сериновых протеиназ *Bacillus amyloliquefaciens*

Маликова Л.А., Шамсутдинов Т.Р., Марданова А.М., Балабан Н.П.

Казанский государственный университет

В настоящее время активно исследуются бактериальные протеолитические ферменты, что связано с растущими перспективами их использования. Протеазы представляют большой интерес и для фундаментальной науки. Эти ферменты принимают активное участие в процессах индукции клеточного ответа на неблагоприятные условия среды. Исследование спектра протеаз и их свойств позволит получить приоритетные данные о формировании ферментативной системы бактерий в процессе эволюции, а также выявить новые продуценты протеолитических ферментов, имеющих практическую ценность.

Цель данной работы – получение в гомогенном состоянии внеклеточных субтилизинов *Bacillus amyloliquefaciens*, а также характеристика полученных ферментов.

При исследовании динамики роста культуры *Bacillus amyloliquefaciens* и накопления протеиназ обнаружены две фракции, обладающие протеолитической активностью по отношению к специфическому для субтилизинов хромогенному субстрату Z-Ala-Ala-Leu-pNa. Первая фракция - субтилизин 1 - секретируется в начале стационарной фазе роста, вторая - субтилизин 2 - в позднюю стационарную фазу роста культуры. С использованием методов ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе и высокоэффективной жидкостной хроматографии (FPLC) на колонке MonoS получены гомогенные препараты исследуемых ферментов. Степень очистки субтилизинов 1 и 2 составила 284 и 872 соответственно. Методом электрофореза в присутствии SDS-Na определена молекулярная масса ферментов – 30 и 29 кДа для субтилизинов 1 и 2 соответственно.

Исследована специфичность протеиназ по их действию на В-цепь окисленного инсулина. В результате гидролиза обнаружены многочисленные пептидные фрагменты, указывающие на широкую субстратную специфичность фермента, что характерно для типичных субтилизинов.

Исследован аминокислотный состав субтилизинов. Субтилизин 1 состоит из 290, субтилизин 2 – из 284 аминокислотных остатков.

УДК 579.842: 578.81.08

Новые экспрессионные векторы с регулируемым числом копий и индуцируемыми промоторами на основе репликона фага N15

Марданов А.В., Равин Н.В.

Центр «Биоинженерия» РАН

Существующие экспрессионные векторы *Escherichia coli* используют набор регулируемых промоторов, диапазон регуляции которых ограничен: *P_{lac}* и его производные, *araP_{BAD}*, *P_L*. Вследствие этого экспрессионные системы, обеспечивающие максимальный выход продукта, имеют достаточно высокий базовый уровень экспрессии, что может являться проблемой, в случае, если экспрессируемый белок вреден для клетки.

Целью нашей работы было создание экспрессионной системы, имеющей большой диапазон регуляции и низкий базовый уровень экспрессии, за счет сочетания индуцируемого промотора и регулируемого числа копий вектора.

В качестве основы для создания вектора был использован бактериофаг N15, который в лизогенном состоянии не интегрируется в хромосому *E. coli*, а представляет собой линейную плазмиду. В качестве основы для создания вектора мы использовали кольцевую миниплазмиду pNC10, включающую ген *repA*, обеспечивающий репликацию, ген репрессора *cB*, контролирующего ее число копий, и ген устойчивости к канамицину. Для получения экспрессионного вектора, pN15E4, в плазмиде pNC10 была клонирована генетическая конструкция в составе индуцируемого арабинозой *araP_{BAD}* промотора, последовательности Шайна-Дальграно, полилинкера и терминатора транскрипции T0 из фага лямбда. Число копий pN15E4 может увеличиваться от 3-5 до примерно 100-200 на хромосому за счет экспрессии гена антирепрессора. Мы сконструировали штамм *E. coli*, DH10B31sop, в хромосому которого был интегрирован ген антирепрессора N15 (*antA*) под контролем промотора *araP_{BAD}*, а также *sop* оперон фага N15, который обеспечивает стабильное наследование pN15E4 в неселективных условиях за счет правильного распределения реплицированных молекул между дочерними клетками при делении.

Внесение арабинозы в среду одновременно прямо активирует *araP_{BAD}* промотор в pN15E4 и, за счет активации синтеза антирепрессора, приводит к увеличению числа копий вектора, тем самым, увеличивая диапазон регуляции. Мы сравнили максимальный выход продукта и диапазон регуляции синтеза продукта у pN15E4 и стандартного экспрессионного вектора pQE30 (Qiagen), клонируя в них ген флуоресцентного белка *dsRed*. С помощью Вестерн-блот анализа мы установили, что, при приблизительно равном максимальном выходе (20 % общего белка) диапазон регуляции уровня синтеза продукта составляет примерно 100 раз для pQE30 против 2000 раз для pN15E4.

Внеклеточные протеиназы *Bacillus pumilis*

Михайлова Е.О., Суетина О.М., Тимофеева Т.С.

Казанский государственный университет

В экстремальных условиях клетки бацилл активируют разнообразные системы регуляции, направленные на преодоление стрессовых условий, в том числе синтезируют различные гидролитические ферменты. Среди них внеклеточные белки, участвующие в процессах регуляции метаболизма и споруляции. Интерес представляет исследование закономерностей биосинтеза сериновых протеиназ, секретируемых *Bacillus pumilis*.

С помощью хромогенных субстратов в культуральной жидкости *B. pumilis* были обнаружены 2 сериновые протеиназы: субтилизин, активный в отношении хромогенного субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNa, и глутамилэндопептидаза, активная в отношении Z-Glu-pNa. Исследование динамики роста культуры и накопления протеиназ показало, что протеиназы, относящиеся к классу субтилизинов, появляются в культуральной жидкости на 24 час (субтилизин 1) и 46-48 часы роста (субтилизин 2). Глутамилэндопептидаза обнаруживается в культуральной жидкости в незначительных количествах с 14 часа роста культуры и достигает своего максимума на 30 час. Показано, что свободные споры появляются в среде на 40 час роста, на 46-48 часы роста число свободных спор невелико, это свидетельствует о том, что субтилизин 2 представляет собой секретируемый фермент и не накапливается в среде в результате лизиса клеток. Количество свободных спор достигает 70% к 62-64 часам роста. В эти же часы наблюдается увеличение протеолитической и казеинолитической активностей, что, видимо, обусловлено выходом протеиназ из лизировавшихся клеток.

Подобран оптимальный состав среды для эффективной продукции субтилизинов 1 и 2 *B. pumilis*. Для этого проводили двухфакторный эксперимент, в котором исследовали влияние соотношения концентраций двух основных компонентов питательной среды - пептона и неорганического фосфата. Оптимальной концентрацией пептона для субтилизинов 1 и 2 является 50 г/л, неорганического фосфата - 0,3 г/л.

С помощью ионнообменной хроматографии на КМ-целлюлозе и MonoS получены гомогенные препараты субтилизина 2 и глутамилэндопептидазы. Методом электрофореза в ПААГ в присутствии SDS-Na установлено, что молекулярная масса субтилизина 2 равна 30 кДа, а глутамилэндопептидазы - 26 кДа. Выделенные ферменты *B. pumilis* по характеру биосинтеза и молекулярной массе близки к ранее описанным внеклеточным протеиназам *B. intermedius* 3-19.

Сравнительное изучение рН-зависимых каталитических свойств пенициллинацилазы из *E. coli* и *A. faecalis*

Никитин В.А., Чилов Г.Г., Швядас В.К.

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

В работе проводилось изучение рН-зависимых каталитических свойств пенициллинацилазы (ПА) из *E. coli* и *A. faecalis* в реакциях гидролиза различных субстратов. Обнаружено, что экспериментальные зависимости каталитических констант от рН для пенициллинацилазы из *E. coli* не описываются в рамках традиционной кинетической схемы, предполагающей потерю активности при протонировании единственного аминокислотного остатка фермента. Показано, что пенициллинацилаза из *E. coli* сохраняет значительную долю активности в реакциях гидролиза специфических субстратов в кислой области (вплоть до рН3), тогда как рН-зависимость гидролитических свойств ПА из *A. faecalis* свидетельствует о потере активности в кислой среде.

Предложены кинетические схемы, корректно описывающие каталитические свойства фермента в широком интервале рН, предполагающие существование двух активных форм ПА из *E. coli* и одной активной формы ПА из *A. faecalis*. Определены кинетические параметры и значения рК переходов форм из одной в другую, характеризующие предложенную схему. Показано, что протонирование группы ПА из *E. coli* с рК 4.8 приводит к изменению ферментативной активности, а протонирование группы ПА из *A. faecalis* с рК 6.4 приводит к полной потере активности фермента.

Исследована температурная зависимость кинетических параметров в кислой среде рассматриваемых ферментов, рассчитаны энтальпии ионизации каталитически важных групп ПА и энергии активации ферментативного гидролиза. Определены значения кинетического изотопного эффекта для каталитической константы в реакции ферментативного гидролиза для активных форм ПА из *E. coli*. Сделаны выводы о различии гидролитических свойств ПА из различных источников в кислой среде.

Работа поддержана Федеральной Целевой Программой "Интеграция", грант Я0071-Я0080.

Моделирование 3D-структуры и предсказание рН-зависимых каталитических свойств пенициллинацилазы из *Alcaligenes faecalis*

Нилов Д.К., Чилов Г.Г.

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Интересным и важным с практической точки зрения свойством является рН-зависимость активности, проявляемой ферментом. Известно, что широко используемый в промышленном синтезе антибиотиков фермент пенициллинацилаза, выделенный из различных микроорганизмов, обладает существенно различающимися рН-зависимыми каталитическими свойствами. В частности, хорошо изученный фермент из *Escherichia coli* активен в кислой среде, в то время как фермент из *Alcaligenes faecalis* - в щелочной. Для выяснения предпосылок данных различий на молекулярном уровне было предпринято моделирование трехмерной структуры нового фермента и проведен расчет рК его ионогенных групп при помощи программы MM_SCP [1,2], базирующейся на учете влияния микроокружения по методу экранированного кулоновского потенциала. Были сопоставлены трехмерные структуры двух ферментов и их спектры рК, на основе чего были сделаны выводы относительно различий рН-зависимостей каталитических свойств исследуемых пенициллинацилаз.

Работа поддержана грантом РФФИ 03-04-48472

1. Mehler E.L. A Self-Consistent Free Energy Based Approximation to Calculate pH Dependent Electrostatic Effects in Proteins. *J. Phys. Chem.*, 1996, 100, 16006-16018.

2. E.L. Mehler and F. Guarnieri, A Self-Consistent, Microenvironment Modulated Approximation to Calculate pH Dependent Electrostatic Effects in Proteins. *Biophys. J.*, 1999, 77, 3-22.

УДК 577.151

Исследование амидаз из *Rhodococcus rhodochrous*

Перцович С.И., Гуранда Д.Т.

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова

Используемый как биокатализатор для промышленного производства акриламида штамм *Rhodococcus rhodochrous* М8 и производный от него мутант М50 способны утилизировать нитрилы посредством сопряженной работы нитрилгидратазы и амидаз. Нитрилгидратаза из этих штаммов подробно изучена, тогда как сведения о структуре, функциях и видах амидаз неполны и противоречивы. Нами исследована недавно выделенная [1] из М8 (М50) алифатическая амидаза, по-видимому принимающая участие в утилизации нитрилов [2]. Изучение первичной структуры и физико-химических свойств указывает на принадлежность этой амидазы к семейству нитрилаз/цианидгидратаз. Фермент активен в отношении короткоцепочечных линейных амидов. Лучшими нуклеофилами в реакциях ацильного переноса являются полярные небольшого объема молекулы, такие как гидроксилламин и О-метилгидроксилламин. Кинетика ферментативного гидролиза акриламида, имеющего промышленное значение, изучена в широком интервале концентраций субстрата; обнаружены и изучены процессы ингибирования фермента избытком субстрата и продуктом реакции; определена кинетическая схема процесса и соответствующие кинетические параметры. Впервые обнаружено содержание в изучаемых штаммах *R. rhodochrous* по крайней мере еще одной амидазы, обладающей специфичностью в отношении более широкого круга субстратов, в частности – ароматических амидов.

1. Котлова Е.Л., Честухина Г.Г., Астаурова О.Б., Леонова Т.Е., Яненко А.С., Дебабов В.Г. Выделение и первичная характеристика амидазы из *Rhodococcus rhodochrous* // *Биохимия*, 1999, 64, 459-465.

2. Yanenko, A.S., Astaurova, O.B., Gerasimova, T.V., Polyakova, I.N., Pogorelova, T.E., and Pukov, V.N. Regulation of nitrile utilization in *Rhodococcus* // *Proceedings of the Ninth Symposium on the Actinomycetes*, pp. 139-144.

УДК 577.322.5

Моделирование пространственной структуры алифатической амидазы из *Rhodococcus rhodochrous*

Перцович С.И.

Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова

Сравнительное исследование первичной структуры и физико-химических свойств указывает на принадлежность амидазы из *Rhodococcus rhodochrous* М8 (КФ 3.5.1.4) к семейству нитрилаз/цианидгидратаз. Пространственное строение алифатических амидаз из семейства нитрилаз/цианидгидратаз изучено крайне недостаточно; имеются лишь единичные попытки построения теоретических моделей трехмерной структуры [1].

В данной работе модель трехмерной структуры субъединицы алифатической амидазы из *Rhodococcus rhodochrous* М8 была получена методами сравнительного моделирования на основании гомологии с белком NitFhit из нематоды. Алифатическая амидаза из *Rhodococcus rhodochrous* выделена и охарактеризована недавно [2], нами проводится экспериментальное исследование ее физико-химических свойств, функции, каталитического механизма. Моделирование пространственной структуры позволяет значительно повысить эффективность этих экспериментов. Анализ полученной модели позволил предположить строение каталитического центра амидазы, представляющего собой триаду Glu-Lys-Cys. Результаты поиска консервативных блоков и множественного выравнивания позволяют предположить Cys-166 в качестве нуклеофила активного центра. Модель субъединицы использовали также для построения четвертичной структуры амидазы. Предполагается, что четвертичная структура данного фермента имеет решающее значение для каталитического акта.

1. Novo, C., Farnaud, S., Tata, R., Clemente, A., Brown, P.R. Support for a three-dimensional structure predicting a Cys-Glu-Lys catalytic triad for *Pseudomonas aeruginosa* amidase comes from site-directed mutagenesis and mutations altering substrate specificity // *Biochem. J.*, 2002, 365, 731-738.

2. Котлова Е.Л., Честухина Г.Г., Астаурова О.Б., Леонова Т.Е., Яненко А.С., Дебабов В.Г. Выделение и первичная характеристика амидазы из *Rhodococcus rhodochrous* // *Биохимия*, 1999, 64, 459-465.

УДК 577.3

Разработка методов сканирования конфигурационного пространства на примере второй внеклеточной петли β 1-адренорецептора человека

Петров В.Н.

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

Исследование конформационной подвижности и статистических свойств биологических макромолекулярных систем методом молекулярной динамики затруднено в силу большого объема конфигурационного пространства. В качестве способа, позволяющего ускорить его сканирование, может выступать высокотемпературная динамика. Метод высокотемпературного разгона позволяет получить набор стартовых точек, с которых впоследствии могут стартовать траектории, рассчитываемые при нормальной температуре. Ансамбль таких траекторий будет давать статистически достоверную картину в том случае, если отдельные траектории будут сканировать различные части конфигурационного пространства системы.

В работе исследовалась высокотемпературная (100 000 К) динамика второй внеклеточной петли β 1-адренорецептора человека. При возникновении аутоиммунной реакции вторая внеклеточная петля является основной

мишенью для аутоантител, что приводит к потере β -адренергического механизма, вследствие чего снижается фосфорилирование фосфоламбана и уменьшается активность SERCA. При этом замедляется транспорт ионов кальция и уменьшается сократимость сердечной мышцы.

При расчете высокотемпературной динамики использовалось специально измененное параметрическое силовое поле, чтобы система не могла посещать области недоступные для нее при нормальной температуре.

УДК 541.1; 548.31

Анализ зоны контакта рибосомального белка S7 зубактерий и 16S рРНК

Поляков Н.М.

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова

В 2000 году был проведен рентгеноструктурный анализ (РСА) 30S субчастицы рибосомы *Thermus thermophilus* с разрешением 3.3 Å, что прояснило много вопросов о структуре и функции рибосом. Однако полученные данные породили ещё множество вопросов о молекулярном строении рибосом. В данной работе предпринята попытка решения следующей проблемы: подавляющее большинство существующих на сегодня биохимических и генетических данных получены, в основном, для рибосом *E. coli*, а структурные данные имеются только для *Thermus thermophilus*. В качестве способа было выбрано моделирование РНК белковых комплексов на основе известной структуры *Thermus thermophilus* с компонентами из *Escherichia coli*.

В качестве исходного комплекса был выбран комплекс 3'-концевого домена 16S рРНК с рибосомальным белком S7, который играет ключевую роль в биогенезе рибосом. S7 первым связывается с рРНК и инициирует сборку этого домена.

Для комплекса белка S7 с фрагментом домена в составе 30S субчастицы рибосомы *Thermus thermophilus* были аннотированы возможные РНК - белковые контакты. Учитывая высокую степень консервативности контактной зоны (Белок S7 – 78.8% 16S рРНК – 88.4%), можно использовать структуры белков гомологов для построения модели белка S7 *Escherichia coli* и его комплекса с рРНК.

При оценке полученной модели комплекса были обнаружены сверхблизкие расположения атомов (< 2,4 Å, вплоть до 0,2 Å). Для решения возникшей проблемы был использован метод так называемого «отжига» структуры. Этот подход заключается в последовательном использовании протоколов EM (минимизация энергии), SA («Отжиг»), и затем снова EM. Для реализации этого подхода был использован пакет программ Gromacs.

Таким образом, в ходе работы были получены следующие результаты:

1. Методами компьютерного анализа и моделирования *in silico* показано, что два белка-аналога S7 *E. coli* и S7 *Thermus thermophilus* по первичной структуре идентичны на 52%, а в зоне РНК-белковых контактов в 30S субчастице – на 88.3%.
2. Предложена модель структуры белка S7 *E. coli*.
3. Предложены оптимизированные модели структур белков S7 *E. coli* и S7 *T. thermophilus* в комплексе с рРНК.
4. Контакты оптимизированной модели белка S7 *E. coli* хорошо соотносятся с биохимическими данными.

УДК 577.15, 577.152.3

Исследование каталитических свойств и особенностей супрамолекулярной структуры поперечно-сшитых агрегатов пенициллинацилазы

Пчелинцев Н.А., Юшко М.И., Швядас В.К.

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Биокаталитические реакции все в большей степени используются в химическом синтезе. Одним из широко используемых ферментов (прежде всего для получения бета-лактамовых антибиотиков) является пенициллинацилаза. В связи с этим, разработка новых стабилизированных препаратов пенициллинацилазы представляет большой интерес, поскольку использование свободного фермента в промышленных масштабах экономически нецелесообразно. В настоящей работе проведено изучение каталитических и физико-химических свойств весьма перспективного класса препаратов иммобилизованной пенициллинацилазы – поперечно сшитых агрегатов фермента (ПСАФ)[1]. В частности, были охарактеризованы свойства двух различных препаратов ПСАФ: «свежих» (агрегаты фермента сшили сразу после их образования) и «зрелых» (агрегаты фермента сшили по прошествии недели с момента их образования). Показано, что по каталитическим свойствам «зрелые» ПСАФ превосходят «свежие» препараты: они характеризуются более высоким сродством к субстрату (более низкой константой Михаэлиса) и более высокой каталитической активностью. Кроме того, в реакции ферментативного синтеза ампициллина при использовании «зрелых» ПСАФ наблюдается более эффективный синтез антибиотика и образуется меньше побочного продукта гидролиза. Показано также, что иммобилизация пенициллинацилазы путем образования ПСАФ приводит к значительному увеличению стабильности (по сравнению с нативным ферментом) при высоких значениях pH, что позволяет использовать такой препарат пенициллинацилазы в реакции ацилирования нефункционализованных аминов в водной среде и делает его пригодным для разделения индивидуальных энантиомеров аминсоединений. В результате исследований ПСАФ при помощи конфокальной флуоресцентной микроскопии установлено, что поперечно-сшитые агрегаты пенициллинацилазы имеют упорядоченную супрамолекулярную структуру, характеристики которой зависят от пути получения агрегатов: для «зрелых» ПСАФ характерна более упорядоченная структура, в то время как в структуре «свежих» препаратов имеются аморфные области.

Работа поддержана грантом ИНТАС 2001-0673

1. Cao L., van Rantwijk F., Sheldon R.A. *Organic Letters*, 2000, 10(2), 1361-1364.

УДК 577.218, 577.121.9, 579.22

Исследование регуляции нитрат-нитритного дыхания гамма-протеобактерий методами сравнительной геномики

Равчеев Д.А., Рахманинова А.Б.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Гамма-протеобактерии, как и многие другие микроорганизмы, способны к существованию как в аэробных, так и в анаэробных условиях. В случае анаэробного дыхания предпочтительными акцепторами электронов являются нитрат и нитрит. Физиология данного процесса изучена лишь для энтеробактерии *Escherichia coli*, где переключение на нитрат-

нитритное дыхание в осуществляется с помощью двух гомологичных двукомпонентных систем: сенсорных белков NarG и NarX и регуляторных белков NarP и NarL. [1].

Целью нашей работы было исследовать структуру как самого метаболического пути, так и системы его регуляции в различных микроорганизмах из группы гамма-протеобактерий. Для этой цели мы использовали различные методы сравнительной геномики [2].

Поиск ортологов для регуляторных белков показал, что в 23-х различных геномах гамма-протеобактерий присутствует как минимум одна из двух регуляторных систем. Поскольку данные о сайтах связывания NarL весьма противоречивы и присутствие удвоенной регуляторной системы сильно усложняет задачу, то исследовались геномы, содержащие только NarP, сайт связывания которого представляет собой инвертированный повтор, имеющий консенсусную последовательность TACYUMT-2-AKRRGTA (Y=C/T, M=A/C) [3].

Результаты поиска консервативных сайтов перед ортологичными и функционально аналогичными генами в различных геномах позволяют сделать следующие выводы:

1. В геномах, где присутствует только NarP, данный регулятор контролирует экспрессию генов всей системы нитрат-нитритного дыхания, тогда как в *E. coli* эта функция распределена между двумя регуляторами.
2. Выявлены новые члены NarP-оперона:
 - а) Общие для нескольких групп организмов – гены синтеза кофактора для редуктаз *moaABCDE*, фуаразы *fumC/aspA* и терминальных редуктаз *uesK-bisZ* и *cydAB*. Специфичные для бактерий семейства *Pasteurellaceae* – гены NADH и 2-оксоглутарат дегидрогеназ *nqrBCDEF* и *sucAB*, соответственно, факторов транскрипции *fng* (глобальная регуляция анаэробного дыхания) и *gcvA* (синтез кофакторов).
 - с) Специфичные для бактерий семейства *Vibrionaceae* – гены самих регуляторных белков данной системы *narQP* (ауторегуляция) и сульфит-редуктазы *cysJIIH*. В дальнейшем планируется исследование данной регуляторной системы в геномах организмов, содержащих оба регулятора.

1. Neidhardt F.C., Cellular and Molecular Biology. Washington, 1996, p.217–261.
2. Mironov A.A., Koonin E.V., Roytberg M.A., Gelfand M.S., Nucleic Acids Research, 1999, 27, p.2981–2989.
3. Darwin A.J., Tyson K.L., Busby S.J., Stewart V., Molecular Microbiology, 1997, 25 p.583–595.

УДК 577.2.01

Поиск белков–мишеней циклопентеновых простагландинов

Решетников Р.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Циклопентеновые простагландины (цПР) образуются в организме животных и человека при развитии воспалительных процессов. Эти вещества обладают антипролиферативной и противовоспалительной активностью и могут быть использованы как лекарственные средства нового класса. Механизм их действия в настоящее время интенсивно исследуется. В работе была поставлена задача выявления возможных белков–мишеней действия этих веществ сравнением первичных последовательностей известных белков–мишеней (так называемые PPAR, которые относятся к группе ядерных рецепторов) с другими функционально похожими белками (рецепторы стероидных, тиреоидных гормонов, ретиноевой кислоты).

Использованы программы: ClustalW и AliBee (множественное выравнивание), GeneDoc и TreeView (визуализация выравниваний), Vector NTI Suite 8 (обработка трехмерных структур). Мы сравнили PPAR с другими белками семейства ядерных рецепторов, исключили консервативные участки, ответственные за реализацию функций белков как ядерных рецепторов, и выделили зоны, ответственные за связывание цПР. Дальнейший поиск гомологов осуществляли в банке доменов ProSite. Найдены новые белки, потенциально способные связывать цПР: 1) Ингибиторы α, β фактора транскрипции NF- κ B (AC в SwissProt P25963, Q15653); 2) ДНК–полимеразы β, ϵ (AC в SwissProt P06746, Q07864); 3) Бифункциональный белок биосинтеза пурина (AC в SwissProt P31939); 4) Калиевый потенциалзависимый канал (AC в SwissProt Q9UJL8).

Таким образом, результаты исследования определяют дальнейшие пути изучения взаимодействия цПР с белками–мишенями этих веществ, и, как следствие, разработки лекарственных препаратов для лечения острых и хронических воспалительных заболеваний, терапии рака.

УДК 577.1, 519.68

Разработка структуры хранения и организация синхронизации информации по повторяющимся нуклеотидным последовательностям в человеческом геноме

Сальников А.Н.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Нуклеотидная последовательность человеческого генома расшифрована почти полностью, однако упорядочение последовательности и ее аннотирование продолжают. Существует некоторое количество хорошо известных хранилищ информации по нуклеотидным последовательностям организмов, например: EMBL (<http://www.embl.org>), Ensembl (<http://www.ensembl.org>), GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и др. Однако вследствие того, что это большие хранилища данных и всё в них устроено достаточно сложно, извлечение информации из них затруднено ввиду ограниченных возможностей составления запросов, представляемых веб-интерфейсом, большого числа обращений к их серверам. Кроме всего прочего, архивные базы данных генетического материала мало приспособлены для внесения новых данных о специфических объектах в геномах. В этой связи возникает необходимость в создании специальных, тщательно структурированных и регулярно обновляемых баз данных с интуитивно понятным для молекулярного биолога интерфейсом.

В качестве реализации предлагаемого подхода была создана небольшая база данных, предназначенная для хранения одного из типов повторяющихся в геноме человека последовательностей – так называемых длинных терминальных повторов (long terminal repeats, LTR), являющихся следами древних инвазий геномов ретровирусов в геном человека. В данной базе (<http://math.genebee.msu.ru>) содержатся сведения об одном из классов длинных терминальных повторов – классе LTR5 – из банков данных MBL, ns MBL; при этом производится автоматическое программное отслеживание изменений информации о собранных LTR5 в этих банках данных. Основу информации составила коллекция LTR5, собранная группой Ю.Б. Лебедева в институте биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова. В представляемой базе данных содержится не только информация о самих LTR5, но также информация о соседстве оных с генами, с другими повторяющимися объектами в человеческом геноме. Предусмотрена информация о семействах LTR5

и представленности их у приматов. Предоставляются достаточно богатые возможности по поиску LTR5 в разрабатываемой базе.

Данная работа проводится как часть проекта института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ и Людвиговского института раковых исследований "**Ludwig Institute for Cancer Research**", грант CRDF RB01277-MO-2.

УДК 577.152.352.544.18

Исследование каталитического механизма действия N-концевых гидролаз методами квантовохимического моделирования

Сидорова А.В., Чилев Г.Г., Швядас В.К.

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Особенностью N-концевых гидролаз, недавно обнаруженной группы ферментов, является то, что их активный центр лишен аминокислотных остатков, входящих в классическую каталитическую триаду и обеспечивающих эффективную цепь передачи протона в реакции ацильного переноса. Это обстоятельство делает неочевидным механизм, по которому протекает реакция, катализируемая пенициллинацилазой и требует более детального изучения.

Целью настоящего исследования является моделирование методами квантовой химии т.н. последовательного каталитического механизма - одного из возможных механизмов действия ферментов, аналогичных пенициллинацилазе. Все квантовохимические расчеты осуществлялись при использовании программного комплекса PC Gamess¹ в ограниченном методе Хартри-Фока (ОХФ) в валентно расщепленном базисе 6-31+G** (ОХФ/6-31+G**), а также с учетом электронной корреляции методом теории возмущений Меллера-Плессе второго порядка в базисе 6-31+G** (МП2-ОХФ/6-31+G**).

Для модельной системы, включающей только основные аминокислотные остатки активного центра впервые показана возможность последовательного механизма, протекающего через образование тетраэдрического интермедиата без участия мостиковой молекулы воды. Определены стационарные состояния на поверхности потенциальной энергии, их энергетические и геометрические характеристики. Показана принадлежность всех найденных стационарных состояний единому энергетическому пути.

Таким образом, в ходе работы был посчитан энергетический профиль реакции протекающей по двухстадийному механизму через тетраэдрический интермедиат, где первому переходному состоянию отвечает полный перенос протона на аминогруппу серина, второму – перенос протона на аминогруппу субстрата.

Работа поддержана Федеральной Целевой Программой "Интеграция", грант Я0071-Я0080.

УДК 577.151.02

Изучение участка связывания нуклеофила в активном центре пенициллинацилазы из *E. coli* методами молекулярного моделирования

Строганов О.В., Чилев Г.Г., Швядас В.К.

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Исследован начальный этап стадии ацильного переноса на внешний нуклеофил, катализируемого пенициллинацилазой: образование комплекса ацилфермента с нуклеофилом 6-аминопенициллановой кислотой (6-АПК). Исходя из рентгеноструктурных данных (pdb ID 1FXV, 1GM9) получены структуры свободного фермента, ацилфермента, фермент-субстратного, а также ацилфермент-нуклеофильного комплексов в растворе и рассчитаны молекулярно-динамические траектории длиной 7-10 нс. Сравнение конформаций показало, что связывание нуклеофила в продуктивной конформации сопровождается полным вытеснением воды из активного центра. Установлено, что связывание с нуклеофилом индуцирует структурные изменения, вызывающие стабилизацию реакционноспособной конформации фермента: уменьшается среднеквадратичная флуктуация остатков активного центра, 'горлышко' гидрофобного кармана увеличивает свой диаметр с 4.2-4.6 Å до 5.6-6.4 Å. Показано, что исходные pdb-структуры фермент-субстратных комплексов некорректно описывают взаимодействие субстрата с ферментом: отсутствуют водородные связи между β-лактаманной частью субстрата и ферментом, карбоксильная группа субстрата не образует энергетически выгодного контакта с положительно заряженными остатками Arg активного центра. В ходе молекулярно-динамических расчетов субстрат неизменно отходил от исходного положения в pdb-структуре и связывался с остатками боковой поверхности воронки, на дне которой расположен активный центр. На основании анализа энергий взаимодействия нуклеофила с ферментом выявлены аминокислоты, отвечающие за связывание. Рассчитаны свободные энергии связывания субстрата и нуклеофила (10 ккал/моль и 8 ккал/моль, соответственно). Методом молекулярного докинга с последующей молекулярной динамикой проведен анализ возможных непродуктивных конформаций комплекса ацилфермент-нуклеофил. При непродуктивном связывании 6-АПК располагается между двумя остатками Arg263β и Arg145α, не допускает присоединения второй молекулы нуклеофила с образованием реакционного комплекса, однако делает возможным свободный доступ молекулы воды к ацилированному остатку фермента, обеспечивая возможным протекание гидролиза.

Работа поддержана грантом РФФИ 03-04-48472

УДК 577.3

Динамика изменения размеров эритроцитов в биологических суспензиях

Терешкин Э.В., Лобков А.Ф.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Клеточный объем является показателем функционального и структурного состояния клетки [1]. Имеются указания на то, что изменение клеточного объема может активировать или ингибировать ионотранспортные системы. С другой стороны, некоторые физиологические процессы влияют на клеточные размеры [1].

¹ PC Gamess, <http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html>

В настоящее время методы, позволяющие наблюдать кинетику изменения клеточных размеров с высоким разрешением, развиты недостаточно, что делает актуальным их развитие. В данной работе используется многоцелевая аналитическая система (лазерный цитомонитор), которая представляет собой комплекс методических и технических средств, работающих в автоматическом режиме [2,3]. В основу системы положен известный метод малоуглового рассеяния света на взвешенных в различных жидких средах малоразмерных объектах. Метод лазерного цитомониторинга позволяет получить функции распределения частиц по размерам и проследить их эволюцию во времени.

Данные эксперименты посвящены методическим вопросам определения кинетики функций распределения по размерам на биологических объектах. В качестве экспериментального материала выбраны нормальные эритроциты человека. Особенности строения и доступность получения этих клеток делают их удобным объектом для изучения. Измерения проводили при осмотичности трис-буфера 230 мОсм. Раствор буфера также содержал ортованадат натрия Na_3VO_4 1 мМ и Ca^{2+} 2 мМ. Как известно, ортованадат натрия является ингибитором кальциевого насоса эритроцитов. Инкубация эритроцитов с ортованадатом натрия вызывает накопление Ca^{2+} , дегидратацию и сжатие клеток. Была прослежена кинетика функций распределения эритроцитов по размерам в течении 60 минут с временным разрешением 30с. Полученные результаты показывают, что метод лазерного цитомониторинга позволяет наблюдать кинетику изменения размеров клеток с высоким временным разрешением. Работа выполнена на кафедре биофизики и кафедре биоинженерии биологического факультета.

1. Lang F., Busch G.L., Ritter M., Volkl H., Waldegger S., Gulbins E., Haussinger D., *Physiol. Rev.* 1998, V. 78, p. 247-306.

2. Шайтан К.В., Лобков А.Ф., Тимофеев И.Б., Лисовская И.Л., Чижов А.А., Терешкин Э.В., *Биологические мембраны* 2002, т.19 No 3, с. 210-218.

3. Шайтан К.В., Лобков А.Ф., Тимофеев И.Б., Чижов А.А., Терешкин Э.В., *Исследовано в России* 2002, №115, с.1265-1278

УДК 577.3

Динамическая гетерогенность полностью гидратированного липидного бислоя и молекулярная динамика трансмембранной диффузии

Турлей Е.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Методом молекулярной динамики (МД) моделировался бислой 1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолина (ПОФХ). Исследуемая система содержала 44 молекулы воды на молекулу ПОФХ. Изучалось взаимодействие с мембраной и трансмембранный транспорт аминокислотных остатков, ван-дер-ваальсовских сфер и углеродной нанотрубки (диаметр 13,5 Å, длина 35 Å, тип укладки атомов – кресло). Расчёт велся в силовом поле Amber99^с. Модель воды TIP3P. Использовались термостат на основе виртуальной столкновительной среды, периодические граничные условия, NPT ансамбль при анизотропном давлении, баростат Берендсена.

Силовое поле и МД протокол обеспечивали соответствие наиболее важным экспериментальным параметрам: поверхностной плотности липидов и толщине бислоя, профилям плотности и параметрам порядка в бислое.

В мембране по результатам МД наблюдается как структурная, так и динамическая гетерогенность. Для изучения особенностей динамического поведения гетерогенных структур использован метод управляемой молекулярной динамики (аналогичный Steered MD). К отдельным частицам прикладывалась внешняя сила. Скорость проникновения и движения молекул в мембране зависит от отношения величины силы к вязкости бислоя. Из соотношения Стокса-Эйнштейна оценивались значения микровязкости мембраны и коэффициентов диффузии молекул.

Полученные результаты свидетельствуют о неньютоновском характере среды и слабой неравновесности данной системы при скоростях движения порядка 1-10 Å/пс и находятся в согласии с имеющимися усредненными экспериментальными результатами. Следует отметить, что вязкость в центральной части бислоя в несколько раз меньше усредненного значения.

Работа выполнена на кафедре биоинженерии Биологического факультета. Авторы признательны РФФИ (04-04-49645) и Минобрнауки (программа «Интеграция») за поддержку.

УДК 577.3

Влияние силового поля и начальных параметров на динамику фолдинга

Федик И.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Методом молекулярной динамики исследуется образование пространственных структур модельными полимерными цепями. Используются неразветвленные свободно сочлененные цепочки разной длины с парными взаимодействиями Леннарда-Джонса. Изучалось влияние параметров взаимодействий и начальной конфигурации системы на результат фолдинга. Были получены следующие результаты.

Результат фолдинга оказался весьма чувствительным к начальной конфигурации цепи. Зародышами образования структуры являются концевые участки цепи, а также участки с большой кривизной. Тип пространственной структуры зависит от эффективного размера мономерных звеньев. При определенных значениях параметров взаимодействия обнаружены трехмерные структуры, подобные основным элементам вторичной структуры белков и нуклеиновых кислот, в системе из двух взаимодействующих цепей образуются двойные спирали.

В работе исследовалось также образование трехмерных структур при взаимодействии полимеров с нанотрубками. В результате вычислительных экспериментов получено следующее.

Нанотрубка, затягивая полимерную цепь, может развернуть уже сформировавшуюся компактную структуру. При определенных значениях параметров парных взаимодействий полимер может образовывать внутри нанотрубки упорядоченные структуры. Возможна также спонтанная перестройка упорядоченной структуры при проходе цепи через нанотрубку.

Работа выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета. Авторы признательны РФФИ (04-04-49645) и Минобрнауки (программа «Интеграция») за поддержку.

УДК 577.152.351

Закономерности реакций ацильного переноса, катализируемых пенициллинацилазой из *Alcaligenes faecalis*

Фесько Е.Н., Химюк А.Я., Тарасов А.В., Ёлкин П.Г., Гуранда Д.Т.

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Исследованы кинетические закономерности реакций ацильного переноса, катализируемых пенициллинацилазой из *Alcaligenes faecalis*, на широкий круг аминокислот. В качестве донора ацильной части использовали амиды D-фенилглицина, фенилуксусной, феноксиуксусной, D- и L-миндальных кислот, а в качестве нуклеофила – алифатические и ароматические амины, аминокислоты, аминокислоты. Выявлены особенности ацилирования разных классов аминокислот. В частности, показано, что при ацилировании аминов и аминокислот, в отличие от аминокислот, реакционная способность нуклеофила (соотношение скоростей накопления продукта переноса N-ацильной группы донора на нуклеофил и продукта гидролиза донора ацильной группы) линейно возрастает с увеличением его концентрации, а скорость реакции ацильного переноса на нуклеофил в несколько раз превышает скорость гидролиза наиболее «быстрых» специфических субстратов пенициллинацилазы.

Установлены «минимальные» кинетические схемы ацилирования аминов, аминокислот и аминокислот под действием пенициллинацилазы; найдены значения ключевых кинетических параметров реакций ацильного переноса. Определена энантиоселективность реакций ацильного переноса. Показано, что как эффективность, так и стереоселективность реакций ацилирования, катализируемых пенициллинацилазой, очень сильно зависят от структуры донора ацильной части. Использование подходящего донора позволяет существенно повысить эффективность переноса ацильной группы на нуклеофил и увеличить стереоселективность процесса. Реакции ацильного переноса, катализируемые пенициллинацилазой в водной среде, протекают очень быстро, регио- и стереоселективно, и могут быть успешно использованы для получения индивидуальных энантиомеров аминокислот.

Работа поддержана Федеральной целевой программой «Интеграция», грант № Я0071-Я0080.

УДК 577.113.6; 577.212.2

Особенности транскрипции, иницируемой с близко расположенных промоторов

Ходак Ю.А., Королева О.Н., Друца В.Л.

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Известно, что регуляция экспрессии генов в бактериях происходит в основном на уровне транскрипции - синтеза РНК на матрице ДНК. В геноме бактерий многие сигналы инициации транскрипции расположены в непосредственной близости друг от друга, и их работа взаимно скоординирована. Механизмы такой координации, а также эволюционное происхождение таких систем в большинстве случаев неясны.

Целью настоящей работы являлось создание модельных систем, позволяющих изучать особенности транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой *E.coli* с близко расположенных промоторов. Для этого генно-инженерными методами с использованием синтетических фрагментов ДНК был создан ряд плазмидных конструкций, содержащих два (или более) различным образом ориентированных консенсусных промотора. Методом химического и биохимического футпринтинга изучена топография комплексов РНК-полимеразы с полученными ДНК-конструкциями, исследован характер транскрипции *in vitro* и *in vivo*. Показано, что близко расположенные дивергентные сигналы конкурируют за связывание с ферментом, что приводит к снижению активности каждого из них. В случае tandemного расположения промоторов также наблюдается конкуренция, однако общий уровень активности в направлении транскрипции выше уровня, характерного для монопромоторной конструкции. При этом наблюдается накопление укороченных продуктов, связанных, по-видимому, с тем, что две молекулы РНК-полимеразы служат физическим препятствием друг для друга при элонгации. Аналогичное явление – наличие продуктов преждевременной «терминации» транскрипции – наблюдается и в случае конвергентных конструкций. Это свидетельствует о возможности столкновения двух молекул РНК-полимеразы, стартовавших одновременно с двух направленных навстречу друг другу промоторов. Таким образом, само по себе взаимное расположение промоторов может служить регулирующим фактором.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 01-04-48616).

УДК 577.3

Влияние модификации хиральной структуры аминокислотных остатков на конформацию пептидов на примере препарата Семакс

Цветков В.Б.

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

В работе изучалось изменение вероятностей реализации конформаций гептапептида (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) при модификации хиральной структуры аминокислотных остатков. Как известно данный пептид используется в качестве лекарственного препарата Семакс, обладающего ноотропным и нейропротекторным действием. Семакс усиливает избирательное внимание при обучении и анализе информации, улучшает консолидацию памятного следа; улучшает адаптацию организма к гипоксии, церебральной ишемии, наркозу и другим повреждающим воздействиям. Препарат влияет на процессы, связанные с формированием памяти и обучением. Действующее начало семакса является 4-7 фрагментом адренкортикотропного гормона (АКТГ), который не проявляет гормональной активности. Известно, что функциональная активность препарата меняется при модификации хиральной структуры отдельных аминокислотных остатков. Это может представлять непосредственный интерес с точки зрения механизма действия. Методами молекулярной динамики изучались конформации функционально активной части семакса Met-Glu-His-Phe. Использовалось силовое поле «AMBER 99» и комбинация столкновительного термостата и термостата Берендсена (при T=300 и 2000K). Длина траекторий составляла 10 нс. Вычислялись распределения вероятности тетрапептидов по конформациям при модификации хиральной структуры аминокислотных остатков. Анализировались 2D и 3D карты уровней свободной энергии, авто- и кросскорреляционные функции для торсионных углов.

В рамках метода теоретического конформационного анализа анализировалось строение многомерной энергетической поверхности пептидов. Рассматривались двумерные проекции гиперповерхностей уровней конформационной энергии без учета дальних атом-атомных взаимодействий на плоскость углов Φ и Ψ торсионных углов (углов поворота относительно связей $N_i - C_i^\alpha$ и $C_i^\alpha - C_i$) аминокислотного остатка.

Работа выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета. Авторы признательны РФФИ (04-04-49645) и Минобразования (программа «Интеграция») за поддержку.

УДК: 577.322.4; 573; 577.32; 577.332

Оценка подвижности аминокислотных остатков при образовании хромофора мономерного красного флуоресцентного белка mRFP1

Цой О.В., Волик Н.А., Дмитриенко Д.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Молекулярная динамика в настоящее время является важным источником информации о конформационной подвижности групп атомов в структуре биополимеров [1]. Методы получения пространственных моделей молекул при отсутствии рентгеноструктурных данных предлагает биоинформатика [2]. Цель данной работы состояла в построении трехмерной структуры апо-формы перспективного мономерного красного флуоресцентного белка mRFP1 [3] и оценке подвижности аминокислотных остатков при образовании хромофора методом молекулярной динамики.

Полученные нами результаты изложены в следующих пунктах:

1. Полученная на основании гомологии оптимальная пространственная модель апо-формы mRFP1 обладает повышенным температурным показателем (B-Factor)

2. Показано наличие корреляций величин углов между атомами, входящими в аминокислотные остатки прециклизованного хромофора.

3. Проведена количественная оценка подвижности атомных групп апо-хромофора.

1. Шайтан К.В., Соросовский Образовательный Журнал. 1999. №5. С.8-13.

2. Lund O., Nielsen M., Lundegaard C., Worning P., Abstract at the CASP5 conference, 2002, A102

3. Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY, Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Jun 11;99(12):7877-82