

## СЕКЦИЯ «БИОИНЖЕНЕРИЯ И БИОИНФОРМАТИКА»

### ПОДСЕКЦИЯ «БИОИНЖЕНЕРИЯ»

#### **Окислительный стресс вызывает изменения в морфологии митохондриального ретикулума в клетках линии HeLa**

*Кузнецова Анастасия Юрьевна<sup>1</sup>, Непряхина Ольга Константиновна<sup>2</sup>  
1-студент, 2-аспирант*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет  
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия*

*<sup>1</sup>E-mail: anastaeae@gmail.com*

Активные формы кислорода (АФК) играют важнейшую роль во многих внутриклеточных процессах. В небольшом количестве они необходимы для нормального функционирования многих сигнальных систем клетки, однако избыточное образование АФК приводит к повреждению клеточных липидов, ДНК и белков. Основным источником АФК могут быть Комплекс I и Комплекс III дыхательной цепи митохондрий.

Мы исследовали реакцию митохондрий на окислительный стресс, вызванный пероксидом водорода. Для исследования количества АФК в клетках мы использовали флуоресцентный индикатор АФК DCF (6-карбокси-2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат). Флуоресценцию анализировали с помощью проточного цитофлуориметра. Полученные данные свидетельствуют о повышении количества АФК в клетках, обработанных пероксидом водорода. Ингибитор дыхательной цепи миксотиазол (ингибитор Комплекса III дыхательной цепи) в сочетании с пероксидом водорода увеличивает генерацию АФК. Таким образом, можно предполагать, что в этих условиях источником АФК в клетках являются начальные участки дыхательной цепи митохондрий.

Митохондриальный ретикулум является динамичной структурой и может выступать как индикатор окислительного стресса. Нами было показано, что при обработке клеток линии HeLa пероксидом водорода митохондрии фрагментируются. Этот эффект усиливался в присутствии миксотиазола. Более длительная инкубация с указанными веществами вызывала гибель клеток. Чтобы исследовать источник АФК, играющий ключевую роль в этом процессе, мы использовали митохондриально направленные антиоксиданты MitoQ (10-(6'-убихинолил)децилтрифенилфосфоний) и его аналог SkQ. Инкубация с SkQ и MitoQ предотвращала фрагментацию митохондрий и последующую гибель клеток, индуцированную пероксидом водорода и пероксидом водорода в комбинации с миксотиазолом.

Таким образом, можно полагать, что АФК, образующиеся в самих митохондриях при окислительном стрессе, могут служить индуктором фрагментации митохондриального ретикулума и последующую гибель клеток.

### **Создание модельных и лекарственных полимерных систем на основе поли-3-оксибутирата**

*Бонарцев А.П.\**, *Махина Т.К.\*\**, *Мышкина В.Л.\*\**, *Босхомджиев А.П.\*\**, *Лившиц В.А.\*\**,  
*Иванов Е.А.\*\**, *Постников А.Б.\**, *Николаева Д.А.\*\**, *Воинова В.В.\**, *Иорданский А.Л.\*\**,  
*Бонарцева Г.А.\*\**, *Медведева Н.А.\**

*научный сотрудник, к.б.н.*

*\*Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия; \*\*Институт Биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва, Россия*  
*ant\_bonar@mail.ru*

В последнее десятилетие идет интенсивная разработка и исследование систем контролируемого высвобождения (СКВ) фармакологически активных веществ (ФАВ). Особенно активно развивается направление создания лекарственных систем долговременного направленного действия антипролиферативных и противовоспалительных ФАВ на различные патологические органы и ткани с использованием СКВ из биосовместимых и биоразлагаемых полимеров. Однако, помимо создания лекарственных систем для медицины и фармакологии СКВ могут быть использованы в фундаментальной науке для создания новых моделей долговременного локального воздействия селективных ФАВ (ингибиторов и активаторов ферментов, агонистов и антагонистов рецепторов) на различные ткани и органы. В настоящее время в качестве полимерного материала для создания СКВ широко используются синтетические биodeградируемые полимеры: полилактиды и полигликолиды. Однако, их использование сопряжено с рядом трудностей, связанных с низкой биосовместимостью этих полимеров, что объясняется развитием иммунного ответа на продукты их биodeградации.

Для создания СКВ нами был использован природный биodeградируемый полимер, поли-3-оксибутират (ПГБ), который характеризуется высокой биосовместимостью и биоинертностью. СКВ дипиридамола и индометацина на основе мембран и микросфер из ПГБ, были использованы для создания лекарственных систем антипролиферативного и, соответственно, противовоспалительного действия. СКВ донора оксида азота, FРТО, было использовано для создания модели долговременного локализованного действия оксида азота на ткани кровеносных сосудов. Нами было показано, что кинетика высвобождения ФАВ из ПГБ зависит от толщины матрицы или диаметра микросфер, массовой доли вещества, молекулярной массы полимера и от химической природы самого вещества. Таким образом, изменяя эти параметры, можно в широких пределах изменять скорость и продолжительность высвобождения различных веществ, что является важным преимуществом для создания, как моделей, так и лекарственных систем. Работа поддержана грантами РФФИ № 06-04-49339 и "У.М.Н.И.К." ФСРМФПвНТС.

**Расшифровка генома нового высокопатогенного штамма X-вируса картофеля  
«Ока-2» и клонирование кДНК копии его генома**

**Котляров Р.Ю., Марданова Е.С.**

студент

Центр «Биоинженерия» Российской Академии Наук, Москва, Россия

E-mail:bercut@gmail.com

Производство в растениях различных белков для медицины, сельского хозяйства и промышленности является одним из перспективных направлений биоинженерии. Одним из наиболее эффективных методов, позволяющих быстро получать в растениях значительные количества целевого белка, является использование самореплицирующихся рекомбинантных вирусных векторов. Обычно для их создания используют вирус табачной мозаики или X-вирус картофеля, геномы которых имеют небольшие размеры и содержит + цепь РНК. Одним из ограничителей эффективности вирусных систем транзientной экспрессии является «умеренность» исходного вируса, - большинство вирусных инфекций не летальны для растения и протекают в латентной форме, что сопровождается относительно низким уровнем синтеза вирусных белков. Один из новых высокопатогенных штаммов X-вируса картофеля «Ока-2», выделенный специалистами Кафедры вирусологии Биологического факультета МГУ, эффективно репродуцируется в растениях, и может являться основой нового высокоэффективного вектора для экспрессии целевых белков. Целью данной работы было определение полной нуклеотидной последовательности этого вируса и получение полной ДНК-копии его генома для последующего создания на его основе экспрессионного вектора.

Для секвенирования вируса отдельные перекрывающиеся фрагменты вирусного генома были амплифицированы с помощью ОТ-ПЦР с использованием праймеров, последовательности которых соответствовали консервативным участкам геномов различных штаммов X-вируса картофеля (ХВК). Полученные ПЦР фрагменты были секвенированы, произведена сборка контигов, в результате чего была определена полная нуклеотидная последовательность генома ХВК «Ока-2». Анализ полученной нуклеотидной последовательности свидетельствует о сходстве между ХВК «Ока» и стандартным ХВК как на уровне нуклеотидных последовательностей, так и общей организации генома. Как и стандартный ХВК, «Ока-2» содержит 4 гена: ген РНК-зависимой РНК-полимеразы, гены тройного блока гена, функции которых связаны с межклеточным транспортом вируса, а также ген белка оболочки. Геномы обоих вирусов имеют длину 6435 нуклеотидов, общее число замен нуклеотидов – 310 (4,8%), аминокислотных замен – 37 (1,8% всех аминокислот). Роль этих различий в повышении инфекционности вируса будет являться предметом дальнейших исследований.

Фрагменты к-ДНК вирусного генома были получены с помощью обратной транскрипции с использованием специфических праймеров. Два перекрывающихся фрагмента генома были получены с помощью ПЦР-амплификации к-ДНК с использованием двух пар праймеров. Полученные фрагменты были объединены в единый фрагмент ДНК, содержащий полную к-ДНК копию «Ока-2», который был клонирован под контролем 35S промотора в плазмидном векторе в *E. coli*. Корректность процедуры получения к-ДНК генома ХВК «Ока-2» была подтверждена в результате полного секвенирования полученного клона. Инфекционность к-ДНК клона вируса «Ока-2» была показана в экспериментах по заражению растений *Nicotiana benthamiana*.

**Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* как модель для изучения болезни Хантингтона<sup>1</sup>****Бочарова Наталья Александровна**

аспирант

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: bona@belozersky.msu.ru

Болезнь Хантингтона – одно из самых тяжелых прогрессирующих нейродегенеративных наследственных заболеваний головного мозга, вызванное удлинением CAG триплетного повтора в участке гена, кодирующем N-концевую часть белка хантингтина. Увеличение длины полиглутаминового фрагмента хантингтина приводит к его агрегации, а также к гибели нейронов, сопровождающейся появлением цитологических маркеров апоптоза. Однако причина токсичности мутантного хантингтина до сих пор не установлена. Агрегация и токсичность хантингтина в настоящее время исследуется на различных модельных организмах, среди которых одной из наиболее удобных для изучения моделей являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* [1].

Нами показано, что экспрессия N-концевой части удлиненного полиглутаминового фрагмента хантингтина человека в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* приводит к образованию активных форм кислорода, фрагментации ядер, деградации ядерной ДНК и гибели клеток. Деградация ДНК и гибель дрожжевых клеток могут быть значительно снижены путем добавления антиоксиданта альфа-токоферола. Кроме того, как и в нейронах, на поздних стадиях экспрессии полиглутаминовые фрагменты хантингтина накапливаются в ядре дрожжевых клеток, агрегируют и нарушают регуляцию клеточного цикла. Появление агрегатов полиглутаминового домена хантингтина в ядре практически не происходит в клетках, лишенных гена дрожжевой метакаспазы *YCA1* [2].

Из наших данных следует, что физиологические последствия экспрессии удлиненного полиглутаминового фрагмента хантингтина в дрожжах аналогичны наблюдаемым в нейронах. Таким образом, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются релевантной моделью для изучения таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Хантингтона.

В настоящее время проводится поиск генов *Saccharomyces cerevisiae*, которые участвуют в развитии патофизиологических эффектов, вызываемых хантингтином человека с удлиненным полиглутаминовым фрагментом.

**Литература**

1. Outeiro, T.F., Giorgini, F. (2006) Yeast as a drug discovery platform in Huntington's and Parkinson's diseases. *Biotechnol. J.*, 1, 258-269
2. Sokolov, S., Pozniakovsky, A., Bocharova, N., Knorre, D., Severin, F. (2006) Expression of an expanded polyglutamine domain in yeast causes death with apoptotic markers. *Biochim Biophys Acta*, 1757 (56): 660-666

---

<sup>1</sup> Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта РФФИ (грант № 06-04-49555).

**Взаимодействие порообразующих пептидов с большими моноламеллярными липосомами***Шахбатян Римма Рубеновна**Студентка 2-ого курса**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия**E-mail: constellation2@yandex.ru*

Порообразующие пептиды обладают свойством нарушения целостности мембран. Данные пептиды обнаруживают в своей первичной структуре преобладание полярных положительно заряженных аминокислотных остатков, что предопределяет электростатический характер взаимодействия данных пептидов с отрицательно заряженными липидами мембран бактерий. Пептиды, способные к образованию пор в мембранах бактерий, носят название антимикробных и представляют широкий по разнообразию ряд молекул, являясь инструментом защиты далеких, с точки зрения филогенеза, групп организмов: растений, насекомых и позвоночных от патогенных организмов

После связывания пептида с мембраной дальнейшее действие может происходить двумя способами. Первый путь - через встраивание молекул пептида в мембрану с образованием пор со структурой согласно модели «бочонка» (так называемая barrel-stave модель) или тороидной модели. Второй способ – агрегация молекул пептида на поверхности мембраны и ее разрушение (модель «ковер»).

В последнее время появились работы по синтезу искусственных аналогов таких пептидов, которые обладают аналогичными свойствами. В нашей работе мы рассмотрели действие синтетических пептидов Pep-1 и 51.1 на больших моноламеллярных липосомах, приготовленных из липида фосфатидилхолина. Способность данных пептидов к порообразованию была показана двумя различными методами, в основе которых находилось измерение флуоресценции. В первом методе появление пор в липосомах при добавлении пептидов было выяснено по регистрации флуоресценции красителя 5(6) - карбоксифлуоресцеина при вытекании из липосом. Во втором методе изучаемые свойства пептидов были подтверждены по флуоресценции потенциал-зависимого красителя сафранина О. Также были сделаны предположения относительно модели действия данных пептидов.

Таким образом, синтетические пептиды Pep1 и 51.1, созданные на основе структурной особенности природных пептидов – преобладании положительно заряженных аминокислотных остатков, – обладают порообразующей способностью и, вероятно, при дальнейшем комплексном исследовании можно будет сделать вывод относительно использования данных пептидов в качестве антибактериальных средств. Другим применением данных пептидов может быть связывание с различными макромолекулами (белки, нуклеиновые кислоты) и их перенос через мембраны клеток. Частным случаем является решение проблемы переноса лекарственных препаратов в клетку.

**Литература**

1. Huey W. Huang *Biochemistry* 39 (2000), 8347-8352
2. B. Bechinger, Y. Kim, L.E. Chirlian, J. Gesell, J.-M. Neumann, M. Motal, J. Tomich, M. Zasloff, S.J. Opella *J. Biol. NMR* 1 (1991) 167–173
3. H.W. Huang, *J. Phys. II France* 5 (1995) 1427–1431
4. Huey W. Huang *Biochimica et Biophysica Acta* (2006) 79006
5. Shai Y. *Biochimica et Biophysica Acta* 1462 (1999) 55-70
6. Yeaman M., Yount N. *Pharmacological Reviews* 55 (2003) 27-55
7. Y.N. Antonenko et al. / *FEBS Letters* 579 (2005) 5247–5252

## **Влияние рН среды на активность каналаобразования колицина E1 в мембранах различного состава**

*Бурлин Антон Иванович, Собко Александр Александрович, Котова Елена Аврамовна,  
Антоненко Юрий Николаевич*

*студент, н.с, с.н.с, в.н.с.*

*Московский государственный университет им.М.В.Ломоносова*

*E-mail: entire87@inbox.ru*

Колицин E1 принадлежит к группе бактериоцинов, обладающих токсическим действием по отношению к клеткам *E.coli*. Токсическое действие колицина E1 обусловлено встраиванием в цитоплазматическую мембрану, вызывающим индукцию ионной проводимости и деполяризацию мембраны. Ранее в лаборатории Ю.Н. Антоненко было показано, что колицин E1 образует ионный канал по механизму тороидальной белково-липидной поры. В этом случае физические свойства липида существенно влияют на свойства канала. В настоящей работе мы изучили влияние рН среды на активность колицина в мембранах различного заряда. Известно, что колицин хорошо сорбируется на мембране лишь при низких значениях рН. Однако, оказалось, что если после сорбции колицина сместить рН до щелочных значений, то активность каналаобразования, измеренная по индукции тока через бислоюную липидную мембрану, будет различной в нейтральных и отрицательно заряженных мембранах. Так, индуцированный колицином ток при сдвиге рН практически не менялся в нейтральных мембранах и возрастал в несколько раз в отрицательно заряженных мембранах, причем повышение тока наблюдалось даже при 10%-ном содержании отрицательно заряженного липида в мембране. Эксперименты, проведенные в различных диапазонах кислотности среды, показали, что влияние сдвига рН на активность колицина связано с изменением суммарного заряда молекулы колицина, а не с депротонированием каких-либо конкретных аминокислотных остатков. Кроме того, нами было показано, что данный эффект не связан и с возможным частичным депротонированием липидных головок. Полученный результат может быть объяснен на основании предложенной ранее модели взаимодействия колицина с бислоем, которая включает в себя ограничение подвижности колицина при сильном взаимодействии положительно заряженного белка с отрицательно заряженным липидом. В рамках данной модели частичное депротонирование молекул белка приводит к уменьшению подобного взаимодействия, что облегчает каналаобразование.

Результаты исследования каналов колицина E1 важны для понимания механизмов функционирования больших природных каналов, детальные принципы работы которых вследствие сложности их структуры пока неизвестны.

**Гиперэкспрессия ламина В1 ведет к формированию избытка ядерной оболочки и формированию ядерных инвагинаций.***Волкова Екатерина Григорьевна**Студентка**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,**Москва, Россия**volkova@belozersky.msu.ru.*

Экспериментальные и теоретические работы последних лет позволили на новом уровне подойти к пониманию процессов формирования ядерных структур. По современным представлениям стабильные структуры формируются из высокодинамичных компонентов, что позволяет рассматривать процесс формирования ядерных структур как результат обратимой химической реакции. Малоизученными остаются ситуации, когда один из компонентов, формирующих структуру, присутствует в избыточных количествах. Для некоторых ядрышковых белков показано, что в таких ситуациях может происходить взаимодействие избыточных белков с внеядрышковыми локусами, что, вероятно, приводит к уменьшению фракции белка, вовлеченной в формирование ядрышка (т.е. клетка возвращается, таким образом, к нормальному состоянию). В настоящей работе мы проанализировали последствия избыточной экспрессии ламина В1, который является основным структурным белком ядерной ламины. Ядерная ламина играет роль своеобразного скелета ядра. Кроме того, связывание транскрибирующихся генов с ламинной ведет к их инактивации. Для увеличения внутриклеточной концентрации ламина В1 мы трансфецировали клетки культуры HeLa плазмидой, кодирующей EGFP-ламина В1. Уровень экспрессии ламина В1 определяли по яркости свечения экзогенного ламина. Повышенная экспрессия ламина В1 приводила к увеличению общей площади ядерной оболочки в ядре и к формированию многочисленных ядерных инвагинаций. Таким образом, гиперэкспрессия одного из компонентов может приводить к активизации процесса формирования всей структуры. Можно полагать, что инвагинации ядерной оболочки, наблюдаемые изредка и в контрольных клетках, представляют собой результат вынужденной упаковки избытка ядерной оболочки. Обращает на себя внимание также то, что в ядрах клеток с гиперэкспрессией ламина В1 формируются крупные блоки конденсированного хроматина, какие никогда не выявлялись в клетках с низким уровнем экспрессии. Это косвенно свидетельствует о том, что избыток ламины ведет к частичной инактивации активности генов. Клетки с самым высоким уровнем экспрессии ламина В1, выявляемые в культуре, имели чрезвычайно большое число инвагинаций, что приводило к формированию структур, внешне напоминающих луковицу на разрезе. Однако такие клетки погибали в результате апоптоза. Таким образом, в работе описан феномен формирования избыточного количества ядерной оболочки в результате экспериментальной гиперэкспрессии ламина В1. Избыток оболочки формирует многочисленные инвагинации, которые служат в качестве своеобразных хранилищ избытка сформировавшейся структуры.

**Экспресс-метод определения активности танкиразы 2 из клеток эмбриональной почки человека*****ФАДЕЕВ А.О.<sup>1</sup>, СИДОРОВА Н.Н.<sup>2</sup>, КУИМОВ А.Н.<sup>2</sup>****<sup>1</sup> студент, Факультет биоинженерии и биоинформатики,**<sup>2</sup> НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова. 119992 Москва, Российская федерация.**fadeevandrey@gmail.com*

Предложена ускоренная процедура определения активности танкиразы 2 человека. Метод основан на применении очищенного препарата танкиразы из клеток почки человека линии 293. В результате реакции аутокаталитической посттрансляционной модификации в присутствии радиоактивного низкомолекулярного субстрата ( $[^{32}\text{P}]\text{NAD}^+$ ) синтезируется поли-ADP-рибоза, ковалентно связанная с белком, иммобилизованным на твердой фазе. После удаления избытка растворенного  $[^{32}\text{P}]\text{NAD}^+$  количество метки, включенной в белок, определяют по сцинтилляции. Метод может быть применен для скрининга ингибиторов, специфичных для танкиразы и других ферментов семейства поли-ADP-рибоза-полимераз (PARP). Работа поддерживается грантом РФФИ 06-04-49388.

### Получение природной и мутантных РНК-полимераз *E.coli* в системе IMPACT

**Ходак Юлия Александровна<sup>1</sup>, Королева Ольга Николаевна<sup>2</sup>, Друца Валерий Львович<sup>3</sup>**  
<sup>1</sup>ведущий инженер, <sup>2</sup>старший научный сотрудник, к.х.н., <sup>3</sup>ведущий научный сотрудник, к.х.н.

<sup>1,3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского, Москва, Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

E-mail: <sup>1</sup>hod@freemail.ru, <sup>2</sup>koroleva@genebee.msu.su, <sup>3</sup>drutsa@genebee.msu.su

ДНК-зависимая РНК-полимераза (РНКП) *E.coli* является катализатором процесса транскрипции. Минимальный фермент (кор-фермент) состоит из пяти субъединиц ( $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  и  $\omega$ ). В результате присоединения к кор-ферменту дополнительной субъединицы, обычно  $\sigma^{70}$ , образуется холофермент, способный специфически узнавать регуляторный сигнал (промотор) и инициировать транскрипцию.

Для изучения структуры и функции РНКП широко используется сайт-специфический мутагенез генов её субъединиц, обеспечивающий возможность создания мутантных форм фермента. Получение этого мультисубъединичного белка с мутантными субъединицами является сложной задачей. Нами разработана схема, позволяющая быстро получать препараты мутантных форм РНКП без примеси белка природной структуры. В основе нее – специально сконструированный набор плазмидных векторов для экспрессии в клетках *E.coli* всех основных субъединиц РНКП в виде «слитых» белков с интеиновым и хитинсвязывающим доменами, обеспечивающими возможность их выделения по IMPACT-технологии. Такой подход позволяет получать в высокоочищенном состоянии гетерологично экспрессируемые белки без дополнительных пептидных модулей для аффинной хроматографии. Показано, что в составе слитых белков субъединицы  $\alpha$ ,  $\beta$  или  $\beta'$  вместе с природными субъединицами  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  и  $\sigma$  способны участвовать в сборке РНКП *in vivo* и обеспечивать её последующее аффинное выделение. Полученные этим путем препараты природной или мутантных РНКП содержат в основном холофермент с высокой функциональной активностью в реакциях транскрипции и образования специфических комплексов с промотором. Получение чистого кор-фермента РНКП возможно из иммобилизованного на хитинсодержащей смоле холофермента с модулем интеин-СВД. Для этого была разработана технология полного удаления  $\sigma^{70}$ -субъединицы путем многократной промывки смолы с холоферментом растворами веществ (свободные аминокислоты, гепарин), способствующих диссоциации комплекса  $\sigma$ -субъединицы с РНКП. По IMPACT-технологии природную и мутантные  $\sigma$ -субъединицы оказалось возможным получать в виде чистого препарата без примеси холофермента РНКП.

## Исследование теплофизических свойств некоторых нестероидных противовоспалительных препаратов<sup>1</sup>

Колпаков И.М.<sup>2</sup>, Чайлахян Л. М.<sup>3</sup>, Бойко Б.Н.<sup>4</sup>

<sup>2</sup>аспирант; <sup>3</sup> Чл.-корр. РАН, д.б.н., зав. лаб.; <sup>4</sup>к.т.н., старший научный сотрудник

<sup>2,3</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцино (Россия)

<sup>4</sup>Институт биологического приборостроения РАН, Пуцино (Россия)

E-mail: imkolpakov@rambler.ru, Lm\_chail@rambler.ru, boyko@ibp.serpukhov.su

Теплофизические свойства лекарственных препаратов, исследованные методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) объективно отражают их физические характеристики, которые определяют существенные показатели качества лекарственных препаратов. Этими характеристиками и свойствами могут быть: температура плавления, удельная энергия плавления, удельная теплоемкость, испарение, сублимация, десорбция, полиморфизм, стеклование и др. Некоторые из этих характеристик, такие, как температуры плавления и проявления полиморфизма, уже применяются для контроля качества и включены в фармакопеи ведущих стран [1]. Однако возможности метода значительно шире.

Представленная работа содержит результаты сравнительного исследования теплофизических свойств однотипной группы лекарственных препаратов различных производителей. В качестве объекта исследований был выбран класс нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП). Чрезвычайно высокая популярность НПВП определяется тем, что они используются при лечении широкой группы заболеваний. Эти препараты оказывают жаропонижающее, анальгетическое и противовоспалительное действие, в то же время их применение вызывает различные побочные эффекты [2].

Были исследованы препараты, приобретенные в аптечной сети: аспирин, диклофенак, индометацин, ибупрофен, ортофер, найз. Полученные термограммы сравнивались с термограммами аналогичных препаратов, ранее опубликованными в печати [3, 4, 5, 6, 7]. Анализируются и обсуждаются различия в рассматриваемых термограммах, и связь между полученными результатами измерения и показателями качества препаратов.

Показана возможность применения метода ДСК для объективного оперативного контроля качества готовых лекарственных форм. Метод позволяет создавать автоматизированные системы контроля [8]. С его применением может быть решена актуальнейшая для России в настоящее время проблема объективного и оперативного контроля качества лекарственных препаратов.

### Литература

1. The United States Pharmacopoeia XXIII. – Rockville, 1995.
2. Gotzsche P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. BMJ, 320:1058–1061, 2000.
3. Shimadzu Corporation. Application to Medical and Pharmaceutical Products (Melting Point and Fusion Heat). Thermal Analysis T127.
4. Khazaenia T., Jamali F. J Pharm Pharmaceut Sci, 6(3):352-359, 2003.
5. Renren H., Duncan Q., Craig M. Journal of Pharmacy and Pharmacology JPP, 53: 41–48, 2001.
6. Atmaram P., Anant R., Shivajirao S., Kakasaheb R. AAPS PharmSciTech, 5 (3) Article 44, 2004.
7. Nalluri N., Chowdary R., Murthy R., Becket G. AAPS PharmSciTech, 4 (1) Article 2, 2003.
8. Колпаков И.М., Радзион А.А., Бойко Б.Н., Уминская К.А. Оперативный контроль качества и соответствия лекарственных препаратов. - Альманах клинической медицины. Т. XII., 2006, стр. 117.

<sup>1</sup> Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта по программе "Лучшие аспиранты РАН" за 2007 год.

### СВЯЗЫВАНИЕ тРНК С Р-УЧАСТКОМ РИБОСМЫ: ВЛИЯНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОСНОВАНИЙ m<sup>2</sup>G966 и m<sup>5</sup>C967 16S рРНК.

*Прохорова И.В., Сергеев П.В.*

*МГУ им.М.В.Ломоносова, химический факультет, кафедра химии природных соединений*

Один из важнейших процессов, осуществляемый клеткой, – синтез белков, который производится при связывании с рибосомой матричной РНК и транспортных РНК. Для последних связывание возможно в А, Р, и Е-участки рибосомы. Особую роль при этом играют модифицированные нуклеотиды рибосомной РНК, расположенные около сайтов связывания с тРНК. Среди них часто встречаются изомер уридина – псевдоуридин и многочисленная группа метилированных нуклеотидов. Так модифицированные нуклеотиды N-2-метилгуанин m<sup>2</sup>G966 и 5-метилцитозин m<sup>5</sup>C967 находятся в петле 31 16S РНК на участке, связывающем антикодон тРНК в Р-сайте. Их влияние на взаимодействие рибосомы с тРНК можно оценить с помощью измерения термодинамических параметров с применением методов изотопного анализа.

Для этого были выделены рибосомы из клеток с делецией гена RsmD (yhhF) (отсутствие модификации гуанина), с делецией гена RsmB (отсутствие модификации цитидина), с делецией обоих RsmB, RsmD (3Y) (отсутствие обеих модификаций) и дикого типа E.coli. Матричную РНК получали с помощью *in vitro* транскрипции с ПЦР-продукта, амплифицированного с плазмиды рМFKY. Эта мРНК содержит последовательность Шайн-Дальгарно и инициаторный AUG кодон. Меченую изотопом [<sup>32</sup>P] tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup> получали дефосфорилированием tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup> с последующим кинированием образца.

В результате проделанного эксперимента были получены зависимости связывания меченой [<sup>32</sup>P] tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup> с 30S субъединицами рибосом и мРНК от количества [<sup>32</sup>P] tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup> и вычислены значения максимального связывания и констант диссоциации комплексов «рибосома-тРНК-мРНК».

Полученные значения *B*<sub>max</sub> примерно одинаковы для всех мутантов и дикого типа. Наблюдается увеличение *K<sub>D</sub>* для мутанта в котором отсутствуют обе модификации нуклеотидов m<sup>2</sup>G966 и m<sup>5</sup>C967. Это позволяет сделать вывод, что метильные группы способствуют связыванию тРНК в Р-участок рибосомы.

### Антибактериальная активность низкомолекулярных хитозанов в отношении *Mycobacterium smegmatis*<sup>1</sup>

Останина Екатерина Сергеевна<sup>2</sup>

*аспирант*

*Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, Россия*

*E-mail: [katrine\\_kzn@mail.ru](mailto:katrine_kzn@mail.ru)*

Хитозан - положительно заряженный полисахарид, полимерная цепь которого из остатков D-глюкозамина и небольших количеств N-ацетилглюкозаминных звеньев. Хитозан широко используется в различных областях народного хозяйства - медицине, косметике, пищевой промышленности. В ряде работ было показано, что хитозан обладает антибактериальной активностью, которая зависит от средневязкостной молекулярной массы (M<sub>v</sub>). В наших экспериментах были использованы

водорастворимые низкомолекулярные хитозаны, которые обладают хорошей растворимостью в воде при нейтральном значении pH и имеют преимущество при практическом использовании как антибактериальные агенты. Нами была разработана схема получения хитозана из восковой моли *Galleria mellonella*. Был получен высокомолекулярный хитозан с  $M_v$ , равной 96, 177 кДа. Путем ферментативного гидролиза получены низкомолекулярные хитозаны с  $M_v$ , равной 7 и 11 кДа. Были получены химически гидролизованный низкомолекулярный крабовый хитозан (8 кДа) и крабовый низкомолекулярный сукцинил хитозан (6 кДа).

Таблица 1. Гибель клеток *Mycobacterium smegmatis*, обработанных хитозанами в разными молекулярными массами, при времени инкубации 1 ч, 37°C, pH 6,5

Хитозан	Химически гидролизованный	Сукцинил хитозан	Хитозан, 7 кДа	Хитозан, 11 кДа	Хитозан, 96 кДа	Хитозан, 177 кДа
Гибель клеток, %	58	35	72	65	29	20

Из таблицы видно, с увеличением молекулярной массы хитозана полученного из восковой моли, процент гибели клеток снижался. Отрицательно заряженный сукцинил хитозан обладал наименьшей антибактериальной активностью.

Изучение зависимости гибели бактериальных клеток от времени взаимодействия с хитозаном, показало, что достаточно 10 мин взаимодействия хитозана с клетками, чтобы 10-67% клеток потеряли жизнеспособность. Максимальное снижение жизнеспособных клеток наблюдали при 60 мин взаимодействия с хитозаном. Изучение влияния pH (5,3 - 6,5) на взаимодействие хитозана с клетками *Mycobacterium smegmatis*, показало, что сдвиг pH до 5,3 не вызывал увеличения контакта хитозана с клетками и не оказывал заметного влияния на выживаемость клеток после обработки их хитозаном. Были найдены минимальные ингибирующие концентрации (МИК) изучаемых нами хитозанов, результаты представлены в таблице 2.

Табл. 2 Минимальная ингибирующая концентрация хитозанов (в %) в зависимости от молекулярной массы и модификации хитозанов при время инкубации 1ч, 37°C, pH 6,5.

Хитозан	Химически гидролизованный	Сукцинил хитозан	Хитозан, 7 кДа	Хитозан, 11 кДа	Хитозан, 96 кДа	Хитозан, 177 кДа
Концентрация хитозана	0,25	0,8	0,17	0,15	1	1

Для определения прочности связывания хитозана с клетками *Mycobacterium smegmatis* использовали трехкратную отмывку смесью из 0,1 М ацетатного буфера и 0,5 м NaCl клеток бактерий предварительно проинкубированных с хитозанами. Выживаемость отмывтых от хитозана клеток *Mycobacterium smegmatis* осталась без изменения .

### Некоторые свойства пролилэндопептидаз из средней кишки личинок *Tenebrio molitor*.

Кулемзина Ирина Александровна<sup>1</sup>, Гоптарь Ирина Александровна<sup>2</sup>  
Студент, аспирант

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 1 факультет биоинженерии и биоинформатики, 2 химический факультет, Москва, Россия

E-mail: koulemzinai@mail.ru

Пролилэндопептидазы (ПЭП) – это специфические эндопептидазы, гидролизующие пептидные связи, образованные карбоксильной группой остатка пролина. Самой распространённой и изученной группой ПЭП являются пролилолигопептидазы (ПОП) (ЕС 3.4.21.26) способные гидролизовать небольшие белки и пептиды (максимально 30 аминокислотных остатков). Последовательности ферментов, относящихся к ПОП, характеризуются определённой топологией каталитической триады Ser-Asp-His. Пролилолигопептидазы встречаются во всех группах живых организмов и, предположительно, выполняют регуляторную роль.

С помощью программы CLUSTALW было выполнено множественное выравнивание 60 аминокислотных последовательностей ПОП (из базы данных EMBL) из различных организмов. По результатам выравнивания были найдены инвариантные остатки, располагающиеся в активном центре белка: Ser554, Asp641, His680, Arg643, Gly556, Gly557, Gly552. Наибольшая схожесть последовательностей выявлена в С-концевой области белков.

Также был проведён эволюционный анализ с помощью филогенетических деревьев, построенных программой TREE-PUZZLE (likelihood method) и CLUSTALW (neighborjoining method). Для визуализации результатов были использованы программы TREEVIEW и NJPLOT, соответственно.

Ранее в нашей лаборатории в средней кишке личинок большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* (Coleoptera) были обнаружены 2 пролилэндопептидазы – ПЭП1 и ПЭП2. Мы провели частичную очистку этих ферментов с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-150. Установлено, что молекулярная масса ПЭП1 равна 100 кДа, а ПЭП2 – 62 кДа.

С использованием субстрата бензилоксикарбонил-L-аланил-L-аланил-L-пролин-L-нитроанилида (ZAAPpNA) были изучены pH-зависимость и pH-стабильность этих ферментов. ПЭП1 активна в кислом диапазоне pH, её pH-оптимум соответствует 5,6. Фермент стабилен при инкубации в течении 2 час в интервале pH 4,2 - 7,5, где сохраняет более 80% от максимальной активности. Активность ПЭП2 наблюдается в широком интервале pH, от 4,7 до 10,5, с максимумом в буфере с pH 7,9. ПЭП2 наиболее стабильна в интервале pH 5,7 - 7,5.

Исходя из полученных результатов видно, что две ПЭП из средней кишки личинок большого мучного хрущака существенно различаются по молекулярной массе, pH-зависимости и pH-стабильности и, возможно, принадлежат к разным группам ПЭП.

#### Литература:

1. Venalainen J.I., Juvonen R.O., Mannisto P.T. (2004) Evolutionary relationships of the prolyl oligopeptidase family enzymes // Eur. J. Biochem. 271: 2705–2715.
2. Беседин Д.В., Руденская Г.Н. (2003) Пролинспецифичные эндопептидазы // Биоорганич. химия, 29: 3-20.
3. Rea D., Fülöp V. (2006) Structure–function properties of prolyl oligopeptidase family enzymes // Cell Biochem. Biophys. 44: 349–365.

#### Реакция ядрышек клеток человека HeLa на действие ингибитора синтеза белка анизомидина

Шагам Лев Иосифович, Зацепина Ольга Владимировна  
студент; заведующая лабораторией, д. б. н.

Факультет биоинженерии и биоинформатики,

НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия  
levshagam@mail.ru

## Введение

Как известно, ядрышко – это наиболее крупный структурный домен клеточного ядра, необходимый для образования рибосом. Кроме этой – канонической - функции ядрышко и его белки принимают участие также в регуляции других биологически важных процессов, включая клеточный цикл, апоптоз и реакцию клеток на внешние воздействия. Однако закономерности и механизмы ядрышкового ответа на стресс до сих пор остаются изученными плохо.

Работа посвящена изучению механизмов ответа ядрышек на действие ингибитора белкового синтеза анизомицина. Конкретная задача работы заключалась в выявлении возможного кооперативного ответа клеток на подавление тотального синтеза белка путём анализа топологии расположения «чувствительных» клеток на препаратах.

## Материалы и методы

Исследования проводили на культуре клеток карциномы шейки матки человека HeLa. Время культивирования клеток *in vitro* до воздействия анизомицином (100 мкг/мл, 3 ч) составляло 1 и 3 суток. Всего было проанализировано более 2000 клеток.

Для изучения реакции ядрышка применяли световую иммуноцитохимию и антитела к белковому компоненту транскрипционного комплекса РНК полимеразы I. Препараты клеток фотографировали во флуоресцентном микроскопе Axiovert 2000. Изображения собирали в монтажи, а клетки на них маркировали двумя цветами в зависимости от характера иммуноцитохимического окрашивания ядрышка. В нормальных клетках маркерный белок располагался исключительно в ядрышках, в «чувствительных» клетках - не только в ядрышках, но и во внеядрышковой области ядра. Характер взаимного расположения «чувствительных» клеток в популяции анализировали с помощью оригинальной программы, позволяющей выявить кластеры клеток, сходных по морфологии.

## Результаты и обсуждение

Полученные данные позволяют утверждать, что «чувствительные» клетки ( т.е. клетки с изменёнными под действием анизомицина ядрышками и нехарактерной локализацией маркерного белка) располагаются на препаратах неслучайным образом, образуя кластеры. Кластерность наблюдается на всех препаратах, при этом вероятность ошибки (т.е. гипотезы об отсутствии кластеров) заведомо меньше 0.01%.

Наличие кластерности как таковой говорит о тесной взаимосвязи соседних эпителиальных клеток. В чём же причина этого феномена?

Причинами этого явления могут быть как возможность передачи «апоптотического сигнала» от клетки к клетке подобно тому, что происходит при индукции оксидативного стресса (Плетюшкина и др., 2006), так и неслучайное распределение клеток в определённых фазах клеточного цикла на препарате.

## Литература

1) Плетюшкина и другие (2006) Пероксид водорода, образуемый внутри митохондрий, участвует в передаче апоптотического сигнала от клетки к клетке // Биохимия, том 71, вып. 1, с. 75-84.

**Поиск ДНК-аптамеров к белку IL-6 методом SELEX**  
***Цыганова Марина Олеговна<sup>1</sup>, Спиридонова Вера Алексеевна<sup>2</sup>***  
Студентка

*Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики<sup>1</sup>, НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского<sup>2</sup>, Москва, Россия.*  
*E-mail: marina.tsyganova@gmail.com*

Интерлейкин-6 человека (hIL-6) вовлечен в различные клеточные процессы (пролиферация, дифференцировка, ингибирование апоптоза и т.д.). Большой интерес представляет клиническое использование hIL-6 в терапии рака, а также поиск ингибиторов, подавляющих его многочисленные функции, как на уровне индивидуального белка, так и на уровне клеточных комплексов. В настоящее время широкое распространение получил метод SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment), с помощью которого нарабатываются аптамеры, небольшие молекулы ДНК или РНК, которые специфически и с высоким сродством связываются со своим белковыми мишенями и могут либо регулировать, либо полностью блокировать активность клеточных белков [1]. Поиск таких аптамеров начинается с селекции "библиотеки случайных последовательностей" и состоит из повторяющихся циклов, в результате которых получается обогащенная фракция молекул-победителей. В литературе описаны примеры получения аптамеров к белкам, не имеющим природных комплексов с нуклеиновыми кислотами, методом SELEX [2,3]. Цель работы - получение ДНК-аптамеров, ингибиторов hIL-6, обладающих средней специфичностью к белку, и изучение их структуры. Было проведено восемь циклов селекции аптамеров к рекомбинантному hIL-6, иммобилизованному на Br-CN-Sephарозе, с использованием ДНК рандомизированной библиотеки. Олигонуклеотиды библиотеки имели длину 80 нуклеотидных остатков. Разнообразие библиотеки достигало  $10^8$  молекул, так как в каждом олигонуклеотиде по тринадцати позициям могли находиться любые из четырех нуклеотидных оснований. Последовательности содержали в своем составе G-квадруплексы, которые представляют собой 2 слоя G-тетраплексов, находящихся в стекинг-взаимодействии и связанных Хугстинскими водородными связями. Поиск аптамеров с рандомизированной библиотекой, имеющей жесткий каркас, позволяет резко сократить число циклов и предотвратить потерю представленности. В результате селекции получена обогащенная фракция аптамеров с  $K_d = 0,5 \mu\text{M}$ . Суммарная фракция охарактеризована методом кругового дихроизма. Показано, что структура G-квартетов сохраняется в течение всего периода селекции.

Работа поддержана грантами РФФИ-офи № 06-04-08310-офи, РФФИ 05-04-49750

Список литературы:

1. Копылов АМ, Спиридонова ВА. Комбинаторная химия нуклеиновых кислот : SELEX. (2000) *Молекулярная биология.*, 34, 1097-1113. (обзор)
2. Eaton, B.E., Gold, L., Hicke, B.J., Janjic, N., Jucker, F.M., Sebesta, D.P., Tarasow, T.M., Willis, M.C., and Zichi, D.A. (1997) *Bioorg. Med. Chem.*, 5, 1087–1096.
3. Osborne, S.E., Matsumura, I., and Ellington, A.D. (1997) *Current Opinion in Chemical Biology*, 1, 5–9

#### Валидация метода ESI/MS для задач липидомики.

Попова Нина Владимировна<sup>1</sup>, Алешин Степан Евгениевич<sup>1</sup>, Каратассо Юрий Олегович<sup>2</sup>  
студент, аспирант, аспирант

<sup>1</sup> Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

<sup>2</sup> Институт Биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва  
e-mai:ninanin@email.ru, yura.karatasso@gmail.com

Традиционно органическая масс-спектрометрия используется для решения двух основных проблем: идентификации веществ и изучения фрагментации ионизированных молекул в газовой фазе. Однако после появления метода ионизации электрораспылением (ESI/MS) [1], появились работы, в которых показана возможность количественного определения различных соединений, в том числе массового скрининга

веществ липидной природы [2], что позволило говорить о появлении липидомики как новой области биологии [3]. Одна из конечных задач липидомики - разработка методов предсказания, диагностики, лечения системных заболеваний с «липидной компонентой», таких как нейродегенеративные заболевания, шизофрения, депрессия, астма, сердечно-сосудистые заболевания, диабет и др. Методы диагностики, включают в себя массовые анализы липидов клетки в патологии и в норме, поэтому важно знать пределы используемого метода детекции, его точность, чувствительность и возможные источники погрешностей определения. Валидация – это «документированная процедура, дающая высокую степень уверенности в том, что конкретный процесс, метод или система будет приводить к результатам, отвечающим заранее установленным критериям приемлемости» [4]. Поэтому целью данной работы являлась валидация метода ESI/MS для задач липидомики на примере количественного анализа полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и простагландинов. В качестве основы при постановке метода использовали стандартные протоколы по валидации аналитических методов [4] и адаптировали их для данного метода. Насколько нам известно, для данного метода такая процедура проводится впервые. Экспериментальные исследования проводили на приборе Bruker Esquire 4000. Использовали модельные растворы, липидные экстракты печени мыши, липидные экстракты различных культуральных жидкостей.

В процессе работы: 1) найдены условия, при которых исследуемые вещества дают пики отрицательно заряженных молекулярных ионов  $[M-H]^-$  без предварительной дериватизации, и проведена оптимизация такого процесса; 2) показана необходимость использования относительных значений для количественного определения как ПНЖК, так и простагландинов (отклонение абсолютного значения интенсивности пика может составлять до 30%, в то время как отклонение отношений интенсивностей оставляет лишь 8%); 3) определены границы линейности метода - области концентраций, в которой отношение интенсивностей пиков исследуемых веществ к интенсивности пика стандарта линейно зависит от концентрации исследуемых веществ; 4) определена чувствительность метода для простагландинов (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , PGA<sub>2</sub>, 15d-PGJ<sub>2</sub>) и ПНЖК (линолевой, докозагексаеновой и арахидоновой кислот); 5) исследовано, как присутствие других веществ (экстракта липидов из печени крыс; избытка ПНЖК в модельных растворах) влияет на возможность количественного определения простагландинов и ПНЖК. В результате работы оценены правильность и специфичность метода, сходимость и воспроизводимость, линейность, предел количественного обнаружения. Предложена схема валидации метода ESI/MS, удобная для разработки детекции данным методом различных классов веществ липидной природы, в первую очередь триглицеридов и фосфолипидов, а также различных окисленных производных ПНЖК. Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (04-04-49357 и 07-04-01160).

**Литература:** 1. Whitehouse C.M. et al. Anal. Chem., 1985, 57, 675. 2. Liebisch G. et al. Journal of Lipid Research, 1999, vol. 40, pp. 1539-1546. 3. Han X, Gross RW. J Lipid Res. 2003, 44(6):1071. 4. Л.Р. Давлетбаева и др. Медицинские иммунобиологические препараты в XXI веке: разработка, производство и применение, часть 1, 2005, с. 34-48.

### **Специфичность локализации ДНК синаптонемного комплекса в геномных изохорах**

**Сизова Татьяна Викторовна**

аспирантка

Институт Общей Генетики им. Н.И.Вавилова РАН, Москва, Россия

E-mail: olonare@mail.ru

Геном позвоночных рассматривают как мозаику фрагментов, гомогенных по уровню GC-пар, которые имеют четкие границы и размеры более 300 т.п.н. Фрагменты названы изохорами. Геномная ДНК, препаративно разделенная в соответствии с содержанием в ней GC-пар, образует композиционные фракции. В профазе I мейоза формируется специфическая субъядерная структура - синаптонемный комплекс (СК). Клонированы последовательности ДНК, прочно ассоциированные с СК (СКАР ДНК). Цель работы – выявление специфичности распределения СКАР ДНК по изохорам. Для этого была определена локализация клонов СКАР ДНК в композиционных фракциях генома золотистого хомячка с помощью дот-гибридизации на фильтрах.

ДНК-ДНК - гибридизация на фильтрах. Использовались в качестве зондов 4 композиционные фракции (L1, L2, H1 и H2) и 27 последовательностей СКАР ДНК золотистого хомячка, иммобилизованные на фильтре.

При гибридизации были получены следующие результаты: последовательности СКАР ДНК дисперсно распределены по всему геному, хотя 2/3 их локализуются в GC-бедных изохорных семействах L1 и L2. Среди клонов, содержащих уникальные последовательности, можно выделить 4 группы: последовательности, встречающиеся только в GC-бедных изохорных семействах L1 и L2, последовательности, встречающиеся только в GC-богатых изохорных семействах H1 и H2, последовательности, в основном локализующиеся в GC-бедных изохорных семействах L1 и L2, но с меньшей интенсивностью представлены в GC-богатых изохорных семействах H1 и H2 и последовательности, равномерно распределенные по всему геному. Клоны, содержащие участки, гомологичные повторяющимся последовательностям, обнаруживаются во всех изохорных семействах: SINE-повторы распределены в геноме равномерно, LINE-повторы - преимущественно в GC-бедных изохорах. Повторы микросателлита (GT/AC)<sub>n</sub> не влияют на композиционную локализацию СКАР ДНК в изохорных семействах. Полученные результаты свидетельствуют о наличии специфичности последовательностей СКАР ДНК на уровне композиционных фракций. Композиционная локализация СКАР ДНК согласуется с гипотезой об участии синаптонемного комплекса и СКАР ДНК в реорганизации структуры хроматина в профазе I мейоза, в результате которой петли хроматина прикрепляются к латеральным элементам СК по всей длине хромосом.

### Литература

- G. Bernardi «Isohores and the evolutionary genomics of vertebrates». 2000, Gene. v.241, 3-17.  
 О.И. Карпова, С. Сакконе, А. Варриале, Т.В. Сизова, М.В. Пенкина, Ю.Ф. Богданов «Локализация последовательностей ДНК, прочно ассоциированных с синаптонемным комплексом, в композиционных фракциях золотистого хомячка». 2004, Молекулярная биология. т.38(4), 668-675.

### **Роль гомодимеризации белка Keap1 в системе клеточного ответа на окислительный стресс**

**Решетов Денис Александрович**

*студент*

**Мельников Сергей Викторович**

*аспирант*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

*E-mail: reshetovdenis@rambler.ru*

Одна из наиболее важных систем, опосредующих защиту эукариотических клеток от токсических и канцерогенных воздействий окружающей среды, основана на работе транскрипционного фактора Nrf2. Различные нарушения работы этой системы приводят к таким тяжелым патологиям, как болезни Альцгеймера, Паркинсона, ишемия, фиброз легких, эмфизема, астма, аутоиммунный нефрит [1]. Защитная система работает таким образом, что в ответ на увеличение окислительного потенциала клетки происходит накопление Nrf2 в ядре, где он, специфически связываясь с регуляторными участками хроматина, стимулирует транскрипцию генов, кодирующих защитные белки. В отсутствие окислительного стресса (в нормальных физиологических условиях) Nrf2 отправляется на деградацию, опосредованную взаимодействующим с ним белком-репрессором Keap1 в комплексе с Cul3. В предшествующих работах было показано, что *in vitro* Keap1 функционален только в виде димера, что соответственно привело к дискуссии о том, является ли процесс димеризации регулируемым переключателем активности Keap1, а также к постановке вопроса о структурной организации комплекса Nrf2-Keap1-Cul3.

В данной работе была создана система, позволяющая наблюдать за димеризацией Keap1 *in vivo*. Для этого клетки линий HeLa и HEK 293T были трансфицированы плазмидами, кодирующими две формы белка Keap1: дикую форму, локализованную в цитоплазме, и мутантную по сигналу экспорта из ядра, преимущественно локализованную в ядре. Методом конфокальной лазерной микроскопии было показано, что при совместном присутствии в клетке двух форм белка, весь Keap1, по причине димеризации белков дикого и мутантного типов, имеет цитоплазматическую локализацию. Было показано, что в условиях окислительного стресса в клетках, трансфицированных аналогичным способом, происходила значительная реактивация Nrf2, тогда как Keap1 оставался цитоплазматическим, что отражало тот факт, что в условиях окислительного стресса нарушения гомодимеризации Keap1 не происходит. Таким образом, было показано, что Nrf2 может избегать репрессии белком Keap1 и без нарушения его димеризации, а сама димеризация Keap1, по-видимому, не является регуляторным элементом в функционировании защитной системы. На основе анализа 3D-структур комплексов гомологичных белков было проведено моделирование комплекса белков Nrf2, Keap1 и Cul3. Было показано, что комплекс должен иметь стехиометрию (Nrf2-Keap1-Cul3)<sub>2</sub>. Данная модель наглядно иллюстрирует критическую необходимость гомодимеризации Keap1 для сохранения способности отправлять Nrf2 на деградацию и не противоречит экспериментальным данным, описывающим поведение данных белков. Модель (Nrf2-Keap1-Cul3)<sub>2</sub> может в дальнейшем использоваться для получения 3D-моделей более высокого разрешения и дизайна стимуляторов, активизирующих защиту клетки от окислительного стресса.

### Литература

1. Donna D. Zhang, Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. Drug Metab Rev. 2006;38(4):769-89.

### Ультраструктура *S. cerevisiae* в условиях окислительного стресса.

Ожован Сильвия Михайловна  
студентка

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: silvenok@mail.ru

В литературе недавно было показано, что дрожжи располагают программой самоликвидации, схожей с апоптозом высших эукариот. Исследование ультраструктуры

дрожжевых клеток в этих условиях представляет огромный интерес и имеет большое значение для понимания механизмов этого процесса. Условия окислительного стресса индуцировались инкубацией дрожжевых клеток в присутствии 80μМ амиодарона, либо условиями голодания.

Ультраструктура исходных клеток *S. cerevisiae* характеризуется наличием большого количества митохондрий, имеющих сходную ультраструктуру: незначительное количество крист, слабо выраженный матрикс. Для почкующихся клетках *S. cerevisiae* нами было показано характерная картина перемещения в дочернюю клетку удлинённых митохондрий и ядра.

Было исследовано состояние ультраструктуры клеток *S. cerevisiae* в условиях эндогенного окислительного стресса, вызванного индуктором программируемой клеточной гибели – амиодароном. В клетках *S. cerevisiae* после 10 мин инкубации в присутствии 80μМ амиодарона митохондрии набухают, имеют, в основном, округлую или овальную форму. Удивительные изменения происходят в ультраструктуре ядра. Ядерная оболочка образует чрезвычайно протяжённые ветвистые выросты сложной формы, которые заполняют значительный объём клетки. Обнаруженные изменения ультраструктуры ядра в этих условиях можно сопоставить с изменениями ядра при апоптозе у высших эукариот. В то же время в дрожжевых клетках с инактивированным геном *YSP2* при инкубации в течение 10 мин в присутствии 80μМ амиодарона вышеописанных изменений ультраструктуры митохондрий и ядра обнаружено не было.

Таким образом, наши данные на уровне ультраструктуры подтверждают, что амиодарон вызывает гибель дрожжей, которая сопровождается характерными изменениями клетки, показанными для апоптоза многоклеточных эукариот. Инактивация гена *YSP2*, кодирующего митохондриальный белок, предотвращает наблюдаемые изменения.

### **Взаимодействие амилоидогенных белков с шаперонином GroEL и влияние этих белков на ренатурацию ферментов<sup>2</sup>**

***Киселев Георгий Георгиевич<sup>3</sup>***

*Студент 4-го курса*

*Факультет биоинженерии и биоинформатики,*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

*E-mail: siny.rulis@googlemail.com*

В основе возникновения различных амилоидозов (прежде всего болезни Альцгеймера, прионовых заболеваний) и других «конформационных» патологий лежит агрегация белков с изменённой пространственной структурой. Очевидно, что различные молекулярные шапероны, предназначенные для правильного сворачивания белков и предотвращения их агрегации, должны быть вовлечены в развитие такого рода «конформационных заболеваний». Связывание амилоидогенных белков с шаперонами может влиять на их способность образовывать амилоидные структуры. В тоже время этот процесс может препятствовать выполнению шаперонами их основной функции - сворачивать обычные белки. С целью выяснения роли шаперонов в развитии

---

<sup>2</sup> Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта ИНТАС (03-51-4813) и РФФИ (04-04-81038а-Бел и 05-04-48955-а

<sup>3</sup> Автор выражает признательность профессору, д.б.н. Муронцу В.И. за помощь в подготовке тезисов.

заболеваний амилоидной природы и регуляции сворачивания белков было изучено взаимодействие шаперонина GroEL с пептидом  $\beta$ -амилоида(1-42), а также с рекомбинантными овечьими прионами. Для проведения такого исследования мы использовали «метод фиксированного партнера», при котором один из белков ковалентно иммобилизуется на нерастворимой матрице. Шаперонин GroEL иммобилизовали на активированной бромцианом сефарозе 4В, а затем инкубировали в присутствии прионов, пептида  $\beta$ -амилоида(1-42) и/или денатурированной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД). Эффективность связывания определяли по убыли белков из растворимой фракции, а также с помощью анализа связавшихся белков методом электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия.

В работе была продемонстрирована возможность как одновременного, так и последовательного взаимодействия данных белков с шаперонином и определены стехиометрия и константы связывания белков. Мы показали, что после связывания приона или пептида  $\beta$ -амилоида(1-42) с шаперонином последний сохраняет способность взаимодействовать с денатурированной ГАФД. Однако, прочность связывания денатурированной ГАФД, прионов и пептида  $\beta$ -амилоида(1-42) с шаперонином различна. После взаимодействия приона с иммобилизованным шаперонином последующее связывание денатурированной ГАФД приводило к частичному высвобождению молекул прионов. Пептид  $\beta$ -амилоида(1-42) практически не влиял на взаимодействие шаперонина с денатурированной ГАФД. В опытах по реактивации денатурированной ГАФД было показано, что при последовательном добавлении пептида и ГАФД не наблюдалось блокирование шаперон-зависимой реактивации дегидрогеназы. Однако после предварительной инкубации денатурированной ГАФД с пептидом и последующего добавления в данную пробу шаперонина GroEL, GroES, а так же Mg-АТФ реактивации фермента не происходило. Вероятно, пептид  $\beta$ -амилоида(1-42) связывается с шаперонином непрочно и не препятствует его функционированию после добавления денатурированных молекул дегидрогеназы. В тоже время после образования прочного комплекса денатурированной ГАФД с пептидом  $\beta$ -амилоида(1-42) шаперонин не может его разрушить и осуществить сворачивания дегидрогеназы.

Полученные данные свидетельствуют о важной роли шаперонов в формировании амилоидных структур.

### **Влияние дигидрокверцетина на компоненты модельной системы коллагеновый гель – фибробласты**

*Суханова Татьяна Владимировна  
студент*

*Пуцинский государственный университет, Пуццо, Россия  
E-mail: SukhanovaTV@rambler.ru*

Система коллагеновый гель – фибробласты широко применяется в тканеинженерных конструкциях, однако применение химических сшивающих реагентов для стабилизации гелей оказывает токсическое действие при их биодеградации в организме. В настоящее время актуальным остается вопрос поиска сшивающих агентов, способных стабилизировать коллагеновый матрикс и не оказывающих токсического действия на организм. В качестве такого стабилизирующего вещества могут быть использованы природные полифенолы, которые, образуют с коллагеновыми волокнами водородные, гидрофобные и ковалентные связи (K. Viljanen, 2005). Наиболее перспективным в этом плане является дигидрокверцетин (ДПК) - высокоактивный полифенол флавоноидного ряда, обладающий Р-витаминной активностью, противоопухолевым, антимуtagenным, антиаллергическим и противовоспалительным действием (Chu S.C. et al., 1992; Huang M.T., et al., 1983; Bronner C., Landry Y., 1985).

Целью данной работы было исследование влияния дигидрокверцетина на клеточную активность и состояние коллагенового матрикса, а также определение концентраций, при которых возможно использование данного препарата в тканевой инженерии. Для исследования были взяты препараты ДГК отечественного производства («Флавокон» и «Флавир»). Исследование влияния дигидрокверцетина на термодинамическую стабильность фибрилл коллагена типа I было проведено с использованием метода дифференциальной сканирующей микрокалориметрии. Для исследования влияния ДГК на клетки были использованы фибробласты линии L929, культивируемые в среде ДМЕМ,199 (1:1, v/v) с 0.5% содержанием сыворотки FBS (HyClone).

\*\*\*

Исследование воздействия ДГК на культуру фибробластов линии L929 показало, что концентрация 0,1 мг/мл является токсичной для клеток, в интервале 0,0001 – 0,01 мг/мл отмечается пик, соответствующий 0,001 мг/мл, где отмечается рост клеток, превышающий таковой в контроле. При более низких концентрациях дигидрокверцетина (0,00001 мг/мл) практически не наблюдалось различий между опытом и контролем во всех сериях экспериментов. Это позволяет сделать вывод о том, ДГК оказывает свойственное флавоноидам доз-зависимое влияние на клеточную активность. Исследование воздействия ДГК на термодинамические характеристики коллагена типа I показало значительное возрастание температуры плавления и увеличение кооперативности фазового перехода коллагеновых волокон при инкубировании с ДГК пропорционально концентрации и времени инкубирования. При концентрации ДГК 0,1 мг/мл температура плавления фибрилл возрастает более чем на 10°C, сохраняясь и при 0,001 мг/мл – 2,5°C, а при 0,0001 мг/мл результаты почти не отличаются от контроля. При этом существенно возрастает кооперативность фазового перехода. Полуширина пика теплпоглощения составляет 1,13+-0,03 при 0,1 мг/мл ДГК и 1,65+-0,03 при 0,001 мг/мл. Основные изменения температуры плавления фибрилл и кооперативности фазового перехода происходят в течение 1-го месяца инкубации, дальнейшие изменения незначительны, при этом различия между температурами плавления коллагеновых фибрилл при разных концентрациях ДГК, сохраняются даже после 2 мес. инкубирования. Это подтверждает свойственную полифенолам способность дигидрокверцетина стабилизировать коллагеновый матрикс за счет образования дополнительных сшивок между молекулами коллагена. Исходя из полученных данных влияния дигидрокверцетина на клеточную активность и термодинамические характеристики коллагена, выявлена наиболее приемлемая для использования в тканеинженерных конструкциях концентрация препаратов ДГК, равная 0,001 мг/мл.

### Литература

1. Viljanen K. (2005) Protein oxidation and protein-lipid interactions in different food models in the presence of berry phenolics, ACADEMIC DISSERTATION, University of Helsinki Department of Applied Chemistry and Microbiology Food Chemistry
2. Chu S.C., at al., J Nat Prod 1992 Feb;55(2): 179-183
3. Huang M.T., at al., Carcinogenesis 1983 Dec;4(12):1631-1637
4. Bronner C., Landry Y., Agents Actions 1985 Apr;16(3-4):147-151

Автор выражает признательность к.ф.-м.н. И.И. Селезневой, к.ф.-м.н. Г.А. Давыдовой, профессору д.м.н. Б.К. Гаврилюку за помощь в подготовке тезисов.

**Регуляция в системе рестрикции-модификации Ecl18kI<sup>4</sup>**  
***Бабаян Тигран Арменович<sup>1</sup>, Федотова Елена Александровна<sup>1</sup>,***  
***Ершова Анна Степановна<sup>1</sup>, Проценко Алексей Сергеевич<sup>2, 3</sup>***

<sup>4</sup> Тезисы доклады основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта (грант № 06-04-49558-а и 07-04-00545-а).

студент, аспирант, аспирант, аспирант

<sup>1</sup>Московский государственный университет им М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пуцзино, Россия

<sup>3</sup>Пуцзинский государственный университет, Пуцзино, Россия

E-mail: tigr116@yandex.ru

Система Ecl18kI принадлежит к семейству SsoII-подобных систем рестрикции-модификации (P-M). Нуклеотидные последовательности генов, кодирующих ферменты, входящие в состав этих систем практически совпадают. Так, аминокислотная последовательность метилтрансферазы SsoII (M.SsoII) отличается от последовательности Ecl18kI (M.Ecl18kI) одним остатком: Ile<sup>56</sup> заменен на Met. Оба фермента узнают 5'-CCNGG-3' последовательность в двуцепочечной ДНК и метилируют внутренний dC с образованием 5-метил-2'-дезоксцитидина [1]. Известно, что N-концевой фрагмент M.SsoII (1-71 остаток) связывается с промоторной областью генов P-M SsoII и обеспечивает регуляцию экспрессии генов в этой системе [2].

Влияет ли замена одной аминокислоты в N-концевой области M.SsoII на регуляторную функцию фермента? Нами построены и оптимизированы модели N-концевых областей (1-71 а.о.) M.SsoII и Ecl18kI. Моделирование проводили методом молекулярной динамики с использованием программного пакета GROMACS. Показано, что замена Ile<sup>56</sup> в M.SsoII на Met не оказывает заметного влияния на структуру N-концевой области белка. Следовательно, M.Ecl18kI, также как M.SsoII, должна являться регулятором экспрессии генов в собственной системе P-M.

В данной работе экспериментально показано, что M.Ecl18kI связывается с «регуляторным» участком, охарактеризованным ранее для M.SsoII [2]. Значения констант диссоциации комплексов M.Ecl18kI и M.SsoII с ДНК-лигандом имеют сравнимые значения (224±24 и 248±33 нм соответственно). Изучена транскрипция генов метилтрансферазы Ecl18kI и эндонуклеазы рестрикции Ecl18kI *in vitro* в присутствии M.Ecl18kI. Анализ способности M.Ecl18kI регулировать экспрессию генов *in vivo* проводился в клетках *E. coli*, несущих рекомбинантные плазмиды и ген бета-галактозидазы. Установлено, что регуляция экспрессии генов в системах P-M Ecl18kI и SsoII носит идентичный характер. Метилтрансфераза ингибирует свой собственный синтез и активирует синтез эндонуклеазы рестрикции.

Получено делеционное производное M.Ecl18kI, представляющее собой N-концевую область белка, ответственную за регуляцию. Показано, что такой полипептидный фрагмент практически не связывается с «регуляторным» участком и не влияет на экспрессию генов метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции. Таким образом, наличие C-концевой области, ответственной за метилирование, необходимо для поддержания регуляторной функции M.Ecl18kI.

### Литература

- Tutankhamen's M.M., Brevnov M.G., Zakharova M.V., Repyk A.V., Solonin A.S., Petrauskene O.V., Gromova E.S. (1998) The Ecl18kI restriction-modification system: cloning, expression, properties of the purified enzymes // FEBS Lett. V. 433(3), p. 233-236.
- Shilov I., Tashlitskii V., Khodoun M., Vasil'ev S., Alekseev Ya., Kuzubov A., Kubareva E., Karyagina A. (1998) DNA-methyltransferase SsoII interaction with own promoter region binding site // Nucleic Acids Res. V. 26, p. 2659-2664.

**Анализ формы клеток различных линий карциномы человека, культивируемых *in vitro*.**

Карнусь Ольга Николаевна

Студентка 3 курса

Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский Государственный  
университет им. М.В. Ломоносова  
[vershina86@inbox.ru](mailto:vershina86@inbox.ru)

Форма клеток различных тканей организма зависит от выполняемой ими функции и в норме может служить морфологическим критерием, по которому производится классификация тканей организма. Клетки изменяют свою форму в ответ на внутренние и внешние воздействия *in vivo* и *in vitro*, изменение формы является критерием трансформации клеток при злокачественном перерождении. В настоящей работе были поставлены следующие задачи: проанализировать разнообразие форм клеток карциномы человека постоянно культивируемой линии HeLa; предложить параметры для количественного морфологического анализа выделенных форм; использовать полученные параметры для характеристики формы клеток культивируемой линии, а также для анализа субпопуляций клеток быстрорастущей гепатокарциномы, выделенной из опухоли больного животного.

Актуальность применения предварительного морфологического анализа субпопуляции клеток гепатокарциномы определяется необходимостью дифференциации клеток при использовании целого ряда трудоемких методов, таких, как электронная микроскопия. Критерием для характеристики формы клеток в культуре HeLa было выбрано количество стабильных краев на ее ламеле. Используя этот критерий, выделяли следующие морфологические формы клеток: круглые (не имеющие стабильных краев), дисковидные (с единственным стабильным краем), фибробластоподобные (имеющие два стабильных края), звездчатые (имеющие более двух стабильных краев). В работе анализировали следующие параметры: периметр клетки, ее площадь, площадь ламеллы, отношение периметра к площади. Оказалось, что средние значения периметров клеток выделенных форм различаются незначительно (не более, чем на 10%) и составляют  $208,61 \pm 8,52$  мкм. Площади клеток различались, наибольшая площадь была у дисковидных клеток ( $2576,39 \pm 277,82$  мкм<sup>2</sup>), она в 2 раза превосходила площадь звездчатых клеток ( $1393,73 \pm 90,59$  мкм<sup>2</sup>). Площадь ламеллы клеток разной формы напрямую зависела от площади клетки в целом: с увеличением площади клетки величина ламеллы также возрастала, с уменьшением – падала. Для характеристикой извилистости края клетки использовали отношение периметра клетки к ее площади. Соотношение P/S, минимально у клеток первых двух выделенных типов ( $0,08$  мкм<sup>-1</sup>), чуть выше у фибробластоподобных ( $0,10$  мкм<sup>-1</sup>) и максимально у звездчатых клеток ( $0,16$  мкм<sup>-1</sup>), имеющих наиболее «извилистый» край. Таким образом, предложенный параметр P/S позволяет оценить, насколько форма данных клеток отличается от круглой. Предложенные параметры были использованы нами для анализа морфологических форм субпопуляций клеток быстрорастущей гепатокарциномы. При гепатоканцерогенезе возможна быстрая, скачкообразная прогрессия - из перевиваемой медленно растущей гепатокарциномы мыши был выделен быстрорастущий вариант гепатокарциномы (б-Гк). Выщепившийся вариант отличается от исходной опухоли по многим признакам, что, по-видимому, связано с нарушениями в системе интегринов. На светоптическом уровне в культивируемой *in vitro* б-Гк можно выделить три морфологических типа клеток: распластанные одиночные клетки веретеновидной формы; гигантские многоядерные полиплоидные клетки и клетки шаровидной формы, организованные в многоклеточные слабоприкрепленные к субстрату сфероиды. Поскольку светоптический анализ клеток последнего типа был невозможен, электронномикроскопический анализ в совокупности

с предложенными параметрами позволил охарактеризовать количественно различия между типами клеток, отражающие степень нарушения их интегративной системы.

### **Химерные молекулярные биконы как новые гибридизационные пробы для детекции однонуклеотидного полиморфизма**

**Макимова Марина Анатольевна**

*Магистр 1 года обучения*

*Башкирский Государственный Университет, Химический факультет, Уфа, Россия*

*E-mail: [maxmara100@mail.ru](mailto:maxmara100@mail.ru)*

Однонуклеотидные замены, или снипы (SNP) – один из типов полиморфизма ДНК, представляющий собой точечные различия в последовательностях генов, для которых в некоторой популяции имеются аллельные варианты. Обнаружение SNP позволяет использовать их в дальнейшем в качестве генетических маркеров, необходимых для исследования природы генетически обусловленных заболеваний и признаков. Недавно для детекции снипов стали применять технологию циклирующей гибридизационной пробы – ТЦГП (Cycling Probe Technology – СРТ). ТЦГП представляет собой сигнальную амплифицирующую систему, позволяющую проводить определение последовательностей нуклеиновых кислот без их предварительной амплификации.

В ТЦГП нами была использована проба специфичной химерной последовательности (ДНК-РНК-ДНК), гибридизующаяся с комплементарной ДНК-мишенью с образованием дуплекса – субстрата для РНКазы Н. Данный фермент специфично разрушает РНК-участок в РНК-ДНК гетеродуплексе; в результате проба диссоциирует с мишени, которая становится доступной для следующей молекулы пробы, и, соответственно, для следующего цикла [1]. Диссоциированные фрагменты пробы накапливаются и служат основой определения мишени [2]. В последнее время для детекции снипов все шире применяют методики, основанные на использовании т.н. «молекулярных биконов» (molecular beacons – MB), имеющих структуру типа «стебель-петля».

В данной работе в модельном эксперименте была показана возможность дискриминации аллельных вариантов снипа rs13280 человека *Homo sapiens* с использованием молекулярных биконов MB1 и MB2, имеющих следующий состав:

**MB1** FAM-TCGCACr(ugucaccaucaucu)GTGCGA-Dabcyl

**MB2** NH<sub>2</sub>-FAM-TCGCATGTCr(accaucu)ATCTTGCGA-Dabcyl

В качестве матрицы-мишени выступали олигонуклеотиды АОт и АОа:

**АОт** CAGATAGATGGTGACAA

**АОа** CAGATAGAAGGTGACAA

Очевидно, что вследствие большей прочности стебля шпильки рибобикон MB1 хуже отжигается на матрице по сравнению с MB2. Оказалось, что длина РНК-фрагмента в 7 рибонуклеотидов вполне достаточна для разрушения его РНКазой Н. Совокупность указанных особенностей позволяет предположить, что рибобикон MB2 должен обладать большей дискриминирующей способностью по сравнению с MB1. Действительно, эксперимент подтверждает данное предположение. Показано, что рибобикон MB2 при температуре максимума активности фермента (37°C) однозначно дискриминирует однонуклеотидную замену.

#### **Литература:**

1. Bratt R., Scott B., Whitney S., Bryan R.N., Cloney L., Lebedev A. Detection of nucleic acids by cycling probe technology on magnetic particles: high sensitivity and ease of separation // *Nucleosides & Nucleotides*. 1999. V. 18(6&7). P. 1297-1299.

2. Duck P., Alvarado-Urbina G., Burdick B., Collier B. Probe amplifier system based on chimeric cycling oligonucleotides // *BioFeedback*. 1990. V.9. No.2. P. 142-146

**Взаимодействие цистеин-богатого белка карлавируса с нуклеиновыми кислотами  
Игнатович И.В., Луховицкая Н.И., Соловьев А.Г.**

Студент четвертого курса

Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова, факультет  
биоинженерии и биоинформатики  
[chivik@gmail.com](mailto:chivik@gmail.com)

Малые регуляторные цистеин-богатые белки (ЦББ) кодируются генами ряда (+)РНК-содержащих вирусов растений. По степени структурного сходства ЦББ можно разделить на две группы. К первой относятся белки, кодируемые вирусами родов *Hordeivirus*, *Tobravirus*, *Benyvirus*, *Pecluvirus* и *Furovirus*. Многие белки этой группы участвуют в регуляции репликации и экспрессии вирусного генома, системного транспорта вируса и являются детерминантами патогенности. Для ряда ЦББ этой группы была продемонстрирована способность подавлять посттранскрипционное умолкание генов (ПТУГ). Вторую группу составляют ЦББ, кодируемые вирусами, относящимися к родам *Allexivirus* и *Carlavirus*. ЦББ принадлежащие к этой группе являются детерминантами патогенности вирусов, определяя характер их взаимодействия с растением хозяином, не являясь при этом супрессорами ПТУГ, или факторами авирулентности.

Объектом данного исследования является белок 12К - ЦББ CVV (*Carlavirus*). Ранее было показано, что при экспрессии в клетках растений 12К локализуется в ядре. Было показано, что ЦББ PVM (карлавируса, родственного CVV) обладает ДНК- и РНК-связывающей активностью *in vitro*, однако эта активность не была охарактеризована. Центральная область последовательности, консервативная у белка 12К CVV и ЦББ других карлавиров, содержит богатый аргинином мотив и мотив цинкового пальца, которые присутствуют у ряда белков, связывающих нуклеиновые кислоты. На основании этих данных можно предполагать влияние белка 12К на транскрипционный статус определенных генов за счет его способности связывать ДНК и/или на созревание и транспорт мРНК из ядра в том случае, если реализуется его РНК-связывающая активность.

Целью данной работы было изучение способности белка 12К связывать нуклеиновые кислоты *in vitro* и функциональной роли консервативных мотивов этого белка.

**Исследование промотора гена Nt-4/1 *Nicotiana tabacum***

**Гарушянц Софья Константиновна**

студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: [garushyants@gmail.com](mailto:garushyants@gmail.com)

Белок At-4/1 *Arabidopsis thaliana* был выявлен как один из партнеров транспортного белка вируса пятнистой вялости томатов при скрининге библиотеки кДНК *A.thaliana* в дрожжевой двугибридной системе (von Bargon et al.,2001).

Дальнейшее изучение At-4/1, показало, что этот белок является возможным фактором внутри- и межклеточного транспорта в растениях. Гены белков, близкородственных At-4/1, были обнаружены и в геномах других видов растений, как двудольных так и однодольных (Paare et al., 2006).

Регуляция экспрессии и, в частности, регуляция на уровне транскрипции гена At-4/1 и подобных ему белков в настоящее время не изучена. Объектом данной работы является промотер гена Nt-4/1, гомолога At-4/1, кодируемого *Nicotiana tabacum*.

Анализ последовательностей промотеров эукариот с целью выявления их необходимых элементов связано со значительными трудностями, поскольку сайты связывания белков-регуляторов транскрипции представлены короткими участками длиной 6-10 нуклеотидных пар. Кроме того, существенную роль играют и энхансерные области, обычно достаточно протяженные. Вследствие этого пока не разработан универсальный метод предсказания функциональных элементов в промотерах эукариот, и предсказания, сделанные на основе анализа последовательности, требуют экспериментальной проверки с помощью мутагенеза и делеционного анализа.

Целью настоящей работы является исследование промотерной области гена Nt-4/1, а именно проведение делеционного анализа для выявления минимального промотера этого гена, т.е. области, необходимой и достаточной для его экспрессии, и поиск потенциальных сайтов связывания транскрипционных факторов с помощью сравнительного анализа последовательностей промотеров генов-гомологов Nt-4/1 из различных видов растений.

### Литература

1. Paare M, Solovyev A.G., Erokhina T.N., Minina E.A., Schepetilnikov M.V., Lesemann D.E., Schiemann J., Morozov S.Y., Kellmann J.W. (2006) At-4/1, an interactor of the *Tomato spotted wilt virus* movement protein, belongs to a new family of plant proteins capable of directed intra- and intercellular trafficking. *Mol Plant Microbe Interact.* 19(8),874-883.
2. von Barga S., Salchert K., Paare M., Piechulla B. and Kellman J.-W. (2001) Interactions between the *Tomato spotted wilt virus* movement protein and proteins showing homologies to myosin, kinesin and DnaJ-like chaperones. *Plant Physiol. Biochem.* 39, 1083-1093.

### Предотвращение дисфункции митохондрий и гибели клеток почки ингибиторами GSK-3.

Васильева А.К., Плотников Е.Ю., Зоров Д.Б.

Аспирант, кандидат биологических наук, доктор биологических наук.

МГУ им. М.В. Ломоносова, Факультет Биоинженерии и Биоинформатики, Москва, Россия.

*Vasileva.alena@gmail.com*

Огромное внимание в последнее время приобретает исследование механизмов гипоксического прекодиционирования и методов его фармакологической симуляции. Ключевую роль в сигнальных путях прекодиционирования играет киназа гликоген синтазы (GSK-3), активность которой регулирует развитие митохондриальной неспецифической проницаемости (МНП). Участие этого фермента в регуляции гибели клетки уже показано на моделях ишемии сердца и предполагается для мозга. Однако, существование данного сигнального каскада практически не описано для клеток нефрона почки.

Поскольку исследование почек на целом органе и интактном животном очень трудно методологически, моделью была выбрана первичная культура клеток канальцевого эпителия почки крыс. Основной целью данной работы было исследование изменений структуры и функционирования митохондрий при ишемии/реоксигенации, а также возможности предотвращения последствий окислительного стресса через регуляцию активности GSK-3.

Было показано, что ишемия, то есть гипоксия, совмещенная с глюкозной депривацией, вызывает гибель клеток почки. Гибель клеток составляла приблизительно 60 % по отношению к контролю. В случае гипоксии гибель клеток была очень незначительная.

Центральная роль в процессах, направляющих клетки на путь гибели, принадлежит развитию митохондриальной дисфункции: после ишемии/реоксигенации выявлено снижение потенциала митохондрий и повышение продукции АФК. Очевидно, данные явления связаны с развитием МНП, так как циклоспорин защищает клетки от гибели, вызванной ишемией/реоксигенацией.

Олигомицин, ингибитор митохондриальной АТФ-синтазы, значительно усиливает гибель клеток в условиях гипоксии (менее 1% живых клеток по отношению к контролю), когда процессы окислительного фосфорилирования невозможны. Это указывает на важность для выживания клетки процессов поддержания потенциала за счет гидролиза АТФ, полученной в процессе гликолиза, АТФ-синтазой митохондрий.

Инкубация клеток с ингибиторами GSK-3, например, ионами лития или инсулином, приводила к значительному уменьшению негативных последствий ишемии/реоксигенации, что выражалось в увеличении количества выживших клеток (гибель клеток составила менее 30%). При этом потенциал митохондрий повышался (флуоресценция TMRE увеличивалась приблизительно на 5-7% после ишемии, которой предшествовала инкубация с литием и инсулином, по отношению к флуоресценции TMRE после ишемии). Генерация АФК в результате ишемии/реоксигенации после воздействия ионами лития и инсулином значительно снижалась (флуоресценция 2,7-DCF после ишемии/реоксигенации, которой предшествовала инкубация с LiCl или инсулином, уменьшалась почти в 2 раза по отношению к ишемии/реоксигенации).

Таким образом, мы показали, что ишемия/реоксигенация вызывает гибель клеток почки в первую очередь за счет развития МНП и связанной с этим гиперпродукции АФК. При этом ингибирование активности GSK-3 способно предотвратить повреждение митохондриального аппарата и развитие окислительного стресса в клетках эпителия почки. Подобная стратегия подавления GSK-3 специфическими ингибиторами, позволяющая снижать негативные последствия ишемии и повышать выживание клеток почки указывает на перспективные направления разработки фармакологических агентов, предотвращающих острую почечную недостаточность в условиях ишемии в клинике.

## **ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ *BACILLUS INTERMEDIUS* В УСЛОВИЯХ АЗОТНОГО ГОЛОДАНИЯ В РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММАХ *BACILLUS SUBTILIS***

**Сабирова А.Р., Каюмов А.Р., Шарипова М.Р.**

*Студент, научный сотрудник, профессор*

*Казанский государственный университет, биолого-почвенный факультет, Казань,  
Россия*

*e-mail: [albina-12@mail.ru](mailto:albina-12@mail.ru); (843)231256*

Клеточный ответ на азотное голодание включает инициацию экспрессии ряда генов, включая гены протеолитических белков. Предпочтительным источником азота для бактерий является аммоний. В метаболизме азота участвуют 3 глобальных клеточных регулятора CodY, TnrA, GlnR, а также NrgA и NrgB регуляторные белки, участвующие в транспорте аммония в клетку. При переходе в стационарную фазу бациллами секретируются сериновые и металлопротеиназы, их соотношение во внеклеточном пуле не равнозначно. В отличие от сериновых протеиназ, металлопротеиназа не обладает выраженной специфичностью к аминокислотам, ее роль для клетки остается невыясненной. Представляло интерес исследовать влияние систем азотной катаболитной репрессии на биосинтез этого фермента. Использовали клон, несущий ген металлопротеиназы *B.intermedius* (*nprBi*), любезно предоставленный для работы профессором Костровым С.В. ИМГ РАН. Исследование экспрессии гена *nprBi* в беспротеазном штамме *B.subtilis* AJ73 проводили на синтетических средах (SMM) с использованием в качестве единственного источника азота хлорида аммония (среда, обогащенная азотом) и нитрата натрия (условия лимитации по азоту). При росте на среде, содержащей 20 мМ нитрат натрия, продуктивность культуры относительно синтеза металлопротеиназы была в 2 раза выше, чем в среде с хлоридом аммония. Аналогичные результаты получены нами в отношении сериновой протеиназы. Таким образом, при наличии в среде предпочтительного источника азота, синтез обеих протеиназ подавляется. Мы исследовали экспрессию гена *nprBi* в штаммах *B.subtilis*, дефектных по белкам NrgA и NrgB, формирующих аппарат транспорта ионов аммония через цитоплазматическую мембрану. Изучение экспрессии гена этого фермента на среде LB показало, что дефект обоих белков NrgA и NrgB оказывает влияние на образование металлопротеиназы - уровень протеолитической активности превышал уровень контроля в 2 и 3 раза, соответственно. По-видимому, эти регуляторные белки необходимы для эффективной транскрипции гена *nprBi*. Однако, исследование экспрессии гена металлопротеиназы в штаммах, дефектных по NrgA и NrgB белкам, при росте на синтетической среде показало, что независимо от того, какой источник азота был внесен в среду, она была незначительно ниже по сравнению с контрольной средой (условия лимитации по азоту). Было заключено, белки NrgA и NrgB не оказывают выраженное влияние на экспрессию гена металлопротеиназы *B.intermedius*. В отличие от металлопротеиназы, регуляторные белки NrgA и NrgB оказывают более выраженное влияние на экспрессию гена сериновой протеиназы - недостаток азота способствует повышению экспрессии этого гена. Таким образом, регуляция генов двух протеиназ регулируется по типу азотной катаболитной репрессии - при наличии в среде предпочтительного источника азота, синтез протеиназ подавляется, и повышается в условиях азотного голодания. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 05-04-48182-а.

**Субтилизиноподобная протеиназа *Bacillus intermedius*, секретируемая  
рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* AJ 73: физико-химические свойства  
Михайлова Екатерина Олеговна, Каримова Мадина Рафаэлевна, Шарипова  
Маргарита Рашидовна**

*аспирант; студент; доктор наук, профессор  
Казанский государственный университет, Казань, Россия  
E-mail: ekaterina-kitten@yandex.ru*

К настоящему моменту подавляющее большинство протеаз, входящих в состав детергентов, - бактериальные сериновые протеазы. Субтилизиноподобные сериновые протеиназы, обладая широкой субстратной специфичностью, стабильностью при высоких значениях pH, активностью в широком интервале температур, устойчивостью к

хелатирующим и окисляющим агентам, идеально подходят для использования в составе детергентов. Актуальным представляется поиск новых бактериальных протеиназ, сохраняющих активность в присутствии окислителей, денатурирующих веществ, а также в растворах с высокой ионной силой. Из культуральной жидкости *B.subtilis* с помощью ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе и высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке MonoS в системе FPLC были выделены 2 фракции субтилизиноподобной протеиназы, секретируемые на 28-й (первая фракция) и 48-й (вторая фракция) часы роста культуры.

Исследование влияния SDS на субтилизиноподобную протеиназу *B. intermedius*, секретируемую рекомбинантным штаммом *B. subtilis*, показало, что в присутствие данного денатурирующего агента в концентрации от 0,1 до 0,5 % активность первой и второй фракций протеиназы практически не изменялась, однако прединкубация обеих белковых фракций в течение 1 ч с SDS в концентрации от 0,2 до 5 % вела к полной потере активности ферментов. Показано, что фермент сохраняет активность в присутствии 10 мМ  $H_2O_2$  на уровне контроля, активность обеих фракций незначительно снижалась в присутствии 20 и 40 мМ  $H_2O_2$ . Прединкубация субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* с 10 и 20 мМ  $H_2O_2$  в течение 1 ч также не оказывала существенного влияния на активность фермента, но в концентрации 40 мМ активность первой фракции снижалась на 40 %, а второй – на 25 %. Показано, что в присутствие низких концентраций этанола (5, 10 %) активность первой фракции протеиназы не снижалась, в отличие от второй фракции фермента. Высокие концентрации  $C_2H_5OH$  (25, 50 %) подавляли активность протеиназы более чем на 50 %. В присутствии NaCl (20 %) активность протеиназы повышалась на 30 %. Прединкубация обеих фракций протеиназы в течение 1 ч с NaCl привела к повышению активности первой фракции протеиназы на 75, а второй – на 50 %. Прединкубация обеих фракций с NaCl в течение 24 ч позволила повысить активность первой фракции протеиназы в 2 раза (10-20 % NaCl), а второй – в 2,5 – 3 раза (15-20 % NaCl). Такое увеличение активности субтилизиноподобных протеиназ *B.intermedius* за счет повышения ионной силы может быть связано с определенным вкладом гидрофобных взаимодействий в структуру молекулы белка. Полученные результаты свидетельствуют о возможных изменениях в конформации фермента при смене механизма регуляции его синтеза на разных стадиях роста культуры.

Работа поддержана грантом РФФИ 05-04-48182-а.

### **Гетерологичная экспрессия модифицированного гена субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius***

Байрамов Р.А., Соколова О.В., Каримова М.Р., Каюмов А.Р., Шарипова М.Р.

*Студент, студент, студент, научный сотрудник, профессор*

Казанский Государственный Университет, биолого-почвенный факультет, Казань, Россия

*E-mail: robert.bayramov@mail.ru*

Субтилизиноподобная протеиназа *Bacillus intermedius* – продукт гена *aprBi* (accession number AY754946). Ген протеиназы был клонирован на плазмиде pCS9, производной вектора pCB22. Показано, что экспрессия гена *aprBi* подвергается множественному контролю со стороны различных регуляторных систем. Представляло интерес исследовать особенности регуляции экспрессии гена *aprBi* путём получения генетически модифицированного гена с нарушениями в промоторной области. Плаزمид

pCS9 несёт 61кб участок хромосомной ДНК *B.intermedius*, содержащий ген *aprVi*. Проводили рестрикционное картирование плазмидной ДНК. Установлено, что ген *aprVi* расположен внутри 3кб фрагмента ДНК, фланкированного сайтами рестрикции Hind III и Eco R V. Проводили субклонирование фрагмента хромосомной ДНК *B.intermedius*. Ген *aprVi* был амплифицирован с плазмиды pCS9 полностью и с укороченной на 700 п.н. областью промотора. Амплифицированные последовательности полного и дефектного гена были клонированы в вектор pUC19 и далее переклонированы в вектор pUP110. Полученными плазмидами были трансформированы лабораторный штамм *B.subtilis*, дефектный по белку – регулятору азотного обмена TnrA и штамм *B.subtilis* AJ73, дефектный по собственным внеклеточным протеиназам. Изучена гетерологичная экспрессия модифицированного гена в клетках *B.subtilis*.

### Биосинтез эндонуклеазы рекомбинантным штаммом *Serratia marcescens*

**Шах Махмуд Райхан<sup>1</sup>, Филимонова Мария Николаевна<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>студент, <sup>2</sup>ведущий научный сотрудник, д.б.н.

Казанский государственный университет им. В.И.Ульянова-Ленина, биолого-почвенный факультет, Казань, Россия

E-mail: [raihan@inbox.ru](mailto:raihan@inbox.ru)

Внеклеточная эндонуклеаза (КФ 3.1.4.9) Грам отрицательных бактерий *Serratia marcescens* является одним из наиболее изученных ферментов в ряду бактериальных нуклеаз с широкой специфичностью. Нуклеаза *S. marcescens* (Sma nuc) расщепляет одно и двухцепочные ДНК и РНК с образованием фрагментов разной степени полимерности, фосфорилированных в 5'-положении. Благодаря биологической активности эндонуклеазу применяют на практике (Аликин и др, 1998). Несмотря на значительный прогресс в исследовании Sma nuc: установлены ключевые биохимические свойства, структура, механизм действия, - изучение нуклеазы продолжается. В частности, задачей настоящего исследования было проведение анализа динамики роста и биосинтеза нуклеазы рекомбинантным штаммом *S.marcescens* prt4, несущим плазмиду со структурным геном *nuc*. Для решения поставленной задачи провели отбор наиболее активного по нуклеазе клона бактерий на селективной питательной среде, включающей ДНК или РНК и индикатор метиловый зеленый. Затем отобранный клон выращивали на среде LB, содержащей 0,05% ампициллина, при 37<sup>0</sup>С. Установлено, что биосинтез эндонуклеазы представляет двухступенчатый процесс, проявлением которого служат два пика активности на кривой накопления нуклеазы в питательной среде. Вершина первого пика с 18-ым часом роста и развития микробной популяции, второго – с 23-им часом, что соответствовало стационарной фазе. При этом уровень активности фермента на 23-ий час культивирования бактерий был выше, чем на 18-ый час. В обоих случаях эндонуклеаза была представлена двумя изоформами, что установлено электрофорезом в полиакриламидном геле в сочетании с субстратным блоттингом.

### Литература

1. Аликин Ю.С., Сенженко Л.П. (1998) Развитие технологии получения и перспективы использования эндонуклеазы *Serratia marcescens* // Ферменты микроорганизмов: Сб. Докладов XI Всероссийской конференции. Казань, с. 152-163

### Регуляция экспрессии генов рибонуклеаз *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus circulans*

Ульянова Вера Владимировна, Золотова Мария Андреевна, Вершинина Валентина  
Ивановна

**Аспирант; студент; к.б.н, доцент**

Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина, биолого-почвенный  
факультет, Казань, Россия

E-mail: vera84@inbox.ru

Гуанилспецифичные рибонуклеазы *Bacillus thuringiensis* (РНКаза Vth) и *Bacillus circulans* (РНКаза Vci) по особенностям первичной структуры, основным физико-химическим и каталитическим характеристикам относят, соответственно, к биназоподобным (РНКаза *B.intermedius*) и барназоподобным (РНКаза *B.amyloliquefaciens*). Однако сведений относительно механизмов регуляции синтеза ферментов недостаточно, чтобы провести классификацию по данному признаку. Ранее было установлено, что неорганический фосфат подавляет синтез РНКазы Vth и в меньшей степени РНКазы Vci. Двухкомпонентная система трансдукции сигнала PhoP-PhoR, контролирующая специфический ответ клеток *B.subtilis* на фосфатное голодание, позитивно регулирует экспрессию гена РНКазы Vth и не влияет на синтез РНКазы Vci.

Целью настоящего исследования было выяснение роли двухкомпонентной системы трансдукции сигнала ResD-ResE *B.subtilis*, опосредующей один из путей активации PhoP-PhoR системы, в регуляции экспрессии генов гуанилспецифичных рибонуклеаз *B.thuringiensis* и *B.circulans*. Штаммы *B.subtilis* с делециями генов регулятора ответа *resD* (LAB2506) и гистидин киназы *resE* (LAB2234), а также контрольный штамм (JH642) были трансформированы плазмидами, несущими полные гены рибонуклеаз Vth и Vci, состыкованные с геном внутриклеточного ингибитора барстара. Количество рибонуклеазы определяли в культуральной жидкости рекомбинантных штаммов, выращенных на бесфосфорной синтетической среде, по кислоторастворимым продуктам гидролиза модельного субстрата - РНК.

Изучение динамики роста рекомбинантных штаммов и накопления РНКаз Vth и Vci показало, что синтез обоих ферментов осуществляется в стадии замедления роста культур. Максимальные значения РНКазной активности отмечаются в период с 18 по 26 час, что соответствует стационарной фазе роста бактерий. Уровень рибонуклеазной активности в рекомбинантных штаммах *B.subtilis*, дефектных по ResD белку, снижен на 90% (РНКаза Vth) и 50% (РНКаза Vci), а в штаммах с делецией *resE* гена – на 20% (РНКаза Vth) и 30% (РНКаза Vci) по сравнению с контрольным штаммом. Значительное снижение уровня рибонуклеазной активности свидетельствует о положительном влиянии белка ResD на экспрессию генов РНКаз Vth и Vci.

#### УДК 577.3;544.7

##### **ДНК молекулой организованные фуллереновые наноструктуры**

Белеля Олеся Петровна, Спорыш Ирина Марковна<sup>1</sup>, Порядченко Александр Николаевич\* Лыско Игорь Игоревич \*\*, Кисиль Елена Александрова 2\*\*\*

\*студенты, \*\*научный сотрудник, \*\*\* ассистент

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, радиофизический  
факультет, Киев, Украина

E-mail: irinamarkivna@ukr.net

Конструирование фуллереновых наноструктур, используя ДНК, основано на изученных нами свойствах

- ДНК двойной спирали в водных суспензиях имеют отрицательный заряд, из-за фосфатных групп на поверхности вдоль нити;

- фуллерена C<sub>60</sub>, иммобилизованного кислородом и гидроксильными группами иметь положительный заряд в водных суспензиях [1, 2]. Эти свойства определяют возникновение Кулоновского взаимодействия между ДНК и фуллереновыми молекулами, которые обуславливают организацию фуллереновых наноструктур. Модели организации линейных структур из C<sub>60</sub> молекул экспериментально подтверждены методом атомной силовой микроскопии для ДНК молекул на иммобилизированной NH<sup>+</sup> поверхности слюды. Образование C<sub>60</sub> наноструктур изучено методом исследования оптических характеристик (спектров поглощения и фотолюминесценции) C<sub>60</sub> коллоидных растворов и ДНК-C<sub>60</sub> водных суспензий.

Выявленные особенности в спектрах поглощения (200-750 нм) и в фотолюминесцентных спектрах (400-670 нм) для иммобилизованных фуллеренов в водных растворах и в суспензиях с ДНК молекулами (длинное двуспиральное ДНК - "Lambda" формы) подтверждают организацию наноструктур из донорно-акцепторных пар ( фуллерен-ДНК база) для конструирования фотозонда в видимом диапазоне.

1. Belelia Olesia. The conceptions of constructions nanomaterials and nanosystems from DNA molecules. In the book: Proceedings of the XIII Conference for Undergraduate and Graduate Students and Young Scientists "Lomonosov-2006", volume VI, Moscow University Press, 2006, p.7-8.
2. I. Sporysh, O.Belelia, S.Pud, D.Slobodyanyuk, D.Zherebetsky, O.Kysil, O.Ivanyuta, T. Erb, G. Gobsch, L. Weber, L. Carta-Abelmann, U. Ritter, P.Scharff DNA –templated C<sub>60</sub>, C<sub>70</sub> derivatives in aqueous suspensions and on substrates : the route to design of fullerene nanophotoprobe in visible range . In the Work Book : Nanobiotechnology – Current State and Future Prospects for Cooperation- ,Ukrainian –German, Symposium, December 14-16, 2006, Kyiv, Ukraine, Kyiv Taras Shevchenko National University, National Academy of Sciences of Ukraine (NASU) [www.nanobiotech.chem.univ.kiev.ua](http://www.nanobiotech.chem.univ.kiev.ua)

1. С.И.М. – стипендиат Программы Леонарда Эйлера, Немецкой Службы Академических Обменов, для написания диплома магистра (2006-2007), Технический университет Ильменау, Германия

2. К.Е.А.- стипендиат Программы Немецкой Службы Академических Обменов, для научно-исследовательской работы молодых учёных, Технический университет Ильменау, Германия. 2006-2007

### **Получение рекомбинантных штаммов дрожжей *Pichia pastoris*, экспрессирующих растворимый белок CD18**

*Князев Дмитрий Игоревич, Бабаев Алексей Александрович*  
магистр; преподаватель, к.б.н.

*Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия*

*E-mail: [alexisbabaev@list.ru](mailto:alexisbabaev@list.ru)*

CD18 – β-цепь гетеродимерных адгезивных молекул, относящихся к суперсемейству интегринов и экспрессирующихся на лейкоцитах. Они участвуют в формировании адгезивных контактов, необходимых при миграции клеток иммунной системы, а также для обеспечения процесса презентации антигена. Недавно было показано наличие в сыворотке крови человека растворимых форм CD18, которые образуются за счёт протеолитического отщепления мембранных форм (Бабаев и др., 2003; Evans et al., 2006). Нами обнаружено, что при различных патологических состояниях наблюдаются изменения концентрации в сыворотке крови растворимых

форм CD18, которые могут выступать в качестве показателей тяжести течения и прогноза заболеваний (Бабаев, 2004).

Для исследования структурно-функциональных свойств и для оценки количественного содержания растворимой формы CD18 необходимо получение рекомбинантного аналога данного белка, что и явилось целью работы.

Внеклеточный регион CD18, представляющий растворимую форму данного белка, содержит 660 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 84 кДа. Соответствующая последовательность ДНК была получена с помощью метода ОТ-ПЦР. В качестве матрицы для синтеза кДНК использовали тотальную РНК, выделенную из лимфоцитов периферической крови человека. На следующем этапе было осуществлено клонирование кДНК в *E. coli* штамм Top10 с использованием челночного плазмидного вектора pPICZ $\alpha$  В. Отбор трансформантов *E. coli*, содержащих рекомбинантную плазмиду pPICZ $\alpha$  В/CD18, проводили методом ПЦР и рестрикционного анализа.

Векторная плазида pPICZ $\alpha$  В содержит полилинкер, фланкированный регуляторными элементами гена алкогольоксидазы (AOX1). В клетках дрожжей *Pichia pastoris* регуляторные элементы гена AOX1 в составе вектора рекомбинируют с гомологичными последовательностями генома дрожжей. В результате этого последовательность внеклеточного региона CD18 оказывается интегрированной в дрожжевой геном, а её экспрессия находится под контролем индуцибельного промотора гена AOX1. Предварительно очищенный и линеаризованный рекомбинантный вектор pPICZ $\alpha$  В/CD18 был введён в клетки дрожжей *Pichia pastoris* штамм X-33 методом химической трансформации. Отбор трансформантов, несущих в геноме последовательность внеклеточного региона CD18 антигена, проводили методом ПЦР.

Таким образом, в результате проведённой работы получены дрожжевые штаммы, содержащие в геноме последовательность внеклеточного региона CD18, и, предположительно, продуцирующие данный белок.

#### Литература

1. Бабаев А.А. Дисбаланс сывороточных концентраций молекул адгезии при различных патологиях // Мат-лы IX нижегородской сессии молодых ученых (Естественнонаучные дисциплины). – Нижний Новгород, 2004. – С. 200-202.
2. Бабаев А.А., Егорова Н.И., Новиков В.В. Метод определения сывороточного содержания растворимой формы CD18 антигена // Тез. докл. II Всероссийского симпозиума «Тест-методы химического анализа». – Саратов, 2004. – С. 54-54.
3. Evans B.J., McDowall A., Taylor P. et al. Shedding of lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) in a human inflammatory response // Blood. – 2006. – Vol. 107. – P. 3593-3599.

#### **Определение верхнего экситонного уровня димера бактериохлорофилла реакционного центра из фотосинтезирующей пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* методом производной спектроскопии высокого порядка с помощью специализированного спектрофотометра.<sup>5</sup>**

Руданов Григорий Сергеевич<sup>6</sup>  
студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

---

<sup>5</sup> Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (06-04-49072)

<sup>6</sup> Научный руководитель — зав. отделом фотосинтеза и флуоресцентных методов исследования .ф.-м.н. А. П. Разживин.

Физический факультет и НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,  
Москва, Россия  
e-mail: greg\_sar@mail.ru

Фотосинтез является одним из наиболее важных процессов в биосфере Земли. Благодаря ему различные фотосинтезирующие организмы, такие как растения, сине-зелёные водоросли и фотосинтезирующие бактерии, способны эффективно преобразовывать и запасать солнечную энергию в форме энергии химической связи органических соединений. Этот процесс является основным источником кислорода и органических веществ, потребляемых всеми живыми организмами, поэтому его изучение является одной из актуальных задач современной биофизики и биохимии.

Наиболее просто фотосинтетический аппарат устроен у пурпурных бактерий, являющихся классическим объектом исследований фотосинтеза. Фотоактивные реакционные центры (РЦ) из клеток фотосинтезирующей пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* представляют собой уникальный объект для изучения физических механизмов высокоэффективного преобразования световой энергии.

В литературе до сих пор нет единого мнения о точном положении максимумов индивидуальных полос и о других спектральных характеристиках мономерных бактериохлорофиллов и верхнего экситонного уровня фотоактивного димера реакционного центра, полосы поглощения которых, перекрываются в области около 800 нм. Однако решение этого вопроса является важным, в частности, для изучения процессов переноса возбуждения по пигментам и разделения зарядов в РЦ.

Основной задачей настоящей работы было определение положения верхнего экситонного уровня димера БХл в реакционном центре фотосинтезирующей пурпурной бактерий *Rhodobacter sphaeroides* с использованием метода производной спектроскопии высокого порядка. Кроме того необходимо было изучить возможность создания специализированного спектрофотометра с чувствительностью порядка  $10^{-6}$  опт.ед., что представляет значительный интерес для работ по производной спектроскопии высокого порядка, поскольку достигаемый порядок производной прямо пропорционален отношению сигнал/шум в обрабатываемых спектрах.

Для идентификации индивидуальных полос поглощения РЦ в области 800 нм, а также их количественного описания был использован разработанный ранее в нашей лаборатории метод производной спектроскопии высокого порядка.

В ходе работы были получены спектры оптического поглощения окисленных и восстановленных РЦ из *Rb. sphaeroides*, пригодные для обработки методом производной спектроскопии. После разложения спектров на производные было определено положение верхнего экситонного уровня димера бактериохлорофилла в восстановленных и окисленных РЦ. Кроме этого был создан макет специализированного спектрофотометра для производной спектроскопии высокого порядка.

**Перенос энергии возбуждения между молекулами бактериохлорофилла и каротиноидами периферического светособирающего комплекса LH2 фотосинтезирующих пурпурных бактерий.<sup>7</sup>**

Степаненко Илья Александрович<sup>8</sup>  
студент

---

<sup>7</sup> Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (06-04-49072)

<sup>8</sup> Научный руководитель — зав. отделом фотосинтеза и флуоресцентных методов исследования д.ф.-м.н. А. П. Разживин.

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова  
Физический факультет и НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,  
Москва, Россия  
e-mail: step@list.ru*

В светособирающей антенне пурпурных бактерий LH2 основными пигментами являются молекулы бактериохлорофилла (БХл), а вспомогательными — каротиноиды. Считается, что молекулы каротиноидов выполняют три основных функции — защитную, структурную и функцию увеличения светосбора в видимой области спектра. Последняя функция реализуется благодаря переносу энергии синглетного возбуждения от каротиноидов к БХл.

В данной работе поставлена задача изучения путей переноса энергии возбуждения между основными пигментами (молекулами бактериохлорофилла) и вспомогательными пигментами (молекулами каротиноидов) в периферической светособирающей антенне LH2 фотосинтезирующих пурпурных бактерий на основе экспериментального исследования двух образцов: комплекса LH2 из клеток дикого типа (содержащих каротиноиды) и из клеток с подавленным синтезом каротиноидов.

В ходе работы получены спектры оптического поглощения и исправленные спектры возбуждения флуоресценции комплекса LH2 из клеток *Chr. minutissimum* дикого типа (содержащих каротиноиды) и из клеток с подавленным синтезом каротиноидов.

Рассчитаны относительные квантовые эффективности переходов на нижний энергетический уровень при возбуждении в разные полосы БХл и каротиноидов для комплексов LH2 из клеток обоих типов и составлена полная схема переноса энергии возбуждения между пигментами.

Возможность работать одновременно с комплексами LH2 из клеток дикого типа и из клеток с подавленным синтезом каротиноидов позволило однозначно установить существование пути переноса энергии возбуждения высоких возбужденных состояний (В-состояний) БХл на каротиноиды. Было показано, что в комплексе LH2 из клеток *Chr. minutissimum* дикого типа энергия возбуждения переносится от высоких возбужденных состояний (В-состояний) БХл на уровень S<sub>3</sub> каротиноидов с эффективностью около 19%.

Существование этого пути переноса энергии необходимо учитывать при исследовании возбуждения каротиноидов ультракороткими импульсами (в диапазоне 800—850 нм), приводящему к заселению В-состояний через двухфотонное поглощение света БХл с последующим переносом энергии возбуждения от БХл на каротиноиды.

### **Взаимодействие гем-медных терминальных оксидаз группы В с цианидом**

*Калинович Анастасия Валерьевна<sup>9</sup>  
аспирант*

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова  
Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия  
e-mail: kalinovich\_anast@mail.ru*

Терминальная оксидаза – конечный фермент дыхательной цепи, осуществляющий реакцию четырехэлектронного восстановления кислорода до воды и

---

<sup>9</sup> Научный руководитель работы – д.б.н. А.А. Константинов. Работа выполнена на кафедре биохимии факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова.

сопряженный с ней перенос протонов через мембрану с образованием трансмембранного протонного градиента.

Большинство терминальных оксидаз принадлежат к гем-медному семейству, в котором выделяют группы А, В и С. Наиболее изучены представители группы А, включая митохондриальную оксидазу. Терминальные оксидазы группы В найдены, главным образом, у термофильных бактерий. Наиболее изученной из них является цитохромоксидаза  $ba_3$  из *Thermus thermophilus*, для которой построена трехмерная структура.

Реакция оксидазы с цианидом, как классическим экзогенным лигандом, является удобной моделью для изучения работы фермента, особенностей взаимодействия с естественным субстратом – кислородом.

Каталитические центры ферментов групп А и В обнаруживают существенные различия. На функциональном уровне, важным отличием группы В является неспособность полностью окисленного биядерного центра к связыванию экзогенных лигандов [5].

Нашей целью было изучить взаимодействие классического модельного лиганда – цианида с частично восстановленной формой оксидаз группы В. Объектом исследования служили цитохром  $ba_3$  из *Thermus thermophilus* и  $aa_3$  из *Acidianus ambivalens*. В ходе работы обнаружили серьезные отличия от «классических» ферментов (группы А).

Кинетика связывания цианида с восстановленным биядерным центром оксидазы  $ba_3$  описывается моделью бимолекулярной реакции, константа скорости второго порядка  $k_{on} = 1,253 \pm 0,075 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \times \text{c}^{-1}$ . Диссоциация цианидного комплекса характеризуется константой скорости  $k_{off} = 3,704 \times 10^{-6} \text{ c}^{-1}$ . Константа диссоциации  $K_d = k_{on}/k_{off} = 2,95 \times 10^{-8} \text{ M}$ , что согласуется с термодинамической оценкой данной величины. Таким образом, сродство цитохрома  $ba_3$  к цианиду является уникально высоким среди известных гемопротеидов [3].

Была обнаружена неизвестная ранее рН-зависимость реакции оксидазы  $ba_3$  с цианидом. При защелачивании среды до рН 10.0 сродство фермента к цианиду на порядок ниже, чем при рН 7.6. В результате изучения рН-зависимости реакции была предложена модель ее протекания. Связывание цианида с биядерным центром фермента контролируется протонированием внутрибелковой группы с  $pK_a = 8.4$ . Связывание цианида с восстановленным биядерным центром оксидазы  $aa_3$  из *Acidianus ambivalens* имеет сложный характер, который может быть связан с образованием промежуточного комплекса.

Представленные результаты важны для понимания механизма катализа оксидазной реакции гем-медными ферментами.

## Ингибирование 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса мозга фосфоаноаналогами 2-оксоглутарата

Климук Е.И.<sup>1\*</sup>, Буник В.И.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Факультет Биоинженерии и Биоинформатики и <sup>2</sup> НИИФХБ им. А.Н.Белозерского МГУ  
им. М.В. Ломоносова

\* Студент 4-го курса Факультета Биоинженерии и Биоинформатики МГУ им. М.В.  
Ломоносова, E-mail: [jonikl@gmail.com](mailto:jonikl@gmail.com)

2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс (ОГДК) катализирует необратимую деградацию 2-оксоглутарата в точке пересечения метаболизма углеводов и аминокислот. Многие нейродегенеративные заболевания сопровождаются частичной инактивацией комплекса мозга. Специфическое ингибирование ОГДК мозга позволяет моделировать такие патологии и охарактеризовать физиологические последствия снижения активности ОГДК. Данная работа посвящена разработке метода специфического ингибирования ОГДК мозга синтетическими аналогами 2-оксоглутарата, в которых отщепляемая карбоксильная группа замещена на фосфоновую. Высокое структурное сходство с субстратом при невозможности разрыва С-Р связи обеспечивает аффинное ингибирование фосфоаноаналогами за счет образования прочного тройного комплекса между аналогом, 2-оксоглутаратдегидрогеназой и ее коферментом - тиаминпирофосфатом. Для улучшения клеточной проницаемости ингибиторов внутриклеточных ферментов применяют модификации, нейтрализующие заряд ингибиторов. В связи с этим в работе были исследованы сукцинилфосфонат и ряд его этилированных производных. Стабильность исходных веществ и используемых растворов была подтверждена спектрами ЯМР. Исследование проводили на частично очищенных препаратах ОГДК мозга крыс.

Показано, что ингибирующая способность фосфоаноаналогов падает в ряду сукцинилфосфонат (СФ) > карбоксиэтил сукцинилфосфонат (КЭСФ) > фосфоэтил сукцинилфосфонат (ФЭСФ) > карбокси, фосфоно-диэтилсукцинилфосфонат (ДЭСФ). При насыщающей концентрации 2-оксоглутарата ( $2\text{ мМ} \sim 20 \cdot K_m^{\text{ОГ}}$ ) величины  $I_{50}$  составляют: 7 мкМ, 25 мкМ и >150 мкМ для СФ, КЭСФ и ФЭСФ/ДЭСФ, соответственно. Преинкубация карбокси, фосфоно-диэтилсукцинилфосфоната с экстрактом мозга крыс в течение 90 мин не приводила к изменению его ингибирующей способности. Это свидетельствует об отсутствии эстеразной активности мозга в отношении эфирных связей фосфонатов в условиях экспериментов по ингибированию ОГДК. При низких (2-4 мкМ) концентрациях СФ и КЭСФ можно наблюдать увеличение их ингибирующей способности на 30-40% в результате преинкубации с ферментом. Очевидно, конформационные изменения первичного фермент-ингибиторного комплекса приводят к более прочному связыванию ингибитора с ферментом. Аналогичный эффект наблюдали и для ФЭСФ (60 мкМ). Полученные данные указывают на двухстадийный механизм взаимодействия фосфонатов с ОГДК и определяющий вклад фосфонатной группы СФ в ингибирование ОГДК мозга.

### **Применение моделей многосубстратной кинетики для описания биокаталитического окисления метана**

*Казаков Дмитрий Александрович  
аспирант*

*Пермский государственный технический университет, Пермь, Россия  
E-mail: kazakovbiotech@mail.ru*

Биокаталитическое окисление метана вызывает в последнее время всё больший интерес, что обусловлено его высоким биотехнологическим потенциалом. Этот процесс, осуществляемый метанотрофными бактериями, может использоваться при решении ряда экологических проблем, связанных эмиссией метана из угольных шахт и полигонов твёрдых бытовых отходов. Кроме того, метанотрофные бактерии могут применяться для микробиологического синтеза кормового белка, ферментных и бактериальных препаратов, полисахаридов и витаминов при использовании метана в качестве углеродсодержащего сырья [1]. В настоящее время отсутствует систематическая информация по описанию кинетики данного процесса. В соответствии с этим, целью настоящей работы является исследование кинетики биокаталитического

окисления метана и описание полученных данных с использованием биокинетических моделей.

Исследование проводили с использованием смешанной культуры бактерий, потребляющих метан в качестве единственного источника углерода и энергии. Показано, что удельная скорость роста исследуемой культуры зависит как от концентрации метана, так и от концентрации кислорода в газовой фазе. Это говорит о том, что для описания процесса бактериального роста и окисления метана могут быть использованы модели многосубстратной кинетики. В данной работе были проанализированы следующие модели: модель Моно-Моно в мультипликативной форме [2]; модель тройного комплекса и модель пинг-понг механизма [3]. Параметры моделей определяли по экспериментальным данным, отражающим зависимость удельной скорости роста от концентрации метана и кислорода в газовой фазе, с использованием нелинейного регрессионного анализа по методу Гаусса – Ньютона [4]. Адекватность моделей оценивали по величине множественного коэффициента корреляции ( $R$ ). Результаты анализа показали, что наиболее точно экспериментальные данные описывает модель Моно-Моно ( $R=0,959$ ), в то время как адекватность моделей тройного комплекса ( $R=0,874$ ) и пинг-понг механизма ( $R=0,894$ ) существенно ниже и находится примерно на одном уровне.

Таким образом, результаты исследования показывают, что процесс биокаталитического окисления метана можно достаточно точно описывать с использованием различных моделей многосубстратной кинетики. Для наиболее точного предсказания скорости исследуемого процесса следует использовать модель Моно-Моно, которая характеризуется большей адекватностью по сравнению с другими проанализированными моделями.

#### Литература

1. Гальченко В.Ф. Метанотрофные бактерии. М.: ГЕОС, 2001. - 500 с.
2. Blanch H.W., Clark D.S. Biochemical engineering. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997. -702 p.
3. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика: Практический курс. –М.: ФИАР-ПРЕСС, 1999. -720 с.
4. Seker S, Beyenal H., Salih B., Tanyolac (1997) Multi-substrate growth kinetics of *Pseudomonas putida* for phenol removal// Appl. Microbiol. Biotechnol. V. 47. p. 610-614.

#### Математическая модель процессов брожения

**Чернышов Александр Владимирович**

старший преподаватель

Ставропольский государственный аграрный университет, г. Ставрополь, Россия

E-mail: [alex\\_novoch@mail.ru](mailto:alex_novoch@mail.ru)

Переработка винограда сопровождается множеством микробиологических процессов, представляющих собой сложные биохимические реакции разложения органических соединений в результате роста и жизнедеятельности как искусственно вносимых в благоприятную для развития среду культур микроорганизмов, так и спонтанной микрофлоры.

К настоящему времени в практике нашли применение и проводятся направленно процессы спиртового, яблочно-молочного, яблочно-спиртового брожения, биологического азотопонижения, вторичного спиртового брожения, хересования, мадеризации, обескислороживания. Технологические расчеты данных процессов

проводятся на основе стехиометрических коэффициентов баланса: основной субстрат – основной продукт. Отсутствие необходимых сведений по кинетике балансов микробиологических процессов и анабиозу этих процессов с позиций роста и метаболизма их возбудителей существенно сдерживает совершенствование технологии переработки винограда.

Многообразие микробиологических и сопутствующих им процессов ведет к необходимости создания единого алгоритма для расчетов процессов переработки винограда, в частности брожения.

Несмотря на существенные различия, протекающих при брожении суслу на мезге процессов, видах участвующих микроорганизмов (винные дрожжи, молочнокислые бактерии, дрожжи-кислотопонижатели), утилизируемом углеродном субстрате, а также методах осуществления процессов представляется возможным дать в общем виде математическую модель, отражающую основные материальные балансы участвующих компонентов, кинетику роста и жизнедеятельности микроорганизмов-возбудителей.

Для построения математической модели рассматривается брожение суслу на мезге с участием винных дрожжей, дрожжей-кислотопонижателей рода шизосахаромицес и молочнокислых бактерий.

Полученная модель описывает все основные способы осуществления бродильных процессов: непрерывное брожение, брожение с возвратом (задержкой) биомассы, доливное и периодическое, а также ряд экстракционных и теплообменных процессов протекающих и без участия микроорганизмов.

Универсальность модели позволяет рекомендовать ее для решения множества частных случаев процессов брожения-культивирования микроорганизмов, например, рассчитывать стационарные режимы непрерывных процессов (левые части уравнений равны нулю). Это должно дать ощутимый практический результат, в первую очередь, при анализе трудно поддающихся логической оценке процессов, связанных с потоками нескольких фаз. Эффективность использования модели, очевидно, будет возрастать по мере накопления знаний о поведении коэффициентов уравнений в зависимости от условий протекания процессов и состава сред.

#### Литература:

1. Косюра В.Т., Донченко Л.В. Основы виноделия. - М.: ДеЛи принт, 2004. – 440 с.
2. Разуваев В.С., Прида И.А. Оптимизация процесса непрерывного брожения виноградного суслу на мезге при приготовлении крепких виноматериалов. Научно-технический реферативный сборник. Винодельческая промышленность. ЦНИИТЭИ Пищепром, М, 5, 1982, стр. 16-21.
3. Фараджева Е.Д., Федоров В.А. Общая технология бродильных производств. – М.: Колос, 2002. – 408 с.

#### Эпигенетическая регуляция рекомбинационной репарации мутацией *rad201G1* у дрозофилы

Полторадня Юлия Александровна  
стажер-исследователь

Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова РАН, Гатчина, Россия  
E-mail: poltoradnya@inbox.ru

В настоящее время при исследовании механизмов репарации двунитевых разрывов (ДР) ДНК у высших эукариот все большее внимание уделяется вопросам регуляции этих механизмов. Нами впервые на материале мутации *rad201G1 Drosophila melanogaster* установлен вариант подобного регуляторного воздействия, связанный с эпигенетической регуляцией репарационных генов. Мутация *rad201G1* является результатом

нуклеотидных замен в перекрывающихся генах *rad201* и *Rad 51C*, а также инсерции ретротранспозона *opus* в регуляторную область гена *Rad51C*. Эпигенетическое свойство рассматриваемой мутации обнаружено при исследовании ее влияния на репарацию ДР ДНК, создаваемых в геноме транспозициями мобильных Р-элементов.

В нашей работе использовалась модель гена *white*, шестой экзон которого несет посадку неавтономного Р-элемента. При скрещивании самок такой линии с самцами, имеющими источник Р-транспозазы, у потомства вызываются транспозиции неавтономных Р-элементов с образованием ДР ДНК. В норме такие события не приводят к повышенной кукольной летальности и увеличению частоты конверсионных событий, которые в данной системе можно учитывать по частоте соматического мозаицизма. При введении одной дозы мутации *rad201G1* в геном, содержащий неавтономные Р-элементы, она вызывает эпигенетические изменения в хромосомах половых клеток, ведущие к высокой частоте смертности потомков при активации Р-транспозиций в их соматических клетках. При температуре культивирования мух 25 °С почти тотальную смертность показывают как потомки, несущие мутацию *rad201G1*, так и несущие нормальную аллель *rad201*<sup>+</sup>. Данный эффект сопровождается повышенной частотой событий рекомбинационной репарации ДР ДНК путем конверсии в соматических клетках всего потомства. Установлено, что снижение температуры культивирования мух до 18°С вызывает полное восстановление выживаемости потомства, при этом частота конверсионных событий существенно увеличивается. В клетках полового ствола эпигенетический эффект мутации *rad201G1* не регистрируется, что может быть связано как с тканеспецифичностью действия мутации, так и с неспособностью половых клеток с нарушениями репарации ДНК проходить через мейоз. Полученные данные обсуждаются с точки зрения вовлеченности мутации *rad201G1* в эпигенетическую регуляцию репарации ДР ДНК и транспозиций неавтономных Р-элементов.

Работа поддержана грантом Президиума РАН “Динамика генофондов растений, животных и человека”.

### **Изучение влияние гена *HSM2* на репарационные процессы в клетках дрожжей Коришнова Александра Геннадьевна**

стажер-исследователь

Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова РАН, Гатчина, Россия  
E-mail: sevan-777@mail.ru

Для поддержания стабильности генетического материала клеткам необходимы эффективные системы репарации, так как при воздействии мутагенных факторов, а также при самой репликации, возникает множество изменений. Одними из таких изменений являются ошибочно спаренные основания (ОСО). Основная система коррекции ошибочно спаренных оснований (КОСО) обладает высокой консервативностью в эволюции и гены, участвующие в ней являются гомологами у различных организмов. Однако с большой долей вероятности можно предполагать, что клетки эукариот обладают дополнительными системами КОСО.

В нашей лаборатории был выделен ряд мутантов с повышенным темпом спонтанного мутагенеза. Наибольшим эффектом на скорость спонтанного мутагенеза обладали мутанты по гену *HSM2*. На данном этапе есть предпосылки к тому, что именно этот ген контролирует одну из минорных систем репарации гетеродуплексов у дрожжей *S. cerevisiae*. Предполагается, что в ходе процесса репарации в сайте ОСО индуцируется двунитевой разрыв (ДНР) ДНК, который далее репарируется с помощью рекомбинации с сестринской хроматидой. При этом ОСО заменяется на нормальное, используя информацию неповрежденной цепи ДНК. В ходе данного процесса возможно появление

делеций генетического материала из-за ошибок репарации ДНР ДНК. В связи с этим, мы проверили спектр мутаций, возникающих при репарации искусственного гетеродуплекса в клетках дикого типа и мутантов *hsm2* и *pms1*.

Для этой цели была создана плазмидная конструкция, несущая гетеродуплекс в стартовом кодоне гена *ADE2*. Плазмиду трансформировали в штаммы, несущие мутацию в гене *PMS1*, контролирующему мажорную ветвь *KOCO*, *HSM2* и в клетки дикого типа. Ген *ADE2* отвечает за одну из стадий синтеза аденина, и мутация в нем приводит к окрашиванию колоний мутантов. Если гетеродуплекс репарируется в сторону нормального аллеля колонии приобретают белую окраску. В случае если коррекция прошла в сторону мутантного аллеля - колонии будут красными. Если коррекции не было, появляются секторные колонии.

На первом этапе отобранные трансформанты красного цвета скрещивали с партнером, несущим плазмиду с точечной мутацией в начале гена *ADE2*. Таким образом, по частоте межплазмидной рекомбинации можно было дать первоначальную оценку размера делеций. У мутанта *hsm2* доля трансформантов, у которых межплазмидная рекомбинация приводила к появлению дикого аллеля гена *ADE2*, была выше, чем у клеток дикого типа, в то время как в мутанте *pms1* этот показатель был значительно ниже. Это подтверждает предположение о том, что в результате действия минорной системы могут образовываться делеции. Для детальной проверки этого предположения мы планируем исследовать спектр мутаций у изучаемых штаммов с помощью метода ПЦР. Были синтезированы праймеры фланкирующие область гетеродуплекса и в данный момент ведется работа по характеристике мутантных аллелей.

### **Comparative study of some kinetic properties of intact and immobilized yeast invertase**

*Dehkonov D.B.*

*aspirant*

*National University of Uzbekistan named after M. Ulugbek, Tashkent, Uzbekistan*

The successes of industrial biotechnology show that yeast invertase is being used in broad spectrum in different branches of industry. For example fructose and invert syrup production for the confectionary and bakery aims strong requires yeast invertase. Besides these invertase can be applied in beverage industry for the fusel oils biotransformation in alcoholic drinks and formed product (alkylfructosides) may be used in medicine for the inhibition of E-immunoglobulin that causes allergic reactions.

It's known improving stability and increasing activity of industrial applicable enzymes are contemporary problem of industrial biotechnology. In order to temperature, stability, cumulation of glucose and influence enzyme concentration of native and covalently immobilized (into chemical modified activated pine carbon) invertase from *Saccharomyces cerevisiae* *Rkaciteli-6* strain were investigated in watery media.

Determination of temperature optimum of the intact enzyme carried out at 20-60°C intervals in 0,1 M acetate buffer (pH 4,0) and 0,5 M sucrose used as a substrate. According to results temperature optimum of the intact enzyme observed at 50°C. The temperature optimum of immobilized invertase investigated between 20-70°C under the same condition of intact enzyme except pH (6,0) and the optimal found at 30°C.

Stability of native and immobilized invertase performed by incubation of enzyme in 0,1 M acetate buffer (pH 4,0 and 6,0 respectively) during given time. Investigation of native enzyme showed that maximal activity observed after 15 min and enzyme lost 33% of global activity after 60 min. Exploration of the criteria with immobilized invertase conducted in the

range of 10-180 min. Immobilized enzyme exhibited its maximal activity after 30 min and invertase kept its stability during established time of investigation.

Dependence of glucose accumulation in reaction mixture on enzyme activity conducted 10-120 min intervals. The inhibition of free enzyme occurred after 30 min where glucose concentration was 500 mkg/ml. The maximal activity of immobilized invertase observed after 70 min where amount of glucose evaluated 450 mkg/ml and preparation lost 44% of its global activity after 80 min.

Influence of invertase quantity to enzyme activity for native invertase carried out 75-1250mkg/ml intervals in suitable condition. It was defined that optimal concentration of free enzyme in reaction mixture evaluated in 150 mkg/ml. The optimal for immobilized invertase studied from 8 to 108 mg preparation that is responsible for 80-640 mkg coupled invertase into selected sorbent. Optimal concentration of preparation employed 108 mg that is equivalent to 640 mkg bound enzyme.

The work shows that studied native and immobilized yeast invertase can be applied in scale up processes especially in beverage industry.

## ПОДСЕКЦИЯ «БИОИНФОРМАТИКА»

### Поиск повторов в геномах прокариот и эукариот

*Усанов Николай Николаевич*

*студент*

*Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия*

*E-mail: dgecko@mail.ru*

Геномы прокариот и эукариот содержит большое количество повторяющихся нуклеотидных последовательностей со 100% гомологией. Геномов, в которых отсутствовали бы идентичные участки текста, (с минимальной длиной 20-30 нуклеотидов), в природе практически нет. Поиск и систематизация повторов (repeating elements, RE) позволяет по-другому взглянуть на архитектуру геномов, переосмыслить ранее составленные геномные карты, и отчасти восстановить хронологию недавних молекулярных событий для данного организма.

С целью поиска и систематизации повторяющихся знаковых последовательностей, нами был разработан алгоритм обнаружения повторяющихся сигнатур любой длины и имеющих 100% гомологию. Алгоритм применим для обработки текстов и, в частности, последовательностей ДНК. На его основе создан пакет программ GeScanLab, делающий возможным обнаруживать идентичные фрагменты в массивах текста до 10-15 Мб (длина, испытанная на среднем персональном компьютере) при заданной чувствительности поиска. GeScanLab включает: оболочку, сканер, графический визуализатор, программу пакетного извлечения данных из файлов отчетности и статистики, программу совмещения координат повторов с геномными картами NCBI, ДНК рандомайзер и др. Отчетные файлы, содержат перечень повторов, их координаты, тип (условно прямой или условно реверсный, тандемный), статистические данные по нуклеотидному составу, элайнменты повторяющихся фрагментов в блоках, сами тексты повторов, перечни предполагаемых IS-элементов (транспозонов) и др. сведения. Для сканирования используются геномные директории из базы данных NCBI <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genbank/genomes>. GeScanLab может работать, как с файлами на локальном компьютере, так и через сеть, не требуя для расчетов существенных ресурсов. На персональном компьютере CPU Intel Xeon 3040, с тактовой частотой 2ГГц, сканирование генома, *Bacillus subtilis* str. 168 (4214630 пн) и генерация файла отчетности занимает всего 2-3 минуты.

С использованием пакета GeScanLab осуществлено сканирование ~400 имеющихся в открытом доступе геномов прокариот и хромосом микроскопических эукариот. Проведен частичный анализ полученной информации. Показано, что встречаемость повторов в геномах прокариот, имеет примерно такое же место, как и в хромосомах микроскопических эукариот (грибов, дрожжей).

В изученной выборке прокариотических геномов обнаружены ~30% штаммов несущих в среднем 1% повторов (сумма RE к длине генома), ~ 50% имеющих 3%, ~ 15% микроорганизмов обладающих 5% продублированной информации. Среди «рекордсменов» можно назвать штаммы бактерий: *Mycoplasma mycoides*, *Onion yellows phytoplasma*, *Aster yellows witches'-broom phytoplasma* – соответственно 26,31%, 24,85 и 17,42% RE. *Photorhabdus luminescens*, *Methanosarcina barkeri str. fusaro* chromosome 1, *Methanosarcina acetivorans* C2A обладают максимальным числом повторов: 4808, 4522 и 4306 соответственно. Максимальная длина повторяющихся фрагментов у *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Dehalococcoides ethenogenes* 64203, 63668 и 38009 нуклеотидов. Показано, что доля тандемных повторов, в геномах прокариот невелика. Обнаружены возможные кандидаты в транспозоны. Молекулярные механизмы образования повторов не ясны, но весьма вероятно, что эти события являются главной причиной дискретного характера эволюции, выраженного в феномене видимого отсутствия промежуточных форм.

**SDPlight – быстрый метод поиска позиций,  
определяющих специфичность в белковых выравниваниях**

Мазин Павел Владимирович<sup>1</sup>, Калинина Ольга Вячеславовна<sup>2</sup>

<sup>1</sup>студент, <sup>2</sup>аспирант

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: <sup>1</sup>[iaa.aka@gmail.com](mailto:iaa.aka@gmail.com), <sup>2</sup>[ok81@yandex.ru](mailto:ok81@yandex.ru)

Поиск методов для предсказания функции и специфичности белка по аминокислотной последовательности или по выравниванию семейства последовательностей становится в последние годы все более актуальной задачей. Часть из таких методов опирается на анализ активного центра белка. В соответствии с современными представлениями активный центр белка составляют остатки двух типов. Одни отвечают за общую функцию белка и консервативны для всего семейства, другие - за специфическое распознавание взаимодействующей молекулы (Specificity Determining Position - SDP) и консервативны для белков с данной специфичностью. Для поиска детерминант специфичности обычно проводится анализ выравнивания исследуемого семейства белков. При этом разбиение на группы белков с одинаковой специфичностью достигается либо автоматически, либо задается вручную пользователем. Во всех случаях ищутся позиции, в которых распределение аминокислот коррелирует с разбиением по группам.

Ранее нашей группой был разработан и реализован метод SDPpred для предсказания детерминант специфичности, использующий взаимную информацию и ручное разбиение по специфичностям (Kalinina et. al, 2004). Этот метод был применен к большому количеству семейств с различной биохимической функцией. Полученные результаты согласуются с экспериментальными и структурными данными, однако для получения устойчивых результатов требуется продолжительное время (для анализа выравнивания длиной 300 а.о. требуется примерно 4 мин).

Нередко разбиение по группам представляется неоднозначным и требуется перебор большого числа возможных разбиений. В настоящей работе мы предлагаем новый метод, SDPlight, позволяющий предсказывать детерминанты специфичности в

2000 раз быстрее, чем SDPpred. Этот метод повторяет SDPpred за исключением самого затратного по времени этапа случайного перемешивания каждой колонки выравнивания. Вместо этого мы ввели ряд приближений при вычислениях, которые делают метод SDPlight менее точным, однако способным проанализировать выравнивание длиной 300 а.о. за 0.1 сек. Мы протестировали SDPlight на модельных последовательностях, а также на семействах мембранных транспортеров MIP и бактериальных факторов транскрипции LacI, и показали, что результаты SDPlight не отличаются существенно от результатов SDPpred и также хорошо согласуются со структурными и экспериментальными данными.

Новый метод будет использоваться для быстрого предварительного предсказания детерминант специфичности при ручном разбиении на группы, для автоматической корректировки детерминант специфичности при добавлении в семейство новых белков, для автоматического разбиения на группы семейства, в котором специфичность известна лишь для небольшого числа последовательностей.

Авторы выражают благодарность А.Б. Рахманиновой и А.А. Миронову за ценное обсуждение.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 07-04-91555-ННИО\_a).

#### Литература

1. Kalinina O.V, Mironov A.A., Gelfand M.S., Rakhmaninova A.B. (2004) Automated selection of positions determining functional specificity of proteins by comparative analysis of orthologous groups in protein families. *Protein Science*, **13**: 443-456.

#### Модульный алгоритм для построения парного 3D выравнивания белковых структур

Глотова Ирина Вячеславовна<sup>10</sup>  
студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: igbox@mail.ru

Пространственное (3D) выравнивание активно используется в таких областях, как структурная классификация и функциональная аннотация белков. Учитывая широкий круг применения структурного выравнивания, несложно понять, насколько важным для анализа является качество данного выравнивания. Поэтому поиск способов создания более эффективного алгоритма 3D выравнивания белковых структур является актуальной проблемой.

Нами была разработана общая схема модульного алгоритма парного 3D выравнивания белковых структур. Данный алгоритм является комбинацией четырех модулей, каждый из которых решает отдельную задачу (определение начального выравнивания, нахождение ядра выравнивания, оптимизация параметров движения, предсказание гомологичности белков на основе построенного выравнивания). Преимущество модульности алгоритма заключается в том, что она обеспечивает возможность независимого изменения каждого из модулей и позволяет найти оптимальное сочетание методов, которое может привести к более качественному решению задачи пространственного выравнивания. В настоящей версии алгоритма используются сравнение деревьев элементов вторичной структуры белков, методы суперпозиции остовов белковых цепей в пространстве и динамического программирования.

---

<sup>10</sup> Автор выражает признательность к.м.н. Галатенко В.В. за помощь в подготовке тезисов.

Программа, реализующая разработанный модульный алгоритм, была протестирована на контрольном наборе структур, процент идентичности которых не превышает 25% [1]. Тестирование текущей версии программы показало, что качество предсказания гомологичности у разработанного модульного алгоритма несколько ниже, чем у известной программы структурного выравнивания DaliLite [2], но по геометрическим характеристикам (SI, MI [3]) выравнивания, получаемые нашей программой, лучше по сравнению с соответствующими выравниваниями DaliLite. Оценка соотношения RMSD, значение которого определяет качество наложения пары структур в пространстве, и размера ядра выравнивания показала, что в большинстве случаев выравнивания, построенные нашей программой, отличаются меньшим размером ядра и меньшим значением RMSD по сравнению с выравниваниями DaliLite.

В дальнейшем для улучшения качества построения 3D выравнивания предполагается совершенствование каждого из модулей алгоритма. В частности, планируется использование нескольких начальных приближений, нахождение ядра выравнивания на основе локальных выравниваний, а также использование комбинированных биолого-геометрических мер для предсказания гомологичности белковых структур.

### Литература

1. Liisa Holm and Chris Sander (1997) Decision support system for the evolutionary classification of protein structures. American Association for Artificial Intelligence.
2. Liisa Holm and Jong Park (2000) DaliLite workbench for protein structure comparison. *Bioinformatics* 16, 566-567.
3. Rachel Kolodny, Patrice Koehl and Michael Levitt (2005) Comprehensive Evaluation of Protein Structure Alignment Methods: Scoring by Geometric Measures. *J. Mol. Biol.*, 346, 1173-1188.

### СpG-острова в геномах высших эукариот

*Перцовская Инна Михайловна*

*Студентка*

*Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

*e-mail: [inna.perts@gmail.com](mailto:inna.perts@gmail.com)*

Метилирование ДНК является важным элементом контроля экспрессии генов в клетках млекопитающих. Главное основание ДНК, подвергаемое энзиматическому метилированию, - **цитозин**. Основной мишенью метилирования в цепях ДНК служит последовательность **СpG**. Протяженные участки генома, обогащенные парами CG нуклеотидов называются CpG-островами. Нередко считается, что когда CpG-острова находятся в неметилированном состоянии, то соответствующие им гены активны, а когда они метилируются – транскрипция прекращается. Таким образом, CpG-острова участвуют в регуляции транскрипции, в том числе тканеспецифической.

Нами были получены ортологичные ряды CpG-островов и проанализирован их состав. Созданная база данных координат ортологичных CpG-островов, их последовательностей и выравниваний, сделанных с помощью программ BLAST и BLAT, позволила нам синтезировать данные из разных источников. Благодаря базе данные удалось обнаружить новые свойства CpG-островов, интересные особенности в эволюционной изменчивости CpG-островов из разных участков генома (острова, находящиеся перед геном, пересекающиеся с 3' или 5' UTR и др.) у млекопитающих. В

частности были найдены абсолютно идентичные по последовательности острова в разных хромосомах человека.

Другим аспектом исследования была проверка гипотезы о регуляции метилирования CpG-островов с помощью микроРНК у человека. Был проанализирован нуклеотидный состав последовательностей микроРНК. Полученные результаты свидетельствуют о сдвиге в нуклеотидном составе в сторону большего количества сg динуклеотидов по сравнению с геномной ДНК. Процент CG пар в последовательностях микроРНК приближается к таковому в CpG-островах. С помощью биоинформатических методов проведен поиск ДНК-мишеней связывания сg-богатых микроРНК. Было найдено в несколько раз больше мишеней этих микроРНК в CpG-островах из генома человека, чем в случайных последовательностях генома. Проводится проверка полученных результатов на сгенерированной последовательности с таким же % C+G как и в CpG-островах.

В настоящее время нами изучается вопрос эволюционного накопления или «вымывания» сg динуклеотидов в CpG-островах и внеостровных участках у грызунов. Результаты должны подтвердить или опровергнуть гипотезу об эволюционном избегании сg динуклеотидов в связи с метилированием и, как следствие, большой вероятности мутации C→T.

#### Литература

- 1) Gardiner-Garden M, Frommer M CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol.* Jul 20;196(2):261-82 (1987).
- 2) Francisco Antequera, Adrian Bird Number of CpG islands and genes in human and mouse *Genetics* Vol. 90, pp. 11995-11999 (1993)
- 3) Futscher B.W., Oshiro M.M., Wozniak R.J., Holtan N., Hanigan C.L., Duan H., Domann F.E. Role for DNA methylation in the control of cell type-specific maspin expression. *Nature genetics*, 2002, volume 31, pp.175-179.
- 4) Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *GENES & DEVELOPMENT*, 2002, v. 16. pp.6–21.
- 5) Hiroaki K., Kazunari T. Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells, *NATURE*, 2004, V.431 pp. 211-217
- 6) V. Narry Kim Small RNAs: Classification, Biogenesis, and Function, *Mol. Cells*, Vol. 19, No. 1, pp. 1-15

#### **ProPHYLeR: программа построения филогенетических профилей белков эукариот**

***Ивлиев Александр Евгеньевич***

*студент 4 курса*

*Факультет биоинженерии и биоинформатики*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

*E-mail: [ivliev-alexa@yandex.ru](mailto:ivliev-alexa@yandex.ru)*

Молекулярные механизмы тканевых и клеточных физиологических процессов у человека и животных, таких, как иммунный ответ, воспаление, апоптоз, пролиферация и другие, а также процессов, связанных с развитием заболеваний, основаны на многокомпонентных системах взаимодействующих белков (ферментов, структурных и транспортных белков, рецепторов, факторов транскрипции и т.д.) Анализ взаимосвязи белков в таких системах – важная задача современных исследований [1]. Нами

предложен подход к исследованию таких систем через изучение процесса их формирования в ходе эволюции и сопоставление комбинаций белков-компонентов в различных организмах путем построения их филогенетических профилей.

Использование существующих биоинформатических ресурсов (таких, как KOG [2], HomoloGene [3], KEGG [4] и другие) затруднено различными факторами: резко ограниченным набором доступных протеомов, отсутствием подробного описания методики получения результатов, невозможностью использовать последние данные секвенирования эукариотических геномов и их аннотации.

В данной работе был создан программный инструмент ProPHYLeR (язык программирования Perl), позволяющий независимо от темпов развития указанных баз данных изучать эволюцию клеточных систем на произвольной выборке протеомов. Эта программа осуществляет поиск ортологов выбранных белков исследуемого организма в протеомах других эукариот (при этом учитываются возможные дубликации генов в отдельных эволюционных линиях - возникновение паралогов), а также создает множественное выравнивание найденных гомологов путем обращения к программе MUSCLE [5]. Последнее позволяет строить филогенетический профиль семейства и при помощи стандартного инструментария биоинформатики изучать эволюцию соответствующего семейства или его части.

Спецификой алгоритма является использование модифицированной стратегии «best-best hit» [6] поиска ортологов, более чувствительной, чем традиционная: поиск ведется не отдельно для каждого белка стартового протеома, а начинается с выборки родственных белков и ортологами считаются белки других протеомов, для которых лучший «хит» при обратном поиске – любой белок из стартовой выборки. Разрешение отношений родства найденных ортологов с конкретными белками стартовой выборки осуществляется пользователем вручную, основываясь на филогенетическом дереве.

Результаты применения инструмента для анализа сигнальной системы эйкозаноидов (75 белков, принадлежащих более, чем 15 семействам) показывают его применимость для изучения эволюции комплексных молекулярных систем.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты 04-04-49357, 07-04-01160).

### Литература

1. Eungdamrong NJ et al. Biol Cell. 2004; 96(5):355-62.
2. Tatusov RL et al. BMC Bioinformatics. 2003; 4:41.
3. Kanehisa M et al. Nucleic Acids Res. 2002; 30(1):42-6.
4. Wheeler DL et al. Nucleic Acids Res. 2007; 35(Database issue):D5-12.
5. Edgar RC. Nucleic Acids Res. 2004; 32(5):1792-7.
6. Koonin EV. Annu Rev Genet. 2005; 39:309-38.

### Позиционно-специфические корреляции между последовательностями ДНК-связывающих доменов LacI-семейства и их операторов.

*Коростелев Юрий Дмитриевич*

*Студент 3 курса*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет  
биоинженерии и биоинформатики Москва, Россия*

Механизмы специфического ДНК-белкового узнавания - до сих пор нерешенная загадка молекулярной биологии несмотря на интенсивные исследования в этом направлении и выявление ряда закономерностей[1-3]. В нашей группе собрана уникальная БД транскрипционных регуляторов LacI-семейства и их операторов, причем как экспериментально подтвержденных, так и предсказанных методами сравнительной геномики (О.Лайкова, неопубл.). На основе этой коллекции были построены

выравнивание 949 ДНК-связывающих доменов 102-х ортологических рядов (71 а.о) и выравнивание 2934 соответствующих операторов, а затем исследованы корреляции между позициями этих выравниваний. Мерой скоррелированности  $i$ -ой колонки белкового и  $j$ -ой колонки нуклеотидного выравниваний была выбрана величина полной

взаимной информации,  $I(i, j) = \sum_{n=1}^4 \sum_{a=1}^{20} p_{i,j}(a, n) \frac{\log p_{i,j}(a, n)}{p_i(a) p_j(n)}$  где  $a, n$  – тип

аминокислотного или нуклеотидного остатка соответственно,  $p_{i,j}(a, n)$  – частота события: а.о.  $a$  в  $i$ -ой позиции регулятора и нуклеотид  $n$  в  $j$ -ой позиции соответствующего оператора,  $p_x(y)$  – частота  $y$  в позиции  $x$  соответствующего выравнивания. Написана программа, вычисляющая  $I(i, j)$  для всех пар со взвешиванием последовательностей по алгоритму Герштейна-Сонхаммера-Чотьи[4]. Статистическая значимость полученных  $I(i, j)$  оценивалась по ранее опубликованному алгоритму [2].

Значимо скоррелированными оказались всего 2% пар. В этом списке - колонки  $j=1,3-5$  (нумерация от центра оператора) и колонки  $i = 3,13-15,19,27,60$  выравнивания ДНК-связывающих доменов, при этом позиции 13-15 и 19 находятся в «распознающей» спирали НТН-домена. Пусть  $[i-j]$  – скоррелированная пара  $i$ -ой колонки белкового и  $j$ -ой колонки нуклеотидного выравниваний. В списке «лучших» 15-ти пар – пары  $[15-3]$ ,  $[15-4]$ . Эти пары в 3D-структуре PurR\_Ecoli соответствуют Thr16, Cyt703 и Ade704, способным образовывать специфические водородные связи. Вторая по значимости пара  $[19-4]$  в 2/3 случаев представлена парой Arg-Gua, также способных к специфическим контактам (в PurR\_Ecoli Arg20 заменен на His20, образующий Н-связи с Gua702 через молекулу H<sub>2</sub>O). Остатки 19 и 15 расположены рядом, на одной стороне «распознающей» спирали, что согласуется с правилами Судзуки[3]. Аминокислотные остатки в позициях  $i = 3,13,14,60$  также вовлечены в плотные контакты с азотистыми основаниями. Таким образом, статистический анализ последовательностей, не использующий информацию о 3D-структуре, позволил выявить наиболее плотно контактирующие а.о и основания.

Работа частично поддержана грантом 07-04-91555-РФФИ-а

### Литература

- 1) Nicolas M. Luscombe, Roman A. Laskowski and Janet M. Thornton Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. *Nucleic Acids Research*, 2001 Vol. 29, No 13 (2860-2874).
- 2) Masashi Suzuki, Steven E. Brenner, Mark Gerstein and Naoto Yagi. DNA recognition code of transcription factors. *Protein Engineering vol.8 no.4 pp.319-328, 1995.*
- 3) Olga V. Kalinina, Andrey A. Mironov, Mikhail S. Gelfand and Aleksandra B. Rakhmaninova. Automated selection of positions determining functional specificity of proteins by comparative analysis of orthologous groups in protein families. *Protein Sci 13(2): 443-56*
- 4) Gerstein M Sonnhammer EL Chothia C. Volume changes in protein evolution *J Mol Biol 1994 Mar 4;236(4):1067-78.*

## Реконструкция эволюции теломерного белка RAD50

*Лёушкин Евгений Владимирович*

студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет  
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: [leushkin@rambler.ru](mailto:leushkin@rambler.ru)

### Введение

RAD50 относится к серии белков radiation mutant, получивших своё название за повышенную чувствительность к радиационному излучению мутантов с нулевым

фенотипом. Крупный белок (800-1300 аминокислотных остатков) с уникальной структурой. WalkerA и WalkerB мотивы располагаются в N- и C- ДНК-связывающих концах соответственно и разделены протяжённым суперспирализованным участком (coiled coil). Но они сближаются в результате складывания белка пополам, образуя АТФ-связывающих карман (ABC). В месте сгиба – Zn-hinge домен, за счёт которого белок димеризуется. Активен только в комплексе с нуклеазой MRE11. Комплекс участвует в гомологичной рекомбинации, негомологичном связывании концов, деградации шпилек, что используется в репарации ДНК, а у эукариот также в мейозе, V(D)J-рекомбинации и поддержании теломер. Основной задачей сейчас является выяснение взаимодействий с checkpoint системами, так как комплекс RAD50/MRE11 предположительно является одним из основных детекторов повреждения ДНК. В данной работе произведён филогенетический анализ семейства RAD50, что поможет объяснить особенности белка, а также выбрать для исследования более просто устроенные организмы и искать сходные признаки, например, у человеческого ортолога.

### Результаты

Гомологи RAD50 обнаружены во всех царствах живых организмов. Доменная структура для всех белков семейства одинакова. По концевым доменам выявлено сходство с SMC-белками и ABC-транспортёрами, при расширенном поиске (Psi-Blast) - миозинами, MukB, некоторыми белки клеточных контактов. По Zn-hinge домену сходства с перечисленными белками не обнаружено, но зато CXXC мотивы есть у цинковых пальцев, которые также связываются с ДНК. У RAD50 некоторых микроспоридий и протеобактерий отсутствует CXXC, то есть принцип димеризации иной (какой неизвестно). На основе анализа семейства RAD50 и сравнения с близкими семействами была выдвинута гипотеза возникновения белка, состоящего из следующих этапов: 1) предшественник ABC-суперсемейства - мембранный белок с насосной функцией (д-ва: спираль могла образоваться только внутри мембраны, которой была плазмалемма; большое количество разных ABC-транспортёров, тогда как SMC и RAD50 уникальные белки у прокариот); 2) предшественник SMC и RAD50 стал цитоплазматическим белком и приобрёл способность связываться с ДНК (SMC и RAD50 ближе друг к другу, чем к ABC-транспортёрам); 3) гены будущих rad50 и mre11 объединились (они и сейчас перекрываются у всех организмов); 4) приобретение Zn-hinge домена (могло произойти независимо, так как CXXC - очень маленький мотив, или при переносе от гена цинкового пальца). Концевые домены внесли разные вклады в дальнейшую эволюцию: в дереве, построенному по C-концевому домену, расстояния между узлами намного больше, чем по Бактериальные гомологи отличаются от эукариотических белков сильнее архебактериальных или вирусных и называются SBCC. Архебактериальные гомологи меньше остальных (до 1000 а.о.), в целом, равноудалены от эукариот. С эукариотами связано появление новых функций RAD50 и увеличение последовательности за счёт вставок. Наибольшие отклонения встречаются среди простейших (особенно паразитических). Белки морского ежа и гриба *Giberella zeae* имеют на конце добавочные участки (около 1000 а.о.) с неясной функцией. RAD50 из *Caenorhabditis elegans* выпадает из эукариотической ветви: из эукариот он остался ближе всех к архебактериям, то есть белок эволюционировал очень медленно.

### Связь аминокислотного состава с термостабильностью белков

*Андреева Людмила Юрьевна*

*10 класс, Лицей №1553 «Лицей на Донской», Москва, Россия*

*Ивлиев Александр Евгеньевич*

*студент 4 курса*

*Факультет биоинженерии и биоинформатики*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Гипертермофильные прокариоты – представители архей и бактерий – имеют температурный оптимум роста в интервале 80 – 110°C, что существенно превышает значения, предельно допустимые для большинства других известных видов (мезофилов). Белки гипертермофилов проявляют устойчивость к действию высоких температур, вызывающих денатурацию белков мезофилов, и имеют в настоящее время большое технологическое значение [1, 2]. Цель работы – определить, как связан аминокислотный состав белков различных функциональных групп с их термостабильностью и как соотносятся различия в аминокислотном составе, связанные с приспособленностью организмов к определенному диапазону температур, с различиями, обусловленными их таксономической принадлежностью к бактериям или археям.

Сравнивали гипертермофилов *Thermotoga maritima*, *Aquifex aeolicus* (бактерии), *Rugosoccus horikoshii*, *Archaeoglobus fulgidus* (археи) с мезофилами *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* (бактерии), *Halobacterium* sp NRC-1 и *Methanosarcina acetivorans* (археи): экологические группы имеют одинаковый таксономический состав. Сравнение аминокислотного состава белков проводилось в кластерах ортологичных групп (база данных COG [3]) с целью наблюдать связь механизма обеспечения термостабильности белков с их функцией. Рассмотрено 566 кластеров – все доступные кластеры, удовлетворяющие критерию: как термофильные, так и мезофильные белки представлены как бактериями, так и археями.

Показано обогащение термофильных белков остатками лизина, глутаминовой кислоты, изолейцина и тирозина. Наблюдается пониженное по сравнению с мезофильными ортологами содержание в них треонина, глутамина, аспарагиновой кислоты, гистидина и аланина. Разница между частотами встречаемости в термофилах и мезофилах для каждого из указанных остатков составляет 1 – 2,5 % в среднем по всем кластерам ортологичных групп (знаки разностей воспроизводятся приблизительно в 90% рассмотренных кластеров). Это составляет от 20 до 50 % от средней частоты встречаемости указанных остатков в исследуемых прокариотах и существенно превышает различия, обусловленные их происхождением из бактерий или архей. Гистограммы распределения белков по частоте встречаемости остатков, построенные обобщенно по всем кластерам, демонстрируют сдвиг распределений термофилов и мезофилов друг относительно друга вдоль оси частоты. Результат двухмерной кластеризации матрицы частот «20 аминокислотных остатков – 566 кластеров ортологичных групп» демонстрирует выражающееся на уровне аминокислотного состава сходство механизмов приспособления белков всех функций к работе в условиях высоких температур.

### Литература

1. Sterner R et al. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2001; 36(1):39-106.
2. Vieille C et al. Microbiol Mol Biol Rev. 2001; 65(1):1-43.
3. Tatusov RL et al. Nucleic Acids Res. 2000; 28(1):33-6.

### Библиометрия биоинформатики

*Любецкая Анна Васильевна<sup>1</sup>*

*студент*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Факультет  
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия*

*E-mail: [lyubetsky.anna@mail.ru](mailto:lyubetsky.anna@mail.ru)*

К настоящему времени уже опубликовано много статей по биоинформатике, поэтому стало возможным рассматривать закономерности в развитии различных направлений этой науки и пытаться выделить наиболее перспективные среди них.

Для проведения нашего исследования составлена база биоинформатических статей, опубликованных до 1 января 2007 года, на основе информации, размещенной в базе данных PubMed. Для отбора статей использовались следующие критерии.

Биоинформатическим считается журнал, который содержит в своем названии слово «биоинформатика». В качестве биоинформатика рассматривается автор, который хотя бы один раз публиковался в биоинформатическом журнале. Статья относится к числу биоинформатических, если она опубликована в биоинформатическом журнале или имеет не менее двух авторов-биоинформатиков; и имеет хотя бы один биоинформатический MeSH-термин, характеризующий содержание статьи, в ее ASN.1 описании.

Формирование биоинформатической базы данных и ее статистический анализ выполнялись средствами языков программирования Perl и Java.

Изучались следующие характеристики статей: авторы статьи, дата публикации, журнал, в котором опубликована статья, и MeSH-термины. Анализ проводился сначала по каждой характеристике в отдельности и затем по их сочетаниям.

В результате получены распределения, показывающие наиболее распространенное количество статей у авторов, количество авторов в статьях, соотношение количества авторов-биоинформатиков ко всем авторам статьи. Выявлены закономерности для кластеров соавторства, в частности, для всех пар соавторов из нашей базы данных статей. Например, примерно 10% публикаций написано коллективами из 5 человек, среди которых только два автора-биоинформатика.

Вычислялись частоты встречаемости MeSH-терминов в разные годы, и выбор авторами темы статьи в зависимости от даты публикации. Например, термины: «информация о молекулярной последовательности», «аминокислотная последовательность» и «последовательность оснований» - хотя и занимают первые места по числу упоминаний в 2006 году, но их доля в публикациях существенно снизилась за последние годы. В то же время доля таких терминов, как «геномика», «протеомика» и «однонуклеотидная замена», появившихся лишь несколько лет назад, стремительно растет. На основании полученных статистических данных предложен некоторый прогноз возможного развития ряда тем в биоинформатике.

### Литература

1. Aerni, S.J, Eskin, E. (2006) 10 Years of the International Conference on Research on Computational Molecular Biology (RECOMB) // RECOMB 2006, LNBI 3909, pp.546-562.
2. Douglas, S.M., Montelione G.T., Gerstein M. (2005). PubNet: a flexible system for visualizing literature derived networks // Genome Biology, 6(9):R80.
3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed> (база данных PubMed)

<sup>1</sup> Работа сделана совместно с Гельфандом М.С.

**Выявление белков, содержащих фрагменты, сходные с аминокислотной последовательностью глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы<sup>11</sup>****Куравский Михаил Львович<sup>12</sup>***студент**Факультет биоинженерии и биоинформатики,**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия**E-mail: m\_kuravskiy@yahoo.com*

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД, КФ 1.2.1.12) является ферментом гликолиза. В организме млекопитающих ГАФД представлена двумя изоферментами: соматическим и сперматозоидным (ГАФД-с). ГАФД-с связана с фиброзным слоем жгутика и экспрессируется только в сперматидях. Показано, что помимо гликолиза соматическая ГАФД участвует во многих других процессах, таких как эндоцитоз, слияние мембран, репликация и репарация ДНК, индукция апоптоза. Идентифицирован участок ГАФД, определяющий ее внутриклеточную локализацию, – так называемый сигнал ядерного экспорта (NES). NES ГАФД человека представляет собой полипептид, состоящий из 13 аминокислотных остатков. Показано, что полученные в нашей лаборатории моноклональные антитела клона 6С5 к денатурированным и мономерным формам ГАФД взаимодействуют именно с NES, что позволяет идентифицировать его присутствие в любых белках.

Наличие в одном и том же организме свободно перемещающейся в клетке формы фермента и формы, прочно закрепленной на двигательной структуре, дает уникальную возможность сравнительного анализа значимости отдельных мотивов в составе последовательности ГАФД для осуществления той или иной функции. Сравнение мотивов, входящих в состав последовательностей соматической и сперматозоидной ГАФД, позволяет выявить те функции, которые характерны только для свободно перемещающегося между компартментами клетки соматического фермента, а также специфические функции ГАФД-с. С помощью программы Minimotif Miner проведен поиск коротких мотивов в составе соматической и сперматозоидной ГАФД, которые могут принимать участие в таких процессах, как эндоцитоз, индукция апоптоза и репарация ДНК, а также выявлены особенности участков фосфорилирования различными протеинкиназами у двух ферментов. Эти наблюдения могут служить основой для дальнейшего поиска новых способов регуляции двух изоферментов.

С использованием профилей НММ проведен поиск белков, содержащих участки, сходные с последовательностью сигнала ядерного экспорта соматической ГАФД в прямом и обратном прочтении его последовательности. Выявлено пять белков человека, содержащих консервативные участки, сходные с сигналом ядерного экспорта ГАФД: Ecm29, флотиллин-2, белки семейства PAX, ДНК-полимераза  $\beta$  и один из белков, ассоциированных с мяРНК U5. Роль обнаруженных участков может заключаться в регуляции циркуляции белков между ядром и цитоплазмой, а также во взаимодействии с белками эндоцитоза или клеточной адгезии. Возможно, выявленные белки могут взаимодействовать с антителами 6С5 против соматической ГАФД, влияя тем самым на интерпретацию данных иммунофлуоресцентного окрашивания разных типов клеток. Это предположение будет проверено экспериментально.

**Литература.**

---

<sup>11</sup> Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта РФФИ № 06-04-48240.

<sup>12</sup> Автор выражает признательность профессору, д.б.н. Муронцу В.И. за помощь в подготовке тезисов.

1. Brown, V. M., Krynetski, E. Y., Krynetskaia, N. F., Grieger, D., Mukatira, S. T., Murti, K. G., Slaughter, C. A., Park, H. W. and Evans, W. E. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279(7)**, 5984-5992.
2. Grigorieva, J. A., Dainiak, M. B., Katrukha, A. G. and Muronetz, V. I. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.*, **369(2)**, 252-260.

### **Позиции, определяющие функциональную специфичность в белках бактериальных двухкомпонентных систем**

**Моросанова Мария Александровна**

*студент*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

*E-mail: mawula@gmail.com*

С помощью двухкомпонентных систем бактерии чувствуют изменения окружающей среды (концентрации различных веществ, давление и т. д.) и соответствующим образом реагируют на них экспрессией определенных генов. Двухкомпонентная система состоит из двух белков – сенсора и регулятора ответа. Сенсор – трансмембранный белок, который связывается с лигандом, находящимся во внеклеточной среде, и затем активируется путем фосфорилирования. Активный сенсор связывается с регулятором ответа и происходит перенос фосфатной группы с сенсора на регулятор ответа, что приводит к активизации регулятора ответа. Он, в свою очередь, связывается с ДНК и регулирует экспрессию соответствующих генов. Таким образом, можно предположить, что сенсорный белок связывается именно со "своим" регулятором ответа.

Целью данной работы было предсказание в аминокислотных последовательностях сенсоров и регуляторов ответа позиций, определяющих их функциональную специфичность (СДП позиции[1]). Рассмотрены двухкомпонентные системы, описанные в БД KEGG[3]. Выбрано 15 семейств (групп специфичности) сенсоров, имеющих одинаковую доменную структуру НАМР-HisKA-НАТРase и 15 семейств соответствующих регуляторов ответа. Для этого были построены 2 множественных выравнивания: для сенсоров и регуляторов ответа соответственно. Регуляторы ответа хорошо выравниваются по всей длине, в то время как N-концевые участки сенсоров (непосредственно связывающие лиганд) практически не выравниваются. Поэтому были выравнены только участки сенсоров, начиная с домена НАМР. Затем с помощью программы SDPpred ([www.monkey.belozersky.msu.ru/~psn](http://www.monkey.belozersky.msu.ru/~psn)) эти выравнивания были проанализированы и для них были определены позиции СДП – консервативные внутри семейства и неконсервативные между семействами. Так было предсказано 39 СДП для сенсоров и 27 – для регуляторов ответа. Предсказанные СДП были соотнесены с известными 3D-структурами сенсоров и регуляторов. При маркировке СДП на 3D-структуру PDB:1NJV сенсорного белка ENVZ\_ECOLI оказалось, что СДП находятся в основном на той же спирали, что консервативный остаток гистидина, который фосфорилируется и передает фосфатную группу регулятору ответа. Возможно, что аминокислотные остатки в предсказанных СДП определяют специфичность взаимодействия сенсор – регулятор ответа. Полученные результаты могут быть использованы для предсказания механизма взаимодействия сенсора и регулятора ответа, что будет интересным в условиях отсутствия трехмерной структуры комплекса.

*Работа частично поддержана грантом 07-04-91555-РФФИ\_a*

#### **Литература**

1. Kalinina OV, Mironov AA, Gelfand MS, Rakhmaninova AB. (2004) Automated selection of positions determining functional specificity of proteins by comparative analysis of orthologous groups in protein families. *Protein Sci* 13(2): 443-56.

2. Hoch J.A., Silhavy T.J. (1995) Two-Component Signal Transduction

3. KEGG (www.kegg.com)

### **Исследование RbsR- и PurR-регулонов методами сравнительной геномики.**

Цой Ольга Владиславовна<sup>13</sup>

студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: olgatsoj@list.ru

Пуриновый регулон включает гены, транскрипция которых регулируется пуриновым репрессором PurR. Данный регулон ранее экспериментально изучен в *Escherichia coli* (Neidhardt, 1996), а также исследован с помощью методов сравнительной геномики в геномах еще пяти родственных организмов (Mironov et al., 1999; Равчев и соавт., 2002). Данный регулон включает гены, биосинтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, метаболизма одноуглеродных фрагментов, азотного обмена и трансмембранных белков (Neidhardt, 1996).

Репрессором рибозного регулона RbsR представляет собой близкого гомолога белка PurR, что указывает на относительно недавнее их расхождение. Для геномов бактерий порядка Pseudomonadales показано, что сайт связывания RbsR в большей степени соответствует консенсусу сайта связывания PurR, в то время как сайт связывания PurR в этих организмах отсутствует (Laikova et al., 2001). Таким образом, представляет интерес изучение структуры рибозного и пуринового регулонов в ранее не рассматривавшихся организмах с целью детального описания их эволюции после дупликации.

Для решения поставленной задачи использовались методы сравнительной геномики (Mironov et al., 1999). В дополнение к ранее охарактеризованным организмам, структура PurR-регулона была исследована в геномах представителей трех порядков гамма-протеобактерий (Enterobacteriales, Vibrionales, Pasteurellales), а RbsR-регулона – в четырех порядках (Enterobacteriales, Vibrionales, Pasteurellales, Pseudomonadales).

В ходе работы были получены следующие результаты:

1. Показано, что белок из Pseudomonadales представляет собой предковую форму регулятора, сохранившуюся с момента, предшествовавшего дупликации.
2. Продемонстрирована консервативность сайтов связывания RbsR в пределах порядков Enterobacteriales, Vibrionales и Pasteurellales.
3. Показано, что структура PurR-сайта остается консервативной в Enterobacteriales и Vibrionales, тогда как у Pasteurellales подтверждена тенденция к замене в двух симметричных позициях.
4. Найденны новые члены пуринового регулона, участвующие в реакциях альтернативных путей метаболизма пуриновых нуклеотидов.

#### **Литература**

1. Laikova O. N., Mironov A. A., Gelfand, M.S. (2001) Computational analysis of the transcriptional regulation of pentose utilization systems in the gamma subdivision of Proteobacteria. FEMS Microbiol. Lett., 10239, 1-8.
2. Mironov, A.A., Koonin, E.V., Roytberg, M.A., Gelfand, M.S. (1999) Computer analysis of transcription regulatory patterns in completely sequenced bacterial genomes. Nucleic Acids Res., 27, 2981-2989.
3. Neidhardt F. C. (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. Washington D.C.: ASM Press.

---

<sup>13</sup> Автор выражает признательность научному руководителю, Равчеву Дмитрию Андреевичу, м.н.с. ИППИ РАН, за помощь в подготовке тезисов.

4. Равчеев Д.А., Гельфанд М.С., Миронов А.А., Рахманинова А.Б. (2002) Пуриновый регулон гамма-протеобактерий. Детальное описание. Генетика, т.38, с. 1203-1214.

### Новая оценка гомологичности пространственных структур белков на основании 3D-выравниваний

Диброва Дарья Владимировна  
студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: udavdasha@gmail.ru

Трехмерные выравнивания структур белков позволяют довольно точно предсказать важные для поддержания структуры участки последовательности и активные центры в выделенном белке с расшифрованной пространственной структурой. Задача предсказания может быть разбита на два этапа:

- 1) Построение выравнивания;
- 2) Принятие решения о том, можно ли переносить информацию о тех или иных свойствах одного белка на другой на основании построенного выравнивания.

Основной целью работы было разработать качественную оценку гомологичности выровненных структур.

В настоящей работе использовался набор 3D-выравниваний структур с низким процентом идентичности последовательностей [1]. Выравнивания были построены одной из самых популярных программ DALI [2]. Набор был составлен разработчиками программы DALI для проверки оценки гомологичности структур двух белков, который заложен в их программу. С той же целью – целью проверки предсказательной силы оценки – этот набор был использован и в этой работе.

Предлагаемая оценка гомологичности основана не только на геометрическом описании выравнивания. В большей степени она использует биологическую информацию о том, какие аминокислотные остатки оказались выровнены друг с другом.

Оценка гомологичности (Z-score), предложенная авторами алгоритма DALI, считается одной из самых качественных [3]. Однако разработанная оценка превосходит ее по предсказательной способности – на наборе из 816 выравниваний число ошибок Z-score составляет 172, а наша оценка дает 130 ошибок.

В настоящей работе анализировалось количество ошибок при использовании новой меры на выделяемых различными способами («жадным» алгоритмом, динамическим программированием и в ходе построения выравнивания программой DALI) ядрах выравниваний.

Разработанная мера сопровождается программой, которая может посчитать ее для заданного выравнивания и сделать предсказание о гомологичности выровненных структур.

#### Ссылки:

- [1] Liisa Holm, Chris Sander: Decision support system for the evolutionary classification of protein structures. *EMBL-EBI*
- [2] Liisa Holm, Chris Sander: Protein Structure Comparison by Alignment of Distance Matrices. *Mol. Biol.*, 1993, 233, 123-138
- [3] Kolodny R., Koehl P., Levitt M.: Comprehensive Evaluation of Protein Structure Alignment Methods: Scoring by Geometrical Measures. *J.Mol.Biol.*(2005) 346, 1173-1188

## Исследование фосфатного регулона грам-положительных бактерий методами сравнительной геномики

Юрьева Марина Валерьевна<sup>14</sup>

студентка

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Факультет  
Биоинженерии и Биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: yurjeva@mail.ru

Неорганический фосфат – вещество, ограничивающее рост бактерии *Bacillus subtilis* в среде. Чтобы выжить в условиях фосфатного голодания, у *B. subtilis* выработался комплекс регуляторных систем, обеспечивающий клетку свободным фосфатом для полноценного функционирования клеточного метаболизма. Экспериментально показано, что ответ на недостаток фосфора осуществляется двухкомпонентной регуляторной системой PhoP-PhoR (Hulett et al., 1995). Группа генов, экспрессия которых регулируется непосредственно данной системой, получила название Pho-регулона. Индукция или репрессия генов данного регулона позволяет транспортировать и использовать ограниченные количества фосфата более эффективно, либо использовать альтернативные его источники. Показано, что в данный регулон входят следующие гены: *phoA* и *phoB*, кодирующие щелочные фосфатазы; *phoD*, кодирующий фосфодиэстеразу; оперон *pstSACBABB*, кодирующий фосфатный транспортер; *glpQ*, кодирующий белок, вовлеченный в гидролиз деацелированных фосфолипидов; опероны *phoPR* и *resABCDE*, кодирующие двухкомпонентные системы сигнальной трансдукции PhoPR и ResDE; опероны *tagAB* и *tagDEF*, участвующие в синтезе полиглицеролтейхоевой кислоты; *tuaABCDEFGH*, отвечающего за синтез тейхуроновой кислоты; а также ген с неизвестной функцией *ykoL* (Antelmann et al., 2000; Pragai et al., 2002).

В данной работе было проведено исследование эволюции Pho-регулона грам-положительных бактерий, для чего были использованы методы сравнительной геномики. Поскольку экспериментальные данные о структуре сайтов связывания недостаточны, был проведен анализ регуляторных областей генов Pho-регулона в ряде организмов, в результате чего было выяснено, что сигнал для связывания белка PhoP представляет собой прямой повтор из участков длиной 6 п.н., расстояние между которыми составляет 4-5 п.н. Также было показано, что для большинства генов характерна нестабильность регуляции в ходе эволюции.

### Литература

1. Antelmann, H., Scharf, C., Hecker, M. (2000) Phosphate starvation inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis // J. Bacteriol, №182, p. 4478–4490.
2. Hulett, F M. (1995) Complex phosphate regulation by sequential switches in *Bacillus subtilis* // Hoch J A, Silhavy T J., editors. Two-component signal transduction, Washington, D.C: American Society for Microbiology; p. 289–302.
3. Pragai, Z., Harwood, C. R. (2002) Regulatory interactions between the Pho and sigma B-dependent general stress regulons of *Bacillus subtilis*. Microbiology, №148, p. 1593–1602.

---

<sup>14</sup> Автор выражает признательность научному руководителю, Равчееву Дмитрию Андреевичу, м.н.с. ИППИ РАН, за помощь в подготовке тезисов.

## Использование удержанных интронов для изучения ошибок сплайсинга

Курмангалиев Ербол Жанузакович

младший научный сотрудник

Институт Проблем Передачи Информации РАН, Москва, Россия

Институт Проблем Биологии и Биотехнологии КазНУ им. аль-Фараби, Алматы,

Республика Казахстан

e-mail:kurmangali@mail.ru

Удержание интронов является наименее изученным типом альтернативного сплайсинга, и в отличие от других типов (которые заключаются в выборе между различными сайтами сплайсинга) представляет собой полное отсутствие сплайсинга. Чаще всего удержание интрона происходит при ошибке аппарата сплайсинга. В данной работе мы попытались использовать удержанные интроны для изучения условия, при которых ошибки сплайсинга наиболее вероятны.

Удержанными интронами (УИ) мы называли интроны для которых известен хотя бы один случай удержания. Соответственно остальные интроны мы называли перманентно сплайсируемыми (СИ). Из аннотаций генов и полноразмерных мРНК человека (1) были получены выборки из 903 УИ и 115064 СИ.

Полученная выборка УИ была сравнена с контрольной выборкой СИ по ряду признаков. Было показано, что УИ в среднем имеют более короткую длину, чем СИ (медианы длин 329 и 1631 н.о. соответственно). В то время как 89% УИ имели длину менее 1000 н.о., всего 37% СИ были короче данной величины. Это наблюдение согласуется с гипотезой об использовании пути «определения интрона» (*intron definition*), при сплайсинге коротких интронов (2). В то же время никаких существенных различий, между распределениями длин фланкирующих экзонов замечено не было.

Далее мы сравнили выборки по относительному расположению интронов в гене (Рис.1), которое мы определяли как отношение расстояния до начала интрона к общей длине гена. Ввиду существенных различий между средней длиной внутренних и терминальных экзонов (3), измерения были проведены для не сплайсированных мРНК, сплайсированных мРНК, а также для сплайсированных мРНК без 3'-терминального интрона. Кроме того, интроны сравнивались по относительному порядковому номеру, которое мы определяли как отношения порядкового номер интрона с 5'-конца гена к общему числу интронов в гене. Было показано, что независимо от способа измерения отношение количества УИ к СИ возрастает от 5'-конца гена к 3'-концу гена. Это наблюдение является подтверждением того, что сплайсинг протекает котраскрипционно (4).

Выборки также были сравнены по силе сайтов сплайсинга. Было показано, что как донорные, так и акцепторные сайты сплайсинга УИ в среднем более слабые, по сравнению с сайтами СИ, что подтверждает ранние наблюдения о том, что альтернативный сайты сплайсинга в среднем являются слабее конститутивных (5).

1. <http://genome.ucsc.edu/>.
2. Berget SM. Exon recognition in vertebrate splicing. J Biol Chem. 1995 Feb 10; 270(6):2411-4.
3. Hawkins JD. A survey on intron and exon lengths. Nucleic Acids Res. 1988 Nov 11; 16(21):9893-908.
4. Kornblihtt AR, de la Mata M, Fededa JP, Munoz MJ, Nogues G. Multiple links between transcription and splicing. RNA. 2004 Oct; 10(10):1489-98.
5. Clark F, Thanaraj TA. Categorization and characterization of transcript-confirmed constitutively and alternatively spliced introns and exons from human. Hum Mol Genet. 2002 Feb 15; 11(4):451-64.

**О взаимосвязи между темпами эволюционных изменений мРНК и нейтральностью замен нуклеотидов в них<sup>15</sup>***Бутвиловский Александр Валерьевич<sup>16</sup>**аспирант**Казюлевич Светлана Ричардовна**ассистент**Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь**E-mail: alexbutv@rambler.ru*

Цель исследования: установить количественную взаимосвязь между темпами эволюционных изменений мРНК и степенью нейтральности замен нуклеотидов в них.

Материалы и методы. Проанализированы и выровнены с помощью программ ClustalW последовательности мРНК, кодирующих ряд белков (креатинкиназу, алкогольдегидрогеназы классов 1 и 3, препроинсулин, проинсулин, инсулин, С-пептид, сигнальный пептид, рецептор инсулина и его домены, инсулин-подобные факторы роста 1 и 2, препроинсулин-подобный фактор роста 1, аденилатциклазу 9, аквапорин 1, интерлейкин  $\beta 1$ , гормон роста 1, релаксин 3) хордовых животных. Эволюционные дистанции рассчитаны с учетом картины замен нуклеотидов по методам Джукса-Кантора, Кимуры, Тадзимы-Нея, Тамуры, Тамуры-Нея. Скорость эволюции вычислена по методу М. Кимуры [1]. Нейтральность замен нуклеотидов определена по методу Н. Суеоки [2].

Результаты и обсуждение. Доля нейтральных замен по первому и второму положениям нуклеотида в кодонах мРНК, кодирующих креатинкиназу составила 3,3%, алкогольдегидрогеназы классов 1 и 3 – 9,7% и 6,3%, соответственно, препроинсулин – 29,2%, проинсулин – 22,9%, инсулин – 4,2%, С-пептид – 42,5%, сигнальный пептид – 31,7%, рецептор инсулина – 4,2%, каталитический и L2-домены рецептора инсулина – 8,3% и 20,0%, соответственно, инсулин-подобные факторы роста 1 и 2 – 7,9% и 25,0%, соответственно, препроинсулин-подобный фактор роста 1 – 14,0%, аденилатциклазу 9 – 5,8%, аквапорин 1 – 7,5%, интерлейкин  $\beta 1$  – 29,2%, гормон роста – 35,4% и релаксин 3 – 49,2%. Величина коэффициента нейтральности выше для мРНК, соответствующих белкам с меньшими ограничениями на изменения структуры и функции. Так, для полисубстратного изофермента алкогольдегидрогеназы (класс 1) нейтральность больше по сравнению с моносубстратным (класс 3). Установлено, что скорость эволюции мРНК, кодирующих креатинкиназу, равна  $0,33 \times 10^{-9}$  замен на сайт в год, алкогольдегидрогеназы классов 1 и 3 – 0,60 и 0,40, соответственно, препроинсулин – 0,78, проинсулин – 0,68, инсулин – 0,38, С-пептид – 1,67, сигнальный пептид – 1,00, рецептор инсулина – 0,58, каталитический и L2-домены рецептора инсулина – 0,36 и 0,48, соответственно, инсулин-подобные факторы роста 1 и 2 – 0,39 и 0,83, соответственно, препроинсулин-подобный фактор роста 1 – 0,41, аденилатциклазу 9 – 0,62, аквапорин 1 – 0,45, интерлейкин  $\beta 1$  – 1,34, гормон роста – 1,25, релаксин 3 –  $1,18 \times 10^{-9}$  замен на сайт в год. Между темпами эволюционных изменений изученных мРНК и степенью нейтральности замен нуклеотидов в них существует достоверная сильная прямая корреляционная связь ( $r=0,87 \pm 0,120$ ,  $p < 0,001$ ).

Закключение. Впервые установлено, что между темпами эволюционных изменений мРНК и нейтральностью замен нуклеотидов в них существует достоверная связь: с ростом коэффициента нейтральности замен нуклеотидов в первом и втором положениях кодонов мРНК происходит линейное увеличение скорости их изменений.

<sup>15</sup> Исследование выполнено в рамках гранта Белорусского Республиканского Фонда Фундаментальных Исследований № Б06М-060 от 01.04.2006 г.

<sup>16</sup> Автор выражает благодарность профессору, д.б.н. Барковскому Е.В. за помощь в подготовке тезисов.

### Литература

1. Барковский Е.В. [и др.] (2005) Методы молекулярной эволюции и филогенетики: учеб.-метод. пособие // Мн.: БГМУ. – 63 с.
2. Sueoka, N. (1988) Directional mutation pressure and neutral molecular evolution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, №85, p. 2653–2657.

## КАРТИРОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ САЙТОВ БЕЛКОВ НА ЭКЗОННОЙ СТРУКТУРЕ ГЕНА

**Медведева Ирина Вадимовна**

*студент*

Новосибирский Государственный Университет, Факультет естественных наук,  
Новосибирск, Россия  
E-mail: brukaro@gmail.com

Проблема сопоставления данных секвенирования нуклеотидных и аминокислотных последовательностей стала занимать умы ученых с момента самого их появления. Была построена статистика совпадения границ экзонов и белковых доменов на аминокислотной последовательности, при том выявлено, что группа генов, у которых эти границы действительно совпадают, является одной из преобладающих. На основе этих данных большой интерес представляет и исследование распределения функциональных сайтов на экзонной структуре гена.

Для решения этой проблемы был составлен алгоритм, использующий информацию баз данных PDBSite, PDB, EMBL и реализован на языке Perl с помощью программ Translate ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) и ClustalW ([www.ac.ebi.uk](http://www.ac.ebi.uk)). Составлена выборка из 120 сайтов.

Были введены коэффициенты разрывности сайта по первичной последовательности и разрывности сайта по экзонам. Выявлено, что разрывность сайта по экзонам встречается в 12,5% случаев, что опровергает предположение о том, что сайты являются кластеризованными по первичной последовательности. Это же доказывает и распределение коэффициента, непосредственно характеризующего эту величину: большая часть сайтов описывается минимальным значением этого коэффициента.

Были также построены теоретические распределения, основанные на предположении о случайном распределении количества функциональных аминокислот в экзоне, однако реальное распределение это предположение не подтвердило. Однако показано, что среди известных сайтов число аминокислот преобладает в группе от 1 до 3.

Для полученной выборки выполняется правило, согласно которому чем больше экзонов содержит последовательность, тем больше экзонов вовлечено в образование функционального сайта. По имеющимся данным можно говорить о том, для одного сайта в экзонах, содержащих функциональные аминокислоты, на 50 аминокислот содержится одна функциональная. На каждые следующие 7 аминокислот добавляется еще одна функциональная аминокислота.

На основе исследованной выборки создана база данных, доступная у автора. Кроме эволюционного значения данных исследований, существует и их практическая ценность для биоинженерных исследований в целях создания белков с новыми свойствами, так как каждый функциональный сайт отвечает за склонность белка к той или иной функции.

## РАСПОЗНАВАНИЕ МИКРОРНК ARABIDOPSIS THALIANA НА ОСНОВЕ КОНТЕКСТНОГО АНАЛИЗА MPSS ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

*Савинская Светлана Александровна*

*Студент*

*Новосибирский Государственный Университет, Факультет Естественных Наук*

*savinskaya@bionet.nsc.ru*

микроРНК – одноцепочечные некодирующие РНК длиной 20-24 нуклеотида, которые в составе сложного белкового комплекса RISC комплементарно или частично комплементарно связываются с мРНК эукариот и приводят либо к ее разрушению, либо к ингибированию процесса трансляции с нее на рибосоме. Все известные микроРНК эукариотических организмов принимают участие в регуляции многих клеточных процессов. Так, например, 38 (из 184) микроРНК растения *Arabidopsis thaliana* контролируют экспрессию генов 11 семейств транскрипционных факторов и 16 семейств генов молекулярных клеточных реакций, которые ответственны за процессы нормального развития листа, цветка, реакции на стресс и гормон ауксин. Существующие компьютерные методы распознавания микроРНК основаны на использовании априорной информации о биологической модели их биогенеза и функционирования: шпильчатая структура микроРНК предшественника и локализация последовательности микроРНК в стеблевой части этой структуры, комплементарность микроРНК к району связывания в мРНК мишени и феномен консервативности последовательностей некоторых микроРНК внутри царств растений и животных

Разработанными методами контекстного анализа последовательностей ARGO, SiteGA и ACTIVITY (Лаборатория теоретической генетики ИЦиГ) было показано наличие нетривиальных контекстных сигналов в последовательностях микроРНК *Ar. thaliana*, которые достоверно коррелируют со степенью их экспрессии в различных тканях. Также дискриминантным методом было показано, что последовательности микроРНК и микроРНК\* достоверно различаются по значениям функций распознавания каждого метода, а последовательности микроРНК, микроРНК\* и неканонические формы микроРНК достоверно различаются по семи параметрам – значения трех функций и количество нуклеотидов А,Т,Г,С. Это позволяет определить микроРНК как независимый класс биологических объектов и применить указанные методы для распознавания микроРНК среди данных эксперимента MPSS (Massively Parallel Signature Sequencing) (<http://mpss.udel.edu/at>).

Из общей выборки 33173 коротких 21 нт последовательностей объединенным методом ARGO&SiteGA&ACTIVITY было распознано 299 последовательности, для 75(25%) из которых были найдены потенциальные мишени методом выравнивания по BLAST. А в соответствии с правилами объединения известных микроРНК *Ar. thaliana* в семейства, были выделены 5 новых семейств потенциальных микроРНК и 12 одиночных микроРНК, имеющих в качестве потенциальных мишеней группы мРНК, кодирующие гомологичные белки. Кроме того, были обнаружены новые члены семейства эндогенных коротких РНК tasi-ARF/TAS3 (At5g57735/At3g17185).

Таким образом, показана возможность применения методов распознавания, основанных только на данных контекстного анализа, к предсказанию растительных микроРНК.

### Гипотеза о механизме подавления апоптоза хозяйской клетки нейссерияльными поринами PorB

Рудько Владимир Владимирович<sup>17</sup>

студент факультета биоинженерии и биоинформатики

Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: vovka-chem@bk.ru

Порины – трансмембранные трехсубъединичные белки, обнаруженные как в прокариотических организмах, так и в эукариотических. Эукариотический порин VDAC расположен в митохондриальной внешней мембране. Одна субъединица бактериального порина типа OmpF представляет собой бета-бочонок, состоящий из шестнадцати бета-тяжей. Основная функция данных белков – неспецифический транспорт через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий ионов, воды и небольших молекул, таких как глюкоза. Недавно было показано, что порин PorB внутриклеточных патогенов *Neisseria meningitidis* способен покидать бактериальную клетку, локализуясь в митохондриях, и ингибировать развитие апоптоза, что способствует выживанию бактерии. При этом PorB взаимодействует с митохондриальными поринами VDAC, известным модулятором апоптоза (Massari et al., 2000). Механизм данного взаимодействия не известен.

На основании слабого сходства небольших участков последовательностей поринов бактерии и VDAC мы предположили, что PorB встраивается в митохондриальную мембрану и замещает одну из субъединиц тримера VDAC. В результате специфических контактов достигается антиапоптотический эффект. Для обоснования гипотезы было решено идентифицировать участки слабого сходства последовательностей в третичной структуре белков. Но если для 6-и гомологов PorB структуры установлены методом рентгеноструктурного анализа, то структура поринов VDAC экспериментально не расшифрована. Предложены лишь модели топологии, полученные методами биоинформатики, и частично подтвержденные экспериментально. Опубликованные модели ( Song et. al., 1998, Cassadio et al., 1991, de Pinto et. al. 2002) различаются как числом бета-тяжей, так их положением в последовательности белка. Для выбора наиболее правдоподобной модели был разработан и применен метод идентификации петель в белке, основанный на анализе множественного выравнивания последовательностей белков семейства VDAC. Идея состоит в том, что вставки/делеции в тяжях, образующих ядро белка, маловероятны. 16-тяжевая модель (Cassadio et al., 2002) оказалась наиболее приемлемой: она противоречит полученным нами результатам лишь в одном тяже.

Локализация участков слабой гомологии на моделях структур PorB и VDAC подтверждает гипотезу о механизме взаимодействия двух белков. Также предсказаны остатки VDAC, предположительно контактирующие с PorB.

1. Massari, P. , King, C.A., Ho, I.Y., Wetzler, L. M. (2000) Neisserial PorB is translocated to the mitochondria of HeLa cells infected with *Neisseria meningitidis* and protects cells from apoptosis // Cellular Microbiology, 5(2), 99–109

---

<sup>17</sup> Работа частично поддержана грантами РФФИ 06-04-49558 и 06-07-89143

2. Song, J., Midson, C., Blachly-Dyson, E., Forte, M., Colombini, M. (1998) The Topology of VDAC as Probed by Biotin Modification // *J. of Biological Chem.*, 273(38), 24406–24413.
3. De Pinto, V., Prezioso, G., Thinnes, F., Link, T.A., Palmieri, F. (1991) Peptide-Specific Antibodies and Proteases as Probes of the Transmembrane Topology of the Bovine Heart Mitochondrial Porin // *Biochemistry*, 30, 10191-10200
4. Casadio, R., Jacoboni, I., Messina, A., De Pinto, V. (2002) A 3D model of the voltage-dependent anion channel (VDAC) // *FEBS Letters* 520, 1-7

### ПОДСЕКЦИЯ «МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ»

#### **“Разработка подхода к созданию генетически кодируемых сенсоров на основе флуоресцентных белков”.**

*Попова Кристина Мунировна, Шишова Анна Андреевна.*

*Студенты.*

*МГУ им. М.В.Ломоносова, факультет Биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия.*

*[kropova2006@yahoo.com](mailto:kropova2006@yahoo.com), [a\\_shishova@list.ru](mailto:a_shishova@list.ru)*

Флуоресцентные белки широко используются в молекулярной биологии в качестве генетически кодируемых маркеров генной экспрессии, белковой локализации и белок-белковых взаимодействий. Они являются незаменимыми инструментами для прижизненного наблюдения клеток и тканей. Эти белки приобретают способность флуоресцировать в ходе автокаталитического созревания без участия каких-либо кофакторов или вспомогательных белков.

Существует ряд сенсоров на основе флуоресцентных белков. Наиболее известными являются сенсоры на окислительно-восстановительный потенциал, pH, ионы Ca<sup>2+</sup>, сенсоры на галогенид-ионы, сенсор на молекулу цАМФ. В настоящее время направление по разработке флуоресцентных датчиков является развивающимся и перспективным.

Нами была предпринята попытка разработать подход для получения *in vivo* сенсоров на основе перспективного мономерного красного флуоресцентного белка mRFP1, который обладает рядом преимуществ по сравнению с другими белками: быстрой скоростью созревания, эмиссией флуоресценции в дальней красной области и отсутствием олигомеризации. В работе предложено создать на основе данных о строении белка mRFP1 и активных центров других белковых молекул, связывающихся с заданными лигандами, компьютерные структуры "химерных" белков, совмещающих в себе их свойства, таким образом, чтобы при получении сигнала (например, связывании лиганда) молекула меняла свою конформацию, вследствие чего, менялись бы оптические свойства белка. Для пробной реализации данного подхода были предложены две компьютерные структуры сенсоров на основе красного мономерного флуоресцентного белка (mRFP1) с несколькими заменами: Zn-сенсора (V71H, 72G73, D79C, L81C) и сенсора на окислительно-восстановительный потенциал (H73C, D79C). Сравнение данных анализа полученных траекторий о структуре молекул при наличии (эксперимент в присутствии ионов для Zn-сенсора и с дисульфидной связью для RedOx сенсора) и в отсутствие сигнала позволяет сделать вывод о возможной применимости предложенных структур в качестве сенсоров. Сравнение в присутствии и отсутствии сигнала может выявить различия в структуре и, как следствие, в оптических свойствах молекул.

Для изучения влияния сигнала на структуру сенсоров, проводились расчеты молекулярно-динамических траекторий для созданных структур с использованием

пакета программ Gromacs. Моделирование проводится при 300К, давлении- 1 атм, длина траектории - 5 наносекунд. Сравнение данных анализа полученных траекторий о структуре молекул при наличии и при отсутствии сигнала позволяет сделать вывод о возможной применимости предложенных структур в качестве сенсоров.

Структуры "химерных" белков, полученные с использованием разработанного в данной работе подхода могут быть в дальнейшем предложены для получения таких белков методами геной инженерии и применения в качестве генетически-кодируемых *in vivo* сенсоров.

### **Построение молекулярно-динамических моделей молекулярных систем на основе квантово-химических расчетов.**

*Зленко Д.В. Красильников П.М.*

*аспирант, доцент, к.ф-м.н.*

*МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия.*

В настоящее время основным инструментом теоретического исследования макромолекулярных систем являются методы вычислительной квантовой химии (КХ) и молекулярной динамики (МД). Теоретическая оценка значений констант жёсткости в моделях МД производится на основании КХ расчетов. При этом используют процедуру минимизации отклонений параметров поверхности потенциальной энергии, полученной в рамках классической МД модели, от аналогичных параметров КХ поверхности потенциальной энергии [1,2]. Наша работа посвящена развитию метода корректировки параметров моделей МД. В работе представлены результаты оптимизации модели небольшого участка липидной мембраны, собранной в рамках пакета GROMACS [3] и состоящей из 48 молекул дистеароилфосфатидилхолина (DSPC). Было обнаружено, что во многих случаях суммарная энергия взаимодействий атомов в модели существенно превосходит значения, следующие из прямых КХ расчётов. Это явление связано с неоднозначностью описания механических характеристик разветвлённых молекул при помощи жёсткостей связей, валентных и двугранных углов. В разветвлённых молекулах, для корректного описания взаимодействия атомов, необходимо из энергии, соответствующей КХ потенциалу некоторой степени свободы, вычесть вклады всех остальных степеней свободы. В противном случае, в модели эти взаимодействия учитываются неоднократно, что приводит к существенным ошибкам.

Нами разработан метод оптимизации силового поля в рамках пакета GROMACS [3]. Для оптимизации силовых параметров углов и связей нами был применён метод градиентного спуска. Для оптимизации потенциалов торсионных углов мы разработали процедуру вычисления разности между истинным КХ потенциалом и МД потенциалом, при условии отсутствия в модели явно заданного профиля двугранного угла. Полученная разность и должна быть передана МД программам в качестве потенциала торсионного угла.

Применив разработанную нами процедуру, мы провели расчёты для модели участка липидной мембраны (48 DSPC + 1750 молекул воды) и оценили следующие ее характеристики: 1) коэффициент латеральной диффузии в зависимости от температуры (от 300 до 400 К) составил  $3 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2 / \text{сек}$ ; 2) коэффициент вращательной диффузии для углеводородных остатков жирных кислот составил  $3 - 7 \cdot 10^9 \text{ рад}^2 / \text{сек}$ , а для полярных головок липидов  $4 \cdot 10^9 - 1 \cdot 10^{10} \text{ рад}^2 / \text{сек}$  (в том же температурном интервале). Времена вращательной корреляции составляют при этом  $\sim 3 \cdot 10^{-10} - 10^{-9} \text{ сек}$  и хорошо согласуются с экспериментальными значениями [4].

1. A.C. Vaiana 1, Z. Cournia, I.B. Costescu, J.C. Smith. (2006) // AFMM: A molecular mechanics force field vibrational parametrization program. *Comp. Phys. Com.* 167:34–42.
2. W.D. Cornell, Piotr Cieplak, Ch.I. Bayly, I.R. Gould, K.M. Merz, Jr.D..M. Ferguson, D.C. Spellmeyer, T. Fox, J.W. Caldwell and P.A. Kollman. (1995) // A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. SOC.* 117:5179-5197.
3. E. Lindahl and B. Hess and D. van der Spoel (2001) // GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Mod.* 7:306-317.
4. Ole G. Mouritsen (2005) // *Life As a Matter of Fat*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Germany.

### Управляемая молекулярная динамика разворачивания и рефолдинга белковых структур

*Федик Игорь Викторович, Шайтан Константин Вальдемарович*  
*Аспирант, профессор*  
*МГУ им. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия*  
*fedik@moldyn.org*

Методами управляемой молекулярной динамики исследуются внутренние силы, приводящие к формированию уникальной структуры белка альбегетина.

Данный белок является первым искусственным белком (или белком de novo), дизайн которого основывался на теории белковых структур. Альбегетин (ABV) был сконструирован и получен в 1991 году для выяснения принципиальной возможности создания искусственных белков с заданной структурой и свойствами. Предполагаемые структура и топология альбегетина ранее не были обнаружены в природе, однако они не противоречили известным закономерностям формирования белковой структуры. Полученный *in vitro* белок полностью соответствовал предсказанной структуре, а также обладал достаточной стабильностью и компактностью. Данные факты делают альбегетин привлекательным объектом для исследования механизмов формирования регулярных пространственных структур пептидной цепью и процессов сворачивания полипептидов и белков в целом.

Методы молекулярной динамики (МД) и, в частности, управляемой молекулярной динамики, позволяют исследовать микропараметры модельной молекулярной структуры такие, как пространственное положение отдельных заместителей, отдельные межатомные силы и т.д., которые сложно или не возможно исследовать в обычных лабораторных экспериментах. Помимо этого, с помощью метода МД могут быть получены макропараметры молекулы для сопоставления их с результатами экспериментов на реальном объекте, например, с результатами экспериментов, проводимых на оборудовании для атомно-силовой микроскопии (АСМ).

В данной работе исследуется молекулярная динамика белка альбегетина в режиме принудительного разворачивания глобулы путем разведения N-концевого и C-концевого остатков с постоянной скоростью. Также рассматривается возможность рефолдинга, то есть самопроизвольного восстановления исходной структуры альбегетина после снятия внешнего воздействия. Кроме того, исследуется динамика разворачивания коротких пептидных цепочек в альфа-спиральной конфигурации при приложении постоянной внешней силы к концевому остатку в различных средах, а также их способность к сохранению альфа-спиральной конфигурации.

### **Влияние диэлектрической проницаемости среды на вторичную структуру пептидов.**

*Оршанский Игорь Александрович*

*Аспирант*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,*

*Биологический факультет, Москва, Россия*

*Ingar@moldyn.org*

Трансмембранные домены белков представляют собой пептиды с гидрофобными или амфифильными свойствами. Трансмембранные домены, располагаясь в мембране, имеют преимущественно  $\alpha$ -спиральную структуру. Увеличение диэлектрической проницаемости среды приводит к уменьшению электростатического взаимодействия. Изменяя этот параметр, становится возможным оценить вклад электростатических взаимодействий в стабилизацию  $\alpha$ -спиральной конформации пептидов. Полученная информация может оказаться полезной при внесении точечных мутаций в структуру пептидов, приводящих к значительным изменениям в их вторичной структуре.

В работе изучается влияние диэлектрической проницаемости среды на стабильность вторичной структуры трансмембранных доменов белка NS2 вируса гепатита С.

Проводится молекулярная динамика пептидов в столкновительной среде при температуре 300 К. Используемые значения диэлектрической проницаемости: 1, 2, 4, 40. Оценка стабильности вторичной структуры производится по степени сохранения  $\alpha$ -спиральной конформации в результате динамики

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 04-04-49645) и Роснауки. Научный руководитель работы профессор К.В. Шайтан

### **Мутанты флуоресцентного белка mRFP1: моделирование структур и анализ их взаимосвязи со свойствами.**

*Храмеева Екатерина Евгеньевна*

*студентка*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет*

*биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия*

*E-mail: khrameeva@yandex.ru*

Флуоресцентные белки являются наиболее широко используемыми маркерами для визуализации процессов, происходящих в интактных биологических системах. В настоящее время ведутся работы по получению новых форм красных флуоресцентных белков с целью улучшения их свойств: квантового выхода, яркости, фото- и рН-стабильности и пр. Однако необходимая для развития данного направления взаимосвязь между оптическими свойствами флуоресцентных белков и их структурой практически не изучена, отсутствует методика прогнозирования свойств флуоресцентных белков на основании их структур. Такая задача может быть решена путем анализа свойств мутантных белков, содержащих единичные точечные аминокислотные замены, с последующим моделированием их структур *in silico* для поиска корреляций с оптическими свойствами.

В данной работе с помощью молекулярно-динамических методов проведено моделирование структур мутантных белков на основе мономерного красного флуоресцентного белка mRFP1 с 18-тью единичными точечными аминокислотными заменами глутамина-66. Также проанализирована взаимосвязь полученных структур с

оптическими свойствами для мутантных белков с заменами глутамина-66 на остатки аланина, лейцина, серина, цистеина, гистидина и аспарагина.

Для хромофоров и их 6Å окружений были найдены принимаемые с наибольшей частотой значения всех связей, валентных и торсионных углов. Отклонения значений длин связей и валентных углов от соответствующих средних значений оказались незначительными и, следовательно, недостаточными для построения обоснованных корреляций с оптическими свойствами, поэтому анализ был проведен только для значений торсионных углов.

Для торсионных углов, входящих в состав имидазолидонового кольца, а также располагающихся в областях присоединения подвергнутого замене бокового радикала и фенольного кольца в хромофоре, найдены самые высокие проценты корреляции (82-87%). Поскольку хромофор представляет собой систему сопряженных  $\pi$ -связей, плоское строение его структуры – одно из основных условий, обеспечивающих высокую флуоресценцию и яркость окраски белков. Отклонения значений перечисленных торсионных углов от  $0^0$  или  $180^0$  указывают на искажения планарной структуры хромофора, что не может не отражаться на изменении оптических свойств соответствующих белков.

В результате анализа корреляций значений торсионных углов в 6Å окружении хромофора с оптическими свойствами были выделены следующие остатки как имеющие коэффициент корреляции более 90% хотя бы с одним оптическим свойством: GLN64, PHE65, LYS70, PHE91, TRP93, VAL122, TRP143, TYR181, LEU199, TYR214.

Перечисленные остатки располагаются в непосредственной близости от хромофора, и изменение их положения в пространстве в результате аминокислотных замен по 66-й позиции взаимосвязано со структурой хромофора. Поиск таких остатков важен для решения задач направленного мутагенеза, поскольку аминокислотные замены по этим позициям должны в высокой степени влиять на хромофор и, как следствие, на оптические свойства белков. Кроме того, поиск подобных корреляций в перспективе позволит прогнозировать, как именно повлияет определенная мутация на ту или иную оптическую характеристику.

### **Поиск ингибитора образования комплекса между Hsp70 и фактором обмена нуклеотида**

*Черноризов Кирилл Александрович*

*Студент*

*Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, г.Москва*

*kirillchern@mail.ru*

Одним из перспективных направлений в современной биомедицине является использование молекулярных шаперонов в качестве терапевтического средства, обеспечивающего защитную реакцию клеток и всего организма на патогенные факторы. По имеющимся соображениям нарушение функционирования шаперона Hsp70 путем фиксации комплекса Hsp70-Субстрат-АДФ (где субстратом является несвернутый пептид) приведет к резкому повышению синтеза клеткой новых молекул Hsp70. Это повлечет за собой ряд важных терапевтических эффектов, одним из которых будет узнавание пораженной злокачественной опухолью клетки иммунной системой.

Комплекс Hsp70-Субстрат-АДФ можно стабилизировать, блокировав его взаимодействие с фактором обмена нуклеотида Bag-1. Поэтому целью данной работы является поиск низкомолекулярного соединения, способного конкурировать за место

связывания с фактором обмена нуклеотида Bag-1, для стабилизации комплекса Hsp70-Субстрат-АДФ.

На данный момент существуют данные рентгеноструктурного анализа (РСА) полнофункционального человеческого АТФ-зного домена Hsp70. На первом этапе была проведена подготовка рентгеновской структуры белка Hsp70 для дальнейшего использования в молекулярно-динамических расчетах. Далее был сконструирован комплекс человеческого Hsp70 с фактором обмена нуклеотида Bag-1 и проведен расчет молекулярно-динамических траекторий полученного комплекса в течение 5 нс.

Близким гомологом (степень гомологии 95%) Hsp70 является белок Hsc70, отличающийся конститутивным характером синтеза в клетке. Существует РСА комплекса человеческого Bag-1 с полнофункциональным АТФ-зным доменом бычьего Hsc70. В данной работе была смоделирована структура человеческого Hsc70 и его комплекса с Bag-1. Для этой системы также была проведена динамика полученного комплекса в течение 5 нс.

На данном этапе происходит изучение зоны контакта Hsp70 и Hsc70 с Bag-1 для определения участков на поверхности Hsp70 и Hsc70, ответственных за связывание с Bag-1. На следующем этапе работы планируется методами высокопроизводительного скрининга подобрать низкомолекулярное соединение, способное прочно связываться в выбранных участках и препятствовать образованию комплексов Hsp70/Bag-1 и Hsc70/ Bag-1.

Работа поддержана ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» научно-исследовательские работы по лоту “3” шифр "2007-2-1.2-05-01." по теме: «Шапероны в терапии нейродегенеративных заболеваний».

## ИЗУЧЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ БИОМЕМБРАН МЕТОДОМ УПРАВЛЯЕМОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ<sup>18</sup>

*Антонов Михаил Юрьевич<sup>19</sup>*

*Аспирант*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

*E-mail: mikhail@moldyn.org*

Исследование биологических мембранных структур методами молекулярной динамики представляет значительный интерес в связи с развитием молекулярных и биотехнологий. Одной из причин этого, также является возможность изучать такие свойства биологических мембран, недоступные для других методов исследования. В том числе, это касается и микроскопической картины массопереноса в сильно анизотропных структурированных средах, диффузионных процессов на границе водной и мембранной фаз, формирования и релаксации в них неравновесных структур.

С помощью метода молекулярной динамики, а также метода управляемой молекулярной динамики, в данной работе изучались модели мембран различного липидного состава: 1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилхолина (ПОФХ), дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ), кардиолипина (КРД). Для расчета траекторий использовался пакет молекулярной динамики PUMA с силовым полем Amber99.

<sup>18</sup> Работа выполнена на кафедре биоинженерии при финансовой поддержке РФФИ (грант 04-04-49645) и Роснауки.

<sup>19</sup> Автор выражает признательность своему научному руководителю, профессору д.ф.-м.н. К.В. Шайтану за постановку задачи и помощь в её решении.

Проводились расчеты для трех типов гидратированных бислоев мембран, в составе: 8 молекул КРД, 16 молекул ПОФХ, 16 молекул ДПФХ (система I); 30 молекул ПОФХ, 30 молекул ДПФХ (система II); 64 молекул ПОФХ (система III). Использовались периодические граничные условия. На молекулу липида приходилось 34-43 молекулы растворителя. Использовалась модель воды TIP3P.

В рамках работы проводилось также изучение проницаемости исследуемых мембран для различных типов молекул. В качестве молекул – пенетрантов рассматривались молекулы формамида, аммиака, воды, кислорода, глицерола, этандиола, этанола, масляной кислоты. Применялся метод управляемой молекулярной динамики, к исследуемым молекулам прикладывалась постоянная направленная по нормали к мембране сила.

Было показано, что для таких параметров мембраны, как средняя удельная площадь, приходящаяся на липид, коэффициент латеральной диффузии липидов, коэффициент сжимаемости мембраны наблюдается достаточная степень корреляции с экспериментальными данными.

### **Молекулярное моделирование энантиоселективности пенициллинацилазы в реакциях гидролиза ацильных производных аминокислот**

*Шошина Н.В., Новиков Ф.Н., Строганов О.В.*

*Студент*

*Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия.*

*E-mail: novikov@belozersky.msu.ru*

Одним из актуальных вопросов молекулярного моделирования на сегодняшний день является проблема описания энантиоселективности ферментов. Например, для фермента пенициллин G ацилазы (PGA) из *E.coli* в предыдущих исследованиях была построена модель, в которой описание энантиоселективности проводилось, используя информацию только о продуктивном связывании субстратов в активном центре фермента. Для большинства субстратов, таких как фенил-ацитильные производные аминсоединений, построенная модель хорошо описывает энантиоселективность. Однако для фенилацетил-фенилаланина и фенилацетил-фенилглицина модель работала значительно хуже, что свидетельствовало о необходимости ее доработки. Ранее было показано образование непродуктивных комплексов при связывании  $\beta$ -лактамных субстратов пенициллинацилазой. В данном исследовании было смоделировано влияние этих комплексов на энантиоселективность PGA.

Модельные системы представляли собой комплексы нативного фермента (пенициллин G ацилаза из *E.coli*) и субстратов — фенилацетил-фенилаланина (Phe) (D и L формы) и фенилацетил-фенилглицина (PhG) (D и L формы). Для каждой из систем были рассмотрены две конформации фермента (открытая и закрытая). Методом молекулярного докинга был проведен поиск альтернатив продуктивному комплексу. Оказалось, что таких комплексов всего два каждый, из которых имеет наглядный смысл: один из них, по-видимому, предшествует продуктивному связыванию (предпродуктивный комплекс), а второй препятствует продуктивному связыванию субстрата (непродуктивный комплекс).

Было показано существование различий в связывании субстрата в открытой и закрытой конформации фермента. При продуктивном связывании различия обусловлены смещением остатка aF146, который прижимает субстрат в оксианионный центр. Из-за смещения aF146 происходит частичный выход субстрата из активного центра и ухудшение предреакционной статистики. Было показано, что при непродуктивном и

предпродуктивном связывании переходы между открытой и закрытой конформациями фермента могут приводить к исчезновению или возникновению тех или иных центров связывания субстрата.

Для каждой из систем были оценены энергии связывания субстрата в продуктивном, предпродуктивном и непродуктивном центрах связывания.

По результатам расчетов свободной энергии образовавшихся комплексов и кинетической схеме, учитывающей их влияние, были вычислены константы Михаэлиса для каждой из четырех модельных систем. Полученные результаты согласуются с экспериментальными данными (соотношениями констант Михаэлиса D и L энантиомеров (PhG:  $\lg(K_{m(L)}/K_{m(D)})_{\text{exp}}=1.8$ ,  $\lg(K_{m(L)}/K_{m(D)})_{\text{calc}}=1.5$ ; Phe:  $\ln(K_{m(L)}/K_{m(D)})_{\text{exp}}=0.4$ ,  $\ln(K_{m(L)}/K_{m(D)})_{\text{calc}}=0.7$ ), что свидетельствует о применимости текущей модели для описания энантиоселективности PGA.

Работа поддержана грантом РФФИ № 06-04-49312.

### Моделирование структуры пенициллинацилазы из *B. megaterium*

*Нилов Дмитрий Константинович*  
студент

*Факультет Биоинженерии и Биоинформатики, Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия*  
*E-mail: nilovdm@list.ru*

Пенициллинацилаза (ПА) известна как катализатор гидролиза пенициллина и широко используется в производстве синтетических антибиотиков.

ПА обнаружена у различных организмов, однако хорошо изучена лишь структура фермента из *E. coli*, расшифрованная методом рентгеноструктурного анализа. Поэтому растет потребность в теоретических методах, позволяющих воссоздать структуры ПА из других источников по их последовательности.

В работе предпринято моделирование трехмерной структуры ПА из *B. megaterium*. Этот фермент отличается по каталитическим свойствам от ПА из *E. coli* и имеет особенности в строении активного центра.

Использовался метод гомологического моделирования и метод молекулярной динамики (МД), служащий для приближенного изучения поведения белка в растворителе во времени.

Модель была построена по гомологии с ПА из *E. coli* и затем оптимизирована с помощью метода МД по специально разработанному алгоритму. Алгоритм предполагает фиксацию лиганда в активном центре для поддержания правильной конформации структуры и последовательное снятие позиционных ограничений с атомов в процессе релаксации.

Атомы модели были разбиты на три группы, исходя из качества моделирования. Ограничения снимались в первую очередь с атомов тех остатков, конформация которых вызывала наибольшие подозрения. Это позволило предотвратить разрыв структуры, и, с другой стороны, способствовало поддержанию правильной конформации «надежных» остатков (в частности, остатков активного центра).

В результате МД была достигнута равновесная конформация белка. Анализ траектории МД позволил объяснить различие остатков активного центра ПА из *E. coli* и *B. megaterium* и сравнить механизм связывания этих ферментов с природным субстратом- пенициллином.

Сделано предположение о роли замены  $\alpha\text{Arg146}$  на  $\alpha\text{Tyr146}$  у ПА из *B. megaterium*.  $\alpha\text{Arg146}$  в ПА из *E. coli* отвечает за переход между открытой и закрытой конформацией фермента,  $\alpha\text{Tyr146}$  в ПА из *B. megaterium* предположительно участвует в формировании

гидрофобного кармана. Обнаружены новые остатки, способные образовывать устойчивые водородные связи с субстратом.

Оптимизированная модель может прояснить детали механизма катализа и послужить основой для рационального дизайна фермента с улучшенными каталитическими свойствами.

Работа поддержана грантом РФФИ №3 06-04-49312.

### **Исследование регуляции бактериальных аминокликозидфосфотрансферазы APHVIII, методами молекулярного моделирования.**

*Новиков Ф.Н., Стройлов В.С.*

*Аспирант*

*Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия.*

*E-mail: novikov@belozersky.msu.ru*

Бактериальные аминокликозидфосфотрансферазы (APH) — ферменты, обуславливающие устойчивость бактерий к антибиотикам за счет фосфорилирования. Все из детально охарактеризованных APH обладают конститутивной активностью, в то время как фермент APHVIII активируется, предположительно, подобно эукариотической киназе, фосфорилированием, хотя точный механизм активации APHVIII не известен. В данной работе проведено детальное исследование механизма активации фермента APHVIII методами молекулярного моделирования.

Первым этапом работы было моделирование трехмерной структуры фермента, APHVIII. Степень гомологии APHVIII с ближайшими родственными ферментами не превышает 50%, что обуславливает необходимость использования всех доступных структур — ферментов APHIII и APHII (PDB коды 118t и 1nd4).

Трехмерная структура APHVIII, полученная стандартной процедурой моделирования по гомологии (Swiss Model), характеризовалась рядом существенных недостатков, в частности наличием нескольких неструктурированных петель, отсутствием пяти N-концевых остатков. Структура содержала также большое количество остатков, боковые радикалы которых находились в невыгодной конформации. Это обуславливало наличие полостей в ферменте и отсутствие ряда ключевых солевых мостиков.

Была разработана методика устранения вышеперечисленных недостатков, присущих практически всем моделям, построенным по шаблонам с низкой степенью гомологии. В результате была получена полноценная модель фермента, дальнейшее изучение которой проводилось методами молекулярной динамики.

Следующим этапом стало определение остатков, фосфорилирование которых может привести к активации фермента. Стандартная биоинформатическая процедура для определения потенциальных сайтов фосфорилирования (программа NetPhos 2.0) выдала остатки серина и треонина, которые находились в толще фермента и не могли фосфорилироваться. В то же время, основываясь на анализе структуры полученной модели, был выбран единственный остаток S146, который, как оказалось, структурно гомологичен остаткам фосфорилируемого серина эукариотических киназ. Затем была построена модель, содержащая фосфорилированный остаток S146 (SEP146).

Для каждой из моделей (фермент-субстратный комплекс: APHVIII с АТФ и канамицином и тот же фермент-субстратный комплекс с SEP146) были рассчитаны молекулярно-динамические траектории длиной 10 нс. Обе модели были устойчивы в течение всего времени траектории.

Анализ траекторий показал, что SEP146 поддерживает белок в каталитически активной конформации, фиксируя участок петли, взаимодействующей с субстратом. Были рассчитаны энергии связывания канамицина в каждой из систем, и показано, хотя фосфорная группа остатка SEP146 на прямую не взаимодействует с субстратом, ее наличие понижает энергию связывания почти на 2 ккал/моль за счет поддержания каталитически активной конформации фермента.

## Молекулярная динамика сольватированных ионов в канале ГАМК-А рецептора<sup>20</sup>

Терёшкин Эдуард Владимирович<sup>21</sup>

стажёр

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: ram@moldyn.org

Рецепторы гамма-аминомасляной кислоты типа А (ГАМК-А) относятся к лиганд-зависимым ионным каналам и обеспечивают синаптическую передачу путём конформационных изменений, вызываемых связыванием нейромедиатора [1]. Рецептор состоит из пяти субъединиц, образованных четырьмя  $\alpha$ -спиралями. Трансмембранные домены ТМ1-ТМ4 каждой из  $\alpha$ -спиралей формируют ионный канал. Центральная часть канала, собственно пора, образуется из ТМ2-фрагментов, обеспечивающих функциональную активность рецептора.

До настоящего времени нет данных о трёхмерной структуре канала рецептора ГАМК-А. В данной работе была получена теоретическая модель канальной части гомомерного ГАМК-А рецептора, состоящего из субъединиц подтипа  $\alpha 1$ . Модель была создана на основе моделирования по гомологии с каналом никотинового ацетилхолинового рецептора [2] и откорректирована путём проведения молекулярно-динамических расчётов по аналогии с каналом глицинового рецептора [3,4]. Трёхмерная структура канала ацетилхолинового рецептора бралась из Базы данных белковых структур PDB: 1OED. При изучении миграции ионов использовался разработанный протокол управляемой молекулярной динамики [3]. Расчёты проводились в полноатомном приближении. Была изучена динамика прохождения ионов хлора, натрия и молекул воды.

В результате расчётов были найдены коэффициенты диффузии мигрирующих частиц, определены параметры флуктуаций внутреннего интерьера канала. Найденные значения коэффициентов диффузии согласуются с имеющимися экспериментальными данными. Было показано, что молекулы воды, выстилающие полость канала, значительно облегчают прохождение ионов сквозь канал рецептора. Присутствие ионов хлора во внеклеточной водной фазе также облегчает прохождение хлора через канал. На динамику ионов внутри канала оказывают влияние остатки аргинина, образующие два положительно заряженных кольца, что согласуется с полученными данными для глицинового рецептора.

## Литература

1. Sieghart W., Sperk G. (2002) Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes // *Curr. Top. Med. Chem.*, № 2 (8), p. 795-816.
2. Miyazawa A., Fujiyoshi Y., Unwin N. (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore // *Nature*, №423 (6943), p. 949-955.

---

<sup>20</sup> Работа выполнена при поддержке РФФИ (07-04-01169, 06-04-08136), Роснауки, Рособразования и US CRDF (2803).

<sup>21</sup> Научный руководитель работы – профессор, д.ф.-м.н. К.В. Шайтан. Работа выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

3. Шайтан К.В. и др. (2006) Неравновесная молекулярная динамика наноструктур, включая биологические // Химическая физика, № 25 (9), с. 31–48.
4. Shaitan K.V, Tereshkina K.B, Levtsova O.V (2006) Molecular dynamics and design of transmembrane ion channels // Proceedings of the 5th international conference on bioinformatics of genome regulation and structure, p. 315-319

### **Конформация остатка Н95 принадлежащего CDR Н3 узнающей области антител.**

*Аржаник Владимир Константинович<sup>1</sup>, Колясников Олег Владимирович<sup>2</sup>  
школьник, научный сотрудник*

<sup>1</sup> *Специализированный Учебно-Научный Центр МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

<sup>2</sup> *Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия  
E-mail: sheikino\_sunz22@mail.ru*

Антитела - класс белковых молекул, отвечающих за распознавание антигенов в организме позвоночных. Их узнающие области состоят из консервативного каркаса и шести относительно небольших гипервариабельных петель (CDR). Общность устройства антител привлекательна для развития точных методов моделирования их пространственной структуры. На данный момент наибольшую сложность в моделировании представляет CDR Н3. Недавно было показано, что наличие или отсутствие остатка тирозина в позиции Н95 тесно коррелирует с изогнутой или вытянутой формой полипептидной цепи ближней части («torso») CDR Н3. В связи с этим анализ конформации его боковой цепи, а также боковых цепей других ароматических остатков важен для понимания причин этого эффекта.

В рамках работы были проанализированы 98 пространственных структур антител из базы данных PDB ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)), содержащих ароматические остатки в позиции Н95. Было показано, что в отобранных структурах «torso» CDR Н3, в зависимости от первичной последовательности, может принимать как изогнутую, так и вытянутую конформацию. При этом ориентация боковой цепи остатков Н95 хорошо коррелирует с конформацией «torso» CDR Н3, что позволило нам впервые вывести следующие правила:

1. При изогнутой конформации «torso» боковая цепь ароматических остатков в позиции Н95 направлена к поверхности белка вдоль полипептидной цепи.
2. В случае наличия Trp в позиции Н95 и общей длины CDR Н3 не более 10 остатков плоскость ароматического ядра остатка перпендикулярна проекции связи C $\alpha$ -C $\beta$ .
3. При вытянутой форме «torso» CDR Н3 конформация боковой цепи остатка Н95 практически полностью зависит от локального окружения и её корреляций с первичной последовательностью антител не обнаружено.

Исключения из этих правил немногочисленны и, по большей части, предсказуемы на базе выведенных нами дополнений к основным правилам.

Таким образом, полученные результаты ещё более повышают аккуратность моделирования пространственной структуры антител.

### **Литература**

1. Shirai H., Kidera A., Nakamura H. (1996) Structural classification of CDR-H3 in antibodies // FEBS Letters, №399, p.1–8.
2. Chothia C., Lesk A., Tramontano A., Levitt M., Smith-Gill S.J., Air G., Sheriff S., Padlan E.A., Davies D., Tulip W.R., Colman P.M., Spinelli S., Alzari P.M., Poljak R.J. (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable region // Nature, №342, p.877–883.

3. Koliashnikov O.V., Kiral M.O., Grigorenko V.G., Egorov A.M. (2006) Antibody CDR H3 modeling rules: extension for the case of absence of Arg H94 and Asp H101 // Journal of bioinformatics and computational biology, №4(2), p. 415-424.

### **Рациональный дизайн биокатализаторов для фармацевтики и биотехнологии<sup>22</sup>**

Строганов О.В., Чиров Г.Г.

*Аспирант*

*Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва,  
Россия*

*E-mail: [stroganov@belozersku.msu.ru](mailto:stroganov@belozersku.msu.ru)*

Одним из практически важных и интересных с научной точки зрения приложений молекулярного моделирования в биотехнологии и фармацевтике является рациональный дизайн биокатализаторов – ферментов. Задача поиска подходящего биокатализатора возникает, когда нужно селективно провести то или иное химическое превращение, и стандартные методы органического синтеза для этого не подходят, как это часто бывает в случае сложных природных молекул, или когда необходимо сделать технологический процесс более экономичным и безопасным с экологической точки зрения.

В данной работе показано, что с помощью методологии молекулярного докинга и виртуальной белковой инженерии можно отыскивать белки (ферменты), обладающие средством к заданному субстрату, и проводить инженерию отобранных ферментов для повышения их специфичности в интересующих реакциях. С помощью созданной программной системы для рационального дизайна фермента *in silico* было смоделировано улучшение свойств известного биокатализатора - пенициллинацилазы из *E.coli*, катализирующей синтез бета-лактамовых антибиотиков, таких как ампициллин, цефалексин, амоксициллин и т.д. Эффективность природного фермента недостаточна, чтобы заменить многостадийный процесс химического синтеза одностадийным ферментативным процессом. Для повышения специфичности фермента виртуально варьировались аминокислотные остатки его активного центра, которые участвуют в связывании субстрата. Для каждой мутации проверялось (методом молекулярного докинга) средство новой формы фермента к субстрату. Всего были проскринированы более 3000 мутантных форм фермента, несущих произвольные одиночные и двойные мутации, среди которых были обнаружены мутантные формы, связывающего субстрат почти в 100 раз лучше природного фермента.

### **Моделирование пространственной структуры и специфичности протеинкиназы человека РКСа.**

Стройлов В.С., Новиков Ф.Н.

*Аспирант*

*Факультет Биоинженерии и Биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва,  
Россия*

*[stroylov@belozersky.msu.ru](mailto:stroylov@belozersky.msu.ru)*

---

<sup>22</sup> Работа поддержана грантом РФФИ № 05-07-90292

Семейство человеческих протеинкиназ С характеризуется участием в широком спектре клеточных биохимических процессов, имеющих принципиальное значение для создания новых противораковых препаратов. На сегодняшний день из 13 протеинкиназ С только для двух ферментов имеются пространственные структуры, поэтому получение высококачественных трехмерных моделей ферментов этого класса представляется актуальной задачей.

В настоящей работе было проведено построение трехмерной модели протеинкиназы РКСа. Степень гомологии РКСа с ближайшими родственными ферментами, для которых имеется экспериментально установленная пространственная структура, не превышает 50%, что обуславливает необходимость построения множественного выравнивания аминокислотных последовательностей, для которого были выбраны протеинкиназы РКСθ (1XJD), РКСи (1ZRZ) и РКВ (1O6L). Структура РКСа, полученная после пространственного выравнивания ее последовательности со структурами белков-шаблонов и достройки недостающих N- и C-концевых остатков, характеризовалась рядом существенных недостатков, в частности наличием полостей в гидрофобных участках, а также нескольких неструктурированных петель, отсутствующих в остальных протеинкиназах. Приведение этих петель к структуре α-спиралей проводилось методом молекулярной динамики путем постепенного стягивания витков спиралей с приложением постепенно возрастающей силы к парам атомов, образующих водородные связи в α-спирали. После этого для корректного моделирования конформации активного центра в модель протеинкиназы РКСа был встроен высокоспецифичный ингибитор (3S,4S)-3-(1H-индол-3-ил)-4-{1-[2-(1-метил-1H-пиррол-2-ил)этил]-1H-индол-3-ил} пирролидин-2,5-дион (BIS), для которого известна экспериментально измеренная энергия связывания. Модель была помещена в ячейку с водой, и после постепенной релаксации системы была рассчитана молекулярно-динамическая траектория длиной 7.5 нс. Энергия связывания лиганда BIS, рассчитанная по траектории, хорошо согласуется с экспериментально измеренным значением, что свидетельствует об адекватности построенной модели. Далее, после соответствующей подготовки структуры был проведен докинг ряда соединений – потенциальных кандидатов на роль противораковых и подавляющих множественную лекарственную устойчивость препаратов. Соединения, отобранные по результатам докинга и предсказания энергии связывания в настоящее время проходят экспериментальную проверку в Российском онкологическом научном центре им. Блохина РАМН.

Таким образом, в настоящей работе было проведено моделирование трехмерной структуры протеинкиназы РКСа при низкой гомологии, полученная структура существенно улучшена методом молекулярной динамики, а также показана адекватность и применимость построенной модели для поиска новых лекарств методами теоретической химии.

### Молекулярная динамика зервамицина II и ряда его мутантных аналогов <sup>23</sup>

*Левцова Ольга Владимировна*<sup>24</sup>  
аспирант

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова  
Биологический факультет, Москва, Россия*

<sup>23</sup> Работа поддержана РФФИ (07-04-01169, 06-04-08136), Роснаукой, Рособразованием и US CRDF (2803).

<sup>24</sup> Научный руководитель работы – профессор, д.ф.-м.н. К.В. Шайтан. Работа выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

*e-mail: sunely@yandex.ru*

В настоящее время актуальной является проблема изучения антимикробных пептидов, действующих на широкий спектр бактерий, устойчивых к большинству известных антибиотиков. Изучение таких пептидов представляет приоритетную задачу в биофармакологии. Одним из антимикробных пептидов является зервамицин II, относящийся к классу пентайболов, продуцируемых микопаразитическими грибами родов *Emericellopsis*, *Trichoderma* и родственных им. Он состоит из 16 остатков и содержит нестандартные аминокислотные остатки: Aib (альфа-аминоизомасляная кислота), Iva (изовалин) и Нур (4-транс-гидроксипролин). Зервамицин II взаимодействует с клеточной мембраной, нарушая ее ионную проницаемость. Точный механизм действия на данный момент неизвестен, однако, предположительно он обладает каналобразующей активностью.

С помощью метода молекулярной динамики было проведено сравнительное изучение динамики модифицированных аминокислотных остатков Aib и Iva с природными Ala и Val соответственно. Было показано, что модифицированные аминокислотные остатки стерически более ограничены, чем не модифицированные, что объясняется добавлением ацильной группы к C $\alpha$ -атому. Подобные аминокислотные остатки делают спиральную структуру пентайболов более жесткой.

С целью изучить конформационные изменения при переходе из полярной среды в неполярную была изучена динамика зервамицина в воде и в метаноле. Однако для зервамицина II конформационных изменений выявлено не было, что может служить доказательством стабильности его структуры в растворителях с различной полярностью.

Молекула зервамицина обладает достаточно жесткой спиральной структурой. И, в отличие от более длинных пентайболов, не обладает шарнирными движениями. Наличие шарнирных движений определялось с помощью функции распределения вероятностей расстояния между C $\alpha$ -атомами первого и последнего остатков. С целью выявления аминокислотных остатков, обеспечивающих жесткость молекулы, был исследован ряд мутантов зервамицина-II: с заменой Aib на Ala в 7-ом и в 9-ом положениях. В результате проведенных компьютерных экспериментов, было показано, что замена в 7-ом положении практически не влияет на динамику, в то время как, у зервамицина с заменой в 9-ом положении помимо шарнирных движений было обнаружено сильное изменение средней длины молекулы в зависимости от растворителя. Так, в воде длина молекулы составляет 2,4нм, а в метаноле 1,6нм. Следует отметить, что направленные аминокислотные замены, влияющие на жесткость молекулы зервамицина важны не только для понимания механизма действия и роли отдельных остатков в нем, но и фармакологии. Таким образом, результаты работы лежат в рамках проблемы создания нового поколения антимикробных пептидов направленного действия.

## **НАНОУГЛЕРОДНЫЕ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ АБСОРБЦИИ И ДОСТАВКИ ВЕЩЕСТВ В КЛЕТКИ<sup>25</sup>**

*Турлей Егор Владимирович<sup>26</sup>*  
*стажер, к.ф.-м.н.*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

---

<sup>25</sup> Тезисы доклады основаны на материалах исследований, проведенных в рамках грантов федерального агентства Роснаука, РФФИ (грант № 04-04-49645), Правительства Москвы и US CRDF.

<sup>26</sup> Автор выражает признательность профессору, д.ф.-м.н. Шайтану К.В. за помощь в подготовке тезисов.

*E-mail: yegor@moldyn.org*

В работе разрабатываются методы молекулярного моделирования и молекулярного дизайна комплексов углеродных нанотрубок с биополимерами.

Углеродные нанотрубки могут быть использованы в качестве неиммуногенных емкостей для биологически активных молекул и для их селективной доставки к клеточной мембране. Для дизайна таких структур использовался метод управляемой молекулярной динамики (SMD). Углеродная нанотрубка под действием внешнего давления проникала через поверхность раздела биомембрана-вода. Способы приложения силы к нанотрубке варьировались. Аналогичные режимы проникновения могут осуществляться, если, например, имеется притяжение между концом нанотрубки с определенной функциональной группой и рецептором на поверхности мембраны. Ранее рассчитывался также механизм проникновения вещества, заключенного в нанотрубке, в клетку с использованием наношприца – выталкивающей силы за счет нановзрыва [1, 2]. В этих работах была продемонстрирована также возможность самосборки наноустройств типа наношприца. В процессе самосборки важна селективность по отношению к абсорбции нанотрубкой активных молекул. Это явление, в принципе, может быть также использовано для селективной очистки, например, биологических жидкостей от молекул (типа холестерина). Абсорбция молекул холестерина оказалась чувствительна к деталям строения поверхности нанотрубки и функциональным группам молекул, контактирующим с ней.

#### Литература

1. Shaitan K.V., Tourleigh Ye.V., Golik D.N. Molecular dynamics of carbon nanotube-polypeptide complexes at the biomembrane-water interface // “Carbon Nanotubes”, Popov V.N. and Lambin Ph. (Eds.). NATO Science Series II: Mathematics, Physics and Chemistry, Springer, 2006, vol. 222, p. 233–234.
2. Shaitan K.V., Tourleigh Y.V., Golik D.N., Kirpichnikov M.P. Computer-aided molecular design of nanocontainers for inclusion and targeted delivery of bioactive compounds // Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2006, 16 (4), p. 253–258.

#### **Области применения математической модели фотосинтетических процессов, включающей описание световых и темновых стадий фотосинтеза**

*Д. В. Куржанов<sup>27</sup>*

*Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия; e-mail Kirzhanov@gmail.com*

Исследуется поведение модели первичных процессов фотосинтеза, описывающей процессы, протекающие в хлоропластах высших растений. Рассматриваемая модель учитывает существование компонент фотосинтетического аппарата, присущих высшим растениям и водорослям. В модели учитывается наличие двух фотосистем, каждая из которых состоит из антенного комплекса и реакционного центра. Фотосистема 2 дополнительно учитывает наличие комплекса разложения воды. Цепочка электронного транспорта представлена тремя компонентами. В модели учитывается существование цикла Кальвина. Ранее модель в некоторых модификациях была успешно использована для описания различных явлений, наблюдаемых в эксперименте. В данной работе обосновывается правомерность использования этой модели и исследуется её поведение на малых временах, что существенно расширяет область её применения.

---

<sup>27</sup> Автор выражает благодарность д.ф.-м.н., проф. А. К. Кукушкину за интересную тему для научной работы и помощь в подготовке публикаций

Используются 2 модификации модели. Первая модификация содержит 15 дифференциальных уравнений и может быть использована для анализа поведения модели на малых временах. Вторая модификация содержит 11 дифференциальных уравнений и 4 алгебраических и может быть использована для анализа поведения модели на временах до десятков минут.

Во многих случаях использование последовательности прямоугольных импульсов пригодно для изучения поведения рассматриваемой математической модели фотосинтетических процессов. Наличие разрывов в функции, описывающей последовательность импульсов прямоугольной формы, не оказывает существенного влияния на поведение решения системы дифференциальных или дифференциально-алгебраических уравнений, соответствующей рассматриваемой модели.

Математическая модель впервые рассмотрена при помощи системы дифференциальных уравнений, не содержащей малого параметра. Система дифференциальных уравнений, не содержащая малых параметров, может быть использована для анализа поведения математической модели на временах от  $10^{-12}$  до  $10^{-6}$  с. Использование этой системы на больших временах не актуально из-за большого времени счёта.

### Литература

1. Stirbet A., Govindjee, Strasser B.J., Strasser R.J. J. Theor. Biol. 1998, 193, 131-151.
2. Trissl H.W., Gao Y. and Wulf K. Biophys. J., 1993, v.64, April, p.974-988. Theoretical fluorescence induction curves derived from.
3. Караваев В. А., Кукушкин А. К. Теоретическая модель световых и темновых процессов фотосинтеза: проблема регуляции// Биофизика. – 1993. – т. 38, вып. 6. – С. 958-975
4. Рубин А. Б., Кренделёва Т. Е. Регуляция первичных процессов фотосинтеза// Успехи биол. Химии. – 2003. – т. 43. – С. 225-266

### Расчет площади поверхности биополимеров, доступной растворителю, с помощью объединения пар атомов.

*Рычков Георгий Николаевич<sup>1</sup>*

*младший научный сотрудник*

*Петухов Михаил Геннадьевич<sup>1</sup>*

*доцент, старший научный сотрудник*

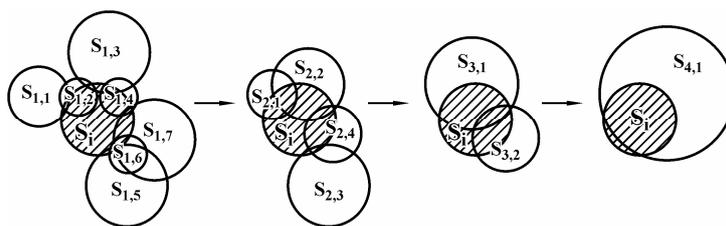
*<sup>1</sup>НОС «Биофизика» Санкт-Петербургского государственного политехнического университета и Петербургского института ядерной физики РАН, Санкт-Петербург, Россия.*

*E-mail: georgy-rychkov@yandex.ru, pmg@omrb.pnpi.spb.ru*

Многие биополимеры клетки функционируют в водном окружении. Вода вносит значительный вклад в процессы формирования пространственной структуры белков и оказывает влияние на их динамические характеристики. Основные функции белков, такие как узнавание субстратов, связывание лигандов и катализ химических реакций, часто поддерживаются участием воды. Таким образом, адекватный учет эффекта гидратации абсолютно необходим для понимания механизмов действия биологических макромолекул. Экспериментальные данные о взаимодействии белков с водой применяются для создания энергетических потенциалов, широко используемых в моделировании сворачивания белков, предсказания их структуры, а также конструирования мутантных белков с заданными свойствами. Модели, которые основаны на расчете молекулярной площади поверхности, доступной растворителю

(ПДР) и описывают растворитель непрерывной средой, позволяют значительно сократить время, требуемое для вычисления энергии гидратации (Feig and Brooks, 2004).

Нами был предложен новый метод приближительного вычисления площади ПДР и ее производных по координатам атомов, основанный на рекурсивном объединении пар соседних атомов. Алгоритм работы метода приведен на схеме, изображенной на рисунке. В отличие от известных методов приближительного расчета площади ПДР (Guvench and Brooks, 2004; Weiser et al., 1999) предложенный нами метод не содержит эмпирических параметров, и может быть применен к молекулам любой химической природы, независимо от их конформации. Тестирование метода показало, что на репрезентативном наборе глобулярных белков в полноатомном представлении, средние атомарные отклонения от точных величин площади ПДР не превышают  $1 \text{ \AA}^2$ , а для тех же белков в развернутом состоянии находятся в пределах от  $1.6 \text{ \AA}^2$  до  $1.9 \text{ \AA}^2$ .



1. Feig, M. & Brooks, C. L., 3rd. (2004). Recent advances in the development and application of implicit solvent models in biomolecule simulations. *Curr Opin Struct Biol* **14**, 217-24.
2. Guvench, O. & Brooks, C. L., 3rd. (2004). Efficient approximate all-atom solvent accessible surface area method parameterized for folded and denatured protein conformations. *J Comput Chem* **25**, 1005-14.
3. Weiser, J., Shenkin, P. S. & Still, W. C. (1999). Approximate atomic surfaces from linear combination of pairwise overlaps (LCPO). *J. Comp. Chem.* **20**, 217-230.