

Секция «БИОИНЖЕНЕРИЯ И БИОИНФОРМАТИКА»

Эпитопный анализ аутоантител к β 1-адренорецепторам

Д.А. Алахова

Биологический факультет, МГУ им. Ломоносова

E-mail: dareline@yandex.ru

β 1-Адренорецепторы относятся к семейству G белок-сопряженных рецепторов и участвуют в передаче сигналов от симпато-адреналовой системы. Известно, что длительная активация β 1-адренорецепторов, локализованных на кардиомиоцитах, вызывает повышение внутриклеточной концентрации ионов кальция, что может приводить к перерождению клеток и развитию сердечной недостаточности. Одной из гипотез возникновения и развития сердечной недостаточности является гипотеза иммунно-аутоиммунной природы. Предполагают, что различные инфекционные агенты, такие как вирусы или бактерии, могут индуцировать аутоиммунные реакции и появление аутоантител против β 1-адренорецепторов, которые могут вызывать хроническую патогенную стимуляцию кардиомиоцитов.

Основной мишенью для аутоантител на молекуле рецептора служит вторая внеклеточная петля — фрагмент 197 — 222. Помимо того, что этот домен обладает стерической доступностью для действия антител, он играет существенную роль в связывании рецептором специфического лиганда.

Нами разработана тест-система для определения аутоантител к β 1-адренорецепторам в сыворотках человека, в которой в качестве антигена использовался химически синтезированный 26-тичленный полипептид, соответствующий второй внеклеточной петле рецептора. Для определения основного сайта связывания аутоантител было проведено пептидное картирование данного участка рецептора. Короткие 6-7 членные пептиды, соответствующие различным фрагментам этой последовательности были получены химическим синтезом. Взаимодействие аутоантител с различными фрагментами β 1-адренорецептора изучалось с помощью метода иммуно-ферментного анализа. Был выявлен эпитоп (DEARRCY), который обладает такой же антигенной активностью, как и 26-членный полипептид (197 — 222).

**Вырожденные тандемные повторы в геномных последовательностях.
Поиск и их возможная роль в регуляции экспрессии генов**

В.А. Боева, В.Ю. Макеев

*Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В.Ломоносова
E-mail: valeyo@csi.ru*

Многие эксперименты указывают на то, что тандемные повторы играют роль в регуляции экспрессии генов. Этому отчасти противоречат последние данные, согласно которым тандемные повторы, находящиеся в регуляторных участках, сильно различаются даже у близких видов [1]. Отсюда возникает гипотеза, что для регуляции активности гена важен сам факт наличия повтора в регуляторной области, а не конкретная последовательность мотива.

Нами была написана программа SWAN [2] для поиска вырожденных тандемных повторов в последовательностях ДНК. С ее помощью был проведен анализ частот встреч тандемных повторов как в полном геноме *D. melanogaster*, так и в его сегментах, несущих различные функции, таких как регуляторные области (энхансеры), кодирующие и различные некодирующие области. Оказалось, что повторы с периодами 6, 7 и 8 чаще встречаются в энхансерах, чем где-либо. Как мы предполагаем, это вызвано тем, что такие повторы отчасти дестабилизируют двойную спираль ДНК (период витка которой примерно 10.2 п.н.), что облегчает процесс ее связывания с белками-регуляторами. Эту гипотезу подтверждает тот факт, что повторы с периодом, кратным пяти, которые по нашей гипотезе должны наоборот стабилизировать двойную спираль, относительно перепредставлены в участках гетерохроматина *D. melanogaster*. Как известно, эта ДНК не транскрибируется и находится в сконденсированном состоянии.

Литература

1. Sinha S. and Siggia E.D. «Sequence turnover and tandem repeats in cis-regulatory modules in *Drosophila*» // MBE, published online on January 19, 2005.
2. V.A. Boeva, M. Regnier, V.J. Makeev «SWAN: searching for highly divergent tandem repeats in DNA sequences with evaluation of their statistical significance» // Proceedings of the JOBIM'2004, Montreal, Canada, 2004.

К вопросу о воздействии лекарств на человека

А.Г. Бучацкий, К.Ю. Казаченко, А.А. Александров

Институт Молекулярной Генетики РАН

E-mail: bgerman@bk.ru

На сегодняшний день без обращения к современным базам данных (БД) уже трудно представить деятельность специалистов в области биологии и медицины. Однако развитие БД лекарственных препаратов сдерживается жестким способом структурирования данных о лекарствах в таких ресурсах, имеющих в своей основе реляционную схему. Для анализа комплексного воздействия на организм лекарственных препаратов удоб-

но рассматривать биологию и фармацию как единое целое. Как совместить информацию о лекарственных средствах и биологических процессах, в которые они вовлечены, в общем формате?

Дизайн, предлагаемой для этих целей БД, предусматривает сортировку лекарств по своим биологическим мишеням. Так, вместе с ферментами, рецепторами и т.д. лекарственные средства классифицируются по соответствующим разделам биологических наук о человеке, таких как иммунология, эндокринология, цитология и др., каждый из которых имеет иерархическую структуру, задаваемую системой оглавлений. Единицами информации в БД являются текстовые записи, которые соединены контекстными ссылками в гипертекстовую сеть. Причем стыки групп записей, в которых один и тот же объект упоминаться много раз образуют узлы распределительной системы, которые автоматически становятся гиперссылками при переходе в оглавления. Пользователь во время работы постоянно имеет информацию о том, на каком уровне иерархии он находится в настоящий момент, а также о том какие, разделы предшествуют данному разделу выше по иерархии. Благодаря такой конфигурации можно свободно переходить из характеристик лекарства в сопутствующие биологические процессы и наоборот, изучать или опускать дополнительную информацию. Структура разработана с расчетом на ее неограниченное пополнение и дополняется мощными поисковыми средствами. Это единственная информационная система, в которой гипертекст, являясь всеобъемлющим интегрирующим элементом, связывает лекарственные средства с их физиологическими партнерами функциональными связями.

Так как действию лекарственных веществ на организм присущи обратные связи, БД может быть использована при выборе предпочтительных путей терапии, тем самым, уменьшив риск осложнений от приема препаратов, а также в образовательных целях.

Компьютерный анализ адаптивного и нейтрального режимов эволюции белков вируса гепатита¹

Е.С. Варламова

Новосибирский Государственный Университет

E-mail: lena@bionet.nsc.ru

Оценка и предсказание влияния аминокислотных замен на структуру и функцию белка является актуальной задачей молекулярного дизайна белковых молекул. Для ее решения часто используют информацию о заменах в аминокислотных последовательностях родственных белков. Их сравнительный и эволюционный анализ позволяет определять мутации, свидетельствующие о функциональной нагрузке аминокислотных остатков в белках.

Один из таких подходов базируется на существовании двух типов нуклеотидных замен в последовательностях ДНК, кодирующих белки: сино-

¹ Работа поддержана грантом Американского фонда гражданских исследований и развития (CRDF) и Минобразования России в рамках Программы «Фундаментальные исследования и высшее образование» (BRHE) (NO-008-X1).

нимичные замены не изменяют тип аминокислоты в последовательности белка, поэтому согласно теории молекулярной эволюции Кимуры [1], не подвержены действию отбора, и наоборот несинонимичные замены приводят к заменам аминокислот и подвержены действию отбора. Показателем уровня воздействия отбора является критерий адаптивности, вычисляемый как отношение $\omega = d_n/d_s$, где d_n – скорость фиксации несинонимичных замен, а d_s – скорость фиксации синонимичных замен. При положительном отборе $\omega > 1$, при нейтральной эволюции $\omega < 1$. Участки белка, подверженные адаптивному отбору могут являться функционально значимыми участками молекулы, а также адаптивный режим эволюции в целом для гена может говорить о приобретении данным геном новой функции. Высокие темпы эволюции характерны для генов белков оболочки вирусов, генов, генов иммуноглобулинов, генов транскрипционных факторов [2].

Настоящая работа посвящена исследованию адаптивного режима эволюции белков вируса гепатита-С человека [3], а так же выявлению на основе этих данных особенностей структурно-функциональной организации этих белков и их взаимодействия с клетками иммунной системы.

В ходе работы был проведен анализ критерия адаптивности для каждой позиции [2]. Участки с высоким критерием адаптивности картировались на последовательности для белков с известной пространственной структурой визуализировалось расположение данного фрагмента в глобуле, определялась его функция. Был произведен статистический анализ корреляции сайтов подверженных адаптивному отбору с активными сайтами белков.

Литература

1. Кимура, М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности. М. Мир, 1985.
2. Simmonds P. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. 146th Meeting of the Society for General Microbiology, 2000.
3. Ratner V.A., Zharkikh A.A., Kolchanov N.A. et al Molecular Evolution. Berlin: Springer-Verlag, 1996.
4. Yang Z. PAML: A Program Package for Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood. // Comput Appl Biosci, 1997, V. 13, 555–556.

Компьютерный анализ регуляции биосинтеза триптофана в геномах архей.

С. К. Гарушяни, Д.А. Равчеев

*факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова
E-mail: grushanka@nm.ru*

Археи представляют собой третью ветвь органического мира, отличную от эукариот и зубактерий. Однако, несмотря на свое биологическое значение, данная группа изучена относительно слабо.

Целью данной работы стало исследование регуляции синтеза триптофана в различных археобактериях, для чего были использованы различные методы сравнительной геномики. Исследование синтеза триптофана представляет особый интерес, так как данный метаболический путь является общим для архей и эубактерий.

Ранее подобное исследование проводилось для генома археобактерии *Methanobacter thermoautotrophicus*, где был идентифицирован ген предполагаемого регулятора биосинтеза триптофана и обнаружен потенциальный сигнал для данного фактора. Потенциальные сайты были найдены перед всеми генами синтеза триптофана из хоризмата, а также перед геном самого регуляторного белка [1].

На первом этапе исследования был произведен поиск ортологов гена белка-регулятора в полных геномах архей. Ортологи были обнаружены в 12 геномах археобактерий. Степень сходства регуляторных белков оказалась низка, и, следовательно, регуляторный сигнал мог измениться в ходе эволюции.

Характерный для *M. thermoautotrophicus* сигнал сохраняется лишь в геномах *Methanosarcina acetivorans* и *Methanosarcina mazei*, где он обнаруживается перед так называемым триптофановым опероном. Относительно *M. Thermoautotrophicus*, состав триптофанового оперона у представителей рода *Methanosarcina* не изменяется. Однако, последовательность генов внутри оперона уже иная.

Для архей *Archaeoglobus fulgidus* было показано слияние генов *trpC* и *trpD* в единый ген, тогда как у всех остальных исследованных данные гены располагаются отдельно.

В большинстве изученных геномов были обнаружены два гена для бета-субъединицы триптофансинтазы, *trpB1* и *trpB2*. Однако, определить, в результате какого эволюционного события сформировалась подобная картина, не представляется возможным.

Литература

1. Gelfand M.S., Koonin E.V., Mironov A.A. "Prediction of transcription regulatory sites in Archaea by a comparative genomic approach" // *Nucleic Acids Research*, 2000, 28, pp. 695–705.

Изучение эволюции регуляции транскрипции в близкородственных геномах на примере NadR регулона в *Enterobacteriaceae*²

А.В. Герасимова

Государственный научный центр ГосНИИ Генетика, Москва, 113545

E-mail: a_gerasimova@yahoo.com

За последние годы отсекументировано множество бактериальных геномов, что дает возможность изучать схожесть и различия ортологичных регулонов в близкородственных геномах. Целью настоящей работы было

² Работа выполнена под руководством М.С.Гельфанда. Мы благодарны Д.А.Родионову и Д.А.Равчееву за полезное обсуждение.

изучение эволюции регуляции транскрипции на относительно близких эволюционных расстояниях на примере NadR регулона.

Никотинадениндинуклеотида (НАД) — необходимый кофермент для всех живых систем, он сам и его производные выступают в биохимических окислительно-восстановительных реакциях как доноры, или акцепторы водорода [1]. Репрессор транскрипции NadR осуществляет регуляцию генов, кодирующих различные ферменты синтеза НАД.

NadR — мультифункциональный белок, на его N-конце находится ДНК-связывающийся домен, в середине никотинамид-мононуклеотид-адегилтрансферазный домен, а на C-конце — RNK домен [2, 3]. Множество экспериментальных работ было посвящено изучению NadR регулона в геномах *Escherichia coli* и *Salmonella typhi* [3].

При помощи различных методов сравнительной геномики мы описали NadR регулон в геномах еще семи энтеробактерий: *Shigella flexneri*, *Erwinia carotovora*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Photobacterium luminescens* и *Serratia marcescens*; обнаружили новые гены, которые могут быть членами регулона; предсказали авторегуляцию гена *nadR* в геномах *E. carotovora*, *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* и *S. marcescens*; и продемонстрировали, что даже простой регулон, отвечающий за стольнеобходимый метаболический путь, может быть существенно различным даже в очень близкородственных организмах.

Литература

1. Kurnasov O.V., Polanuyev B.M., Ananta S., Sloutsky R., Tam A., Gerdes S.Y., Osterman A.L. Ribosyl nicotinamide kinase domain of NadR protein: identification and implications in NAD biosynthesis // *Journal of Bacteriology*, 2003, 184. p. 6906–17.

2. Penfound T., Foster J.W. NAD-dependent DNA-binding activity of the bifunctional NadR regulator of *Salmonella typhimurium* // *Journal of Bacteriology*, 1999, 181. p. 648–55.

3. Foster J.W., Park Y.K., Penfound T., Fenger T., Spector M.P. Regulation of NAD metabolism in *Salmonella typhimurium*: molecular sequence analysis of the bifunctional *nadR* regulator and the *nadA-pnuC* operon // *Journal of Bacteriology*, 1990, 172. p. 4187–96.

Молекулярная динамика проникновения пептида в биомембрану под действием ударной нагрузки³

Д.Н. Голик

биологический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова

E-mail: Renzyme@nm.ru

В настоящее время актуальным является вопрос о направленной доставке биологически активных веществ (например, лекарств) внутрь клетки. В работе предлагается новый вариант осуществления направленной доставки.

³ Научные руководители работы профессор К.В.Шайтан и асп. Е.В. Турлей. Авторы признательны РФФИ (04-04-49645) и Роснауке за поддержку.

Рассчитана молекулярная модель «наношприца», который представляет собой углеродную нанотрубку из 600 атомов углерода диаметром 13,5 Å и длиной около 30 Å. В полость нанотрубки помещается альфа-спираль из 8 остатков аланина. Нанотрубка закрыта с одного конца. Срабатывание наношприца и выход пептида во внешнюю среду осуществляется в результате избыточного давления, образующегося за счет мономолекулярного распада сенсibilизатора, находящегося под крышечкой нанотрубки. Пептид с большой скоростью (порядка 1 Å/пс или 100 м/с) выбрасывается из нанотрубки.

Методом молекулярной динамики (программа «PUMA») проводилось сравнительное изучение выхода пептида в фосфолипидный бислой и в воду. Мембрана состояла из 64 молекул пальмитоилолеилфосфатидилхолина. Объем водной фазы в обоих случаях составлял 2594 молекул. В процессе выхода из нанотрубки пептид сначала частично разворачивается, затем происходит спирализация с характерным временем порядка 100 пикосекунд, причём в мембране процесс сворачивания идёт быстрее, возможно из-за структурирующего действия молекул липида.

Проводится также изучение энергетических и структурных параметров взаимодействия пептида с окружением при различных скоростях выталкивания.

Изучение взаимодействия моноклональных антител с рибосомальным белком L7/12 E.coli

Е.С. Гребнюк

биологический факультет МГУ им. Ломоносова

E-mail: greka-25@yandex.ru

Рибосома представляет собой сложную асимметричную рибонуклеопротеидную частицу, состоящую из рибосомных РНК (рРНК) и около 50 рибосомальных белков. Рибосомальные белки играют важную роль в поддержании структуры и функции рибосом. И хотя в настоящий момент достигнут огромный прогресс в понимании пространственной организации рибосом и механизмов биосинтеза белка в клетке, роль отдельных рибосомальных белков в этом процессе продолжает активно изучаться. Исследование взаимодействия SRP (signal recognition particle) комплекса с рибосомой и растущей новосинтезированной полипептидной цепью является одной из актуальных проблем белкового синтеза. В процессе сорбции рибосом на подложку участки, вовлеченные во взаимодействие с SRP, могут быть скрыты, что затрудняет исследования и интерпретацию полученных результатов. Это подтверждается предварительными данными по сорбции рибосом, полученными нами с помощью атомно-силовой микроскопии. Для правильной ориентации рибосом, при которой интересующий нас участок будет экспонирован в раствор, целесообразно использовать антитела к рибосомальному белку L7/12. Выбор данного бел-

ка определен тем, что L7/12 ассоциирован с рибосомальным участком, пространственно противоположным от места посадки SRP.

Целью данной работы было изучение взаимодействия антител с L7/12 белком. В ходе работы были получены моноклональные антитела к L7/12 двух специфичностей. С помощью иммуноферментного анализа было изучено взаимодействие антител с L7/12, сорбированным на плате и находящимся в растворе. Подбираются оптимальные условия для работы системы «L7/12-рибосома-SRP», такие как концентрации вносимых белков, буфера и др. Дальнейшее изучение взаимодействия SRP с рибосомой планируется проводить с помощью иммунохимического анализа и атомно-силовой микроскопией на подложках, предварительно обработанных антителами к L7/12.

Молекулярная систематика некоторых геофильных зонтичных⁴

Г.В. Дегтярева

факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова

E-mail: degavi@genebee.msu.su

Роды *Vunium* L., *Сonopodium* Koch и *Geocaryum* Cosson относятся к семейству Umbelliferae и подсемейству Apioidae. При выделении родов в этом подсемействе и изучении родственных связей между таксонами опираются главным образом на признаки строения плода. Роды *Vunium*, *Сonopodium* и *Geocaryum* имеют много общих морфологических черт. Эти многолетние травы с погруженным в почву клубнем. В горных областях Западного Средиземноморья эти роды часто произрастают вместе. Для видов родов *Сonopodium*, *Geocaryum* а также видов рода *Vunium*, произрастающих в западной части ареала, характерна такая интересная особенность, как наличие односемядольного зародыша. Большое сходство вегетативных органов создавало определенные трудности при разграничении этих родов. В работе Л.Энгстрэнда [1], посвященной данной проблеме, высказывается мнение о необходимости разделения этих трех родов на основе признаков поверхности плода и особенностей строения эндосперма. Чтобы оценить необходимость выделения этих родов и уточнить разграничительные признаки мы провели анализ нуклеотидных последовательностей участка ITS 1,2 ядерной рибосомальной ДНК. В анализ было включено 50 таксонов, из которых род *Vunium* представлен 10 видами, род *Сonopodium* — 4 видами и род *Geocaryum* — 1 видом. Филогенетические деревья строили методами ближайшего связывания, максимальной экономии и максимального правдоподобия. Топология древ, построенных тремя методами, в общих чертах не содержит противоречий. Виды родов *Vunium*, *Сonopodium* и *Geocaryum* самостоятельную кладу не формируют, что подтверждает необходимость разделения этих родов. Так, каждый из этих родов, объединяясь с некоторыми другими представителями подсемейства Apioidae, формирует самостоятельные высокопод-

⁴ Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 03-03-48831а, № 04-04-49737а и НШ № 1712.2003.4

держанные клады. По данным анализа род *Bunium* и *Conopodium* не представляют собой монофилетичные таксоны. Виды рода *Bunium* распадаются на две клады с высокими уровнями поддержки, что хорошо согласуется с морфологическими данными (одно- или двусемядольные проростки, основные числа хромосом). Интересно, что признак наличия одной сямьядоли у зародыша не коррелирует с какими-либо другими признаками, однако, следует заметить, что он особенно часто отличается для видов, имеющих клубневидно утолщенные гипокотиль и базальную часть корня. Скорее всего, этот признак возникал независимо в разных родственных группах.

Литература

1. Engstrand L. Generic Delimitation of *Bunium*, *Conopodium* and *Geocaryum* (Umbelliferae) // Bot. Notiser, 1973, Vol. 126. P. 146–154.

Положительный отбор в альтернативных областях генов человека.

Е.О. Ермакова, М.С. Гельфанд

*факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова
E-mail: ermakova8@yandex.ru*

Альтернативный сплайсинг — один из основных механизмов создания разнообразия протеома эукариот. Более половины альтернативно сплайсируемых генов человека и мыши имеют негомологичные альтернативные фрагменты [1]. Один альтернативно сплайсируемый ген кодирует несколько белков, имеющих общие структурные фрагменты. Эти белки могут выполнять как различные функции, так и одну и ту же функцию, но в различных условиях — экспрессироваться в определённых тканях, на отдельных стадиях развития организма. Так как именно альтернативные участки пре-мРНК, то есть участки, которые могут как удаляться, так и сохраняться при процессинге, ответственны за специфичность белковых изоформ, естественно ожидать, что соответствующие им участки хромосом эволюционируют иначе, чем соответствующие постоянным, то есть всегда присутствующим в процессированной мРНК, участкам. В частности, можно предположить, что нуклеотидные замены, порождающие аминокислотные замены в белке, будут быстрее накапливаться в альтернативных участках.

Мы проанализировали 3135 альтернативно сплайсируемых генов человека и их мышинных ортологов. Выравнивания мРНК человека и мыши были взяты из [2], человеческие белковые изоформы — из базы EDAS (<http://www.ig-msk.ru:8005/EDAS/>). Количество нуклеотидных замен в синонимичных и несинонимичных позициях кодирующих областей генов было вычислено методом Ины [3]. Оказалось, что, при одинаковом уровне синонимичных замен, уровень несинонимичных замен в альтернативных областях генов выше, чем в постоянных. Это позволяет предположить наличие положительного отбора в альтернативных областях генов. Более того, мы рассмотрели отдельно N-концевые, внутренние и C-

концевые альтернативные участки. Оказалось, что уровень нуклеотидных замен в С-концевых альтернативных участках значительно выше, чем в других участках кодирующих областей генов. Таким образом, давление отбора на эти участки генов ослаблено. Это подтверждает, что сценарии эволюции альтернативных и постоянных участков генов различны, и положительный отбор играет определяющую роль в эволюции альтернативного сплайсинга.

Литература

1. Nurtdinov R.N., Artamonova I.I., Mironov A.A., Gelfand M.S. Low conservation of alternative splicing patterns in the human and mouse genomes // *Human Molecular Genetics*, 2003, V.12, №11. p.1313–1320.
2. Jordan I.K., Kondrashov F.A., Rogozin I.B., Tatusov R.L., Wolf Y.I., Koonin E.V. “Constant relative rate of protein evolution and detection of functional diversification among bacterial, archaeal and eukaryotic proteins” // *Genome Biology*, 2001, V.2, №12.
3. Ina Y. New methods for estimating the numbers of synonymous and non-synonymous substitutions // *Journal of Molecular Evolution*, 1995, V.40, № 2. p.190–226.

Анализ аминокислотных остатков, определяющих различия в функциональной специфичности белков семейства гуанилат- и аденилатциклаз с помощью метода SDPpred

О.В. Калинина, О. Н. Коборова, А.Б. Рахманинова

*факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова
E-mail: okoborova@yandex.ru*

Существуют большие белковые семейства, которые состоят из белков, имеющих одну и ту же общую биохимическую функцию, но часто разную специфичность к лиганду - они взаимодействуют с похожими, но разными малыми молекулами, участками ДНК или белками. В группе, в которой была выполнена данная работа, был разработан метод SDPpred [1], с помощью которого можно предсказать аминокислотные остатки, отвечающие за эти различия в функциональной специфичности.

В настоящей работе возможности метода SDPpred были исследованы на примере семейства аденилат- и гуанилатциклаз. Белки семейства являются ферментами, синтезирующими циклические нуклеотиды из нуклеозидтрифосфатов. Аденилатциклазы катализируют синтез цАМФ из АТФ, гуанилатциклазы — цГМФ из ГТФ. цАМФ и цГМФ играют роль вторичных посредников во внутриклеточных процессах. Таким образом, изучаемые ферменты играют ключевую роль в сигнальных каскадах клетки.

Методом SDPpred для семейства Pfam (PF00211) “Adenylate and guanylate cyclase catalytic domain” предсказан набор из шести специфичность детерминирующих позиций (СДП) - 890Ala, 938Lys, 1016Gln, 1018Asp, 1019Ile, 1020Trp (нумерация по аденилатциклазе типа II из *R. norvegicus*, ADCY2_RAT). Этот набор хорошо согласуется с ранее опубли-

ликованными вычислительными, экспериментальными и структурными данными [3,4,5].

Более того, метод позволил разобраться в сложном случае циклаз из *Dictyostelium discoideum* и некоторых ресничных. Эти белки не входили в обучающую выборку, их специфичность не может быть предсказана по гомологии, а экспериментальные данные есть только для 10 белков из 22. Для 10 белков специфичность, предсказанная на основе анализа СДП, совпадает с экспериментально определенной [6]. Для 8 из оставшихся белков специфичность была предсказана *de novo*. Была также предсказана аденилатциклазная активность 23 до настоящего времени плохо аннотированных циклаз из *Treponema*, *Stigmatella*, а также некоторых видов микобактерий и цианобактерий.

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.
2. Hannenhalli S. Shidhar and Russel B. Robert (2000) Analysis and prediction of functional sub-types from protein sequence alignments. *J. Mol. Biol.*, 303: 61–76.
3. Liu Yu, Ruoho E. Arnold, Rao D. Vibha, and Hurley H. James (1997) Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 13414–13419.
4. Tang Wei-Jen, Hurley H. James (1998) Catalytic mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclases. *Molecular pharmacology*, 54: 231–240.
5. Sunahara K. Roger, Beuve Annie, Tesmer J.G. John, Sprang R. Stephen, Garbers L. David, and Gilman G. Alfred (1998) Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(26): 16332–16338.
6. Linder U. Jürgen, Engel Peter, Reimer Andreas, Krüger Thomas, Plattner Helmut, Shultz Anita and Shultz E. Joachim. (1999) Guanylyl cyclases with the topology of mammalian adenylyl cyclases and an N-terminal P-type ATPase-like domain in *Paramecium*, *Tetrahymena* and *Plasmodium*. *The EMBO Journal*, 18(15): 4222–4232.

Исследование дрожжевых геномов с использованием множественных выравниваний

Г.Ю. Ковалева, Е.А. Базыкин, М. Брудно, М.С. Гельфанд
учебно-научный центр «Биоинформатика» ИППИ РАН,
факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова
E-mail: kovaleva@iitp.ru

Мы исследовали уровни консервативности сайтов связывания транскрипционных регуляторов двух метаболических путей — биосинтеза лейцина и метионина в пяти геномах дрожжей. Оба пути контролируются гло-

бальным регулятором биосинтеза аминокислот, Gcn4p, и регуляторами, специфичными для индивидуальных метаболических путей. Мы показали, что уровни консервативности экспериментальных и сильных предсказанных сайтов сходны. Оказалось, что даже в ближайших геномах наиболее сильные сайты не всегда строго консервативны, как считалось ранее.

Сравнительный анализ регуляции позволил нам предсказать потенциальный переносчик альфа-изопропилмалата (α -IPM), интермедиата биосинтеза лейцина, который транспортирует α -IPM из митохондрий в цитозоль [1]. Предсказание основано на строгой консервативности предсказанного сайта связывания регулятора Leu3p, анализе ближайших гомологов предсказанного транспортера, а также на предсказании субклеточной локализации данного белка и анализе экспрессионных данных [2].

Используя множественные полногеномные выравнивания семи геномов рода *Saccharomyces*, мы исследовали уровни консервативности в 5'- и 3'-нетранслируемых областях (5'-UTR и 3'-UTR, соответственно) и уровни консервативности всех сайтов связывания транскрипционных регуляторов из базы данных CGSIGMA. Как ожидалось, уровень консервативности сайтов связывания был гораздо выше, чем в окружающих областях, причем район повышенной консервативности включал в себя не только сами сайты, но и близлежащие области, в целом занимая приблизительно 100 п.н. Возможное объяснение этого факта состоит в том, что рядом с известными сайтами располагаются сайты связывания других транскрипционных регуляторов, что может обеспечивать кооперативность их связывания.

Анализ консервативности 5'-UTR выявил, помимо резкого повышения консервативности непосредственно перед стартовым кодоном (отмеченного ранее в работе Shabalina et al. [2]), также заметное падение консервативности до этого пика, которому предшествует плавный подъем области 200 п.н. от стартового кодона.

Исследование 3'-UTR выявило резкое падение консервативности в непосредственной близости от стоп-кодона (что подтвердило данные Shabalina et al.), после чего, примерно в 30 п.н. от стоп-кодона начинается рост консервативности, достигающий максимума примерно в 50-70 п.н. от стоп-кодона, с последующим спадом к исходному значению в области 200 п.н. от стоп-кодона. Не исключено, что повышенная консервативность в 3'-UTR является признаком новых, до сих пор не изученных, функциональных механизмов.

Литература

1. Kohlhaw G.B. Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the back door // *Microbiol Mol Biol Rev.*, 2003, vol. 67, pp 1-15.
2. Lee T.I., Rinaldi N.J., Robert F., Odom D.T. et al. Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae* // *Science*, 2002, vol. 298, pp 799-804.
3. Shabalina S.A., Ogurtsov A.Y., Rogozin I.B., Koonin E.V., Lipman D.J. Comparative analysis of orthologous eukaryotic mRNAs: potential hidden functional signals // *Nucleic Acids Res.*, 2004, vol. 32, pp 1774-1782.

Определение родственных отношений типов двусторонне-симметричных животных (Bilateria) по последовательностям 10 белков***А.В. Константинова****факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им.М.В.Ломоносова**E-mail: Mysh-n@yandex.ru*

Как известно, родственные отношения большинства типов беспозвоночных до сих пор остаются неопределенными. Сравнительная анатомия и эмбриология позволяют сформулировать несколько альтернативных гипотез, выбор между которыми, в их рамках, остается не ясным. Филогенетический анализ на основе независимых молекулярных данных проводился до недавних пор по результатам сопоставления отдельных генов, главным образом 18S рибосомальной РНК.

Цель проведенной работы — выявить филогенетические взаимосвязи ряда типов двусторонне-симметричных животных на основе новых генетических данных.

Задачи: исследовать гомологичные гены представителей выбранных таксонов, выявить закономерности в топологии деревьев, сконструированных по отдельным генам и по объединенным данным.

Из электронных баз данных отобрали 10 групп ортологичных последовательностей для представителей Chordata, Cnidaria, Stenophora, Mollusca, Arthropoda, Nematoda, Platyhelminthes, а также грибов и высших растений — представителей внешней группы. Филогенетический анализ проводили на двух таксономических наборах, первый включал 10 видов, второй — 14. Полученные аминокислотные последовательности выравнены по каждому гену в отдельности. Их использовали для построения деревьев. Кроме того, в ходе работы все полученные выравнивания были соединены вместе (путем “склеивания” последовательностей всех генов). Такие комбинированные данные также были подвергнуты филогенетическому анализу. Построение деревьев проводили различными методами: методом связывания ближайших соседей, методом максимальной экономии и методом максимального правдоподобия.

Полученные результаты. Большинство полученных разными методами деревьев как для первого, так и для второго набора видов, проявляли сходство в топологии и статистической поддержке отдельных узлов. В меньшей степени это справедливо для деревьев, построенных по отдельным генам. В целом анализ отдельных генов не дал определенного разрешения неоднозначных точек ветвления филогенетических деревьев, что может быть связано с небольшой длиной индивидуальных генов. В большинстве консенсусных деревьев и деревьев, построенных по объединенным данным для второго набора (14 видов), хорошую поддержку получают традиционные группировки членистоногих и круглых червей. Объединенные данные анализа генов 10 видов также подтверждают классические гипотезы, т.к. представитель Cnidaria на полученном древе ближе к Bilateria, чем тип Stenophora, ветвь которого обособляется ранее других (среди представленных) животных. Интересно, что при включе-

нии в анализ представителей типов моллюсков и плоских червей (анализ 14 видов) практически во всех деревьях они объединялись в единую группу с высокой степенью поддержки — бутстреп. Это свидетельствует в пользу того, что плоские черви — потомки целомических животных, а не ветвь древних примитивных многоклеточных.

**Полифункционализованные хиральные SH-реагенты для
количественного определения энантиомеров аминосоединений методом
ВЭЖХ**

*П.А.Кудрявцев, Н.В.Лапин, М.С.Баранов, М.А.Улановская, Р.С.Алексеев
факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова,
химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова*

Новые полифункционализованные хиральные тиолы — N-ацильные производные цистеина и глутатиона, синтезированы хемоэнзиматическим методом, основанном на хемо- и энантиоселективном ацилировании, катализируемом пенициллинацилазой в водной среде. Биокаталитическое превращение в мягких условиях протекает очень быстро, без образования побочных продуктов и с высоким выходом (82 — 95%). Полученные тиолы использовали для определения энантиомеров первичных аминосоединений методом обращеннофазовой ВЭЖХ с предколоночной модификацией о-фталевым альдегидом. Образующиеся в результате модификации два стереоизомерных изоиндола анализировали методом обращеннофазовой ВЭЖХ на колонке C18. При модификации NAC хроматография образующихся изоиндолов характеризуется низкой диастереоселективностью и удовлетворительного разделения диастереоизомеров удается достичь лишь в случае аминокислот и некоторых аминокислот. Применение новых полифункционализованных тиолов позволяет улучшить хроматографический анализ стереоизомеров аминокислот и впервые провести эффективный энантиомерный анализ нефункционализованных первичных аминов. Определены условия количественной модификации аминосоединений. Метод успешно использовали для определения абсолютной концентрации отдельных энантиомеров аминокислот и первичных аминов в многокомпонентных смесях и в ходе стереоселективных ферментативных реакций.

Ингибирование цитохром с оксидазы ионами цинка.**С.С. Кузнецова, Н.В. Ацаркина, А.А. Константинов***факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова,
научно-исследовательский институт физико-химической биологии**им. А.Н.Белозерского**МГУ им. М.В. Ломоносова**E-mail: sofakuznetsova@newmail.ru; azarkina@genebee.msu.ru;**konst@genebee.msu.ru*

Исследование механизма трансмембранного переноса протонов комплексами дыхательной цепи — одна из центральных задач современной биоэнергетики. Один из подходов к ее изучению — использование специфических ингибиторов протонных насосов [1,2]. Мы исследовали ингибирование солибилизированной и встроенной в липосомы ЦО митохондрий бычьего сердца ионами Zn^{2+} . Обнаружена двухфазность ингибирования. Начальная, быстрая фаза ($K_i \sim 10^{-5}$ М), наблюдаемая при взаимодействии Zn^{2+} с участком на Р- стороне мембраны, полностью обратима ЭДТА и дает частичное снижение активности (до 50 — 90% в зависимости от препарата). Она развивается за время смешивания. Предположительно, Zn^{2+} блокирует вход в один из протонпроводящих каналов (D-канал). Следующая, медленная фаза, развивается десятки минут-часы. Она практически необратима, а скорость ингибирования в этом случае пропорциональна концентрации Zn^{2+} . Zn^{2+} не изменял активность ЦО в составе разобщенных протеолипосом, что соответствовало результатам [3]. Ингибирование снова появлялось при добавлении к протеолипосомам аламетицина, способствующего проникновению сквозь мембрану низкомолекулярных веществ (в том числе Zn^{2+}). Инкубация с цинком полностью окисленного фермента не вызывала ингибирования. В то же время, мы наблюдали медленное действие цинка на работающий фермент в составе разобщенных протеолипосом, подобный описанному ранее группой Николса [4]. Медленное действие Zn^{2+} также появлялось в случае инкубации Zn^{2+} с ЦО в присутствии слабых восстановителей. Таким образом, можно предположить наличие в ЦО по меньшей мере двухцинк-связывающих участков. Один, по-видимому, располагается у входа в протонпроводящий канал и ответственен за быстрое ингибирование фермента. Второй, вероятно, расположен вблизи или на наружной поверхности мембраны и становится доступным только в работающей ЦО или в присутствии слабых восстановителей (т.е. у одной из форм частично восстановленной ЦО, образующейся также в ходе каталитического цикла). Кроме того, было обнаружено, что быстрая фаза ингибирования солибилизированной ЦО может не наблюдаться при использовании некоторых доноров электронов (ТМФД, ДАД). Медленная же фаза наблюдалась в случае всех исследованных доноров (цитохром с, ТМФД, ДАД, ДХФИФ и гексааммиакат рутения).

Литература

1. Axelrod H.L. et al Determination of the binding sites of the proton transfer inhibitors Cd^{2+} and Zn^{2+} in bacterial reaction centers // PNAS, 2000, V 97, № 4, p. 1542–1547.
2. Paddock M.L. et al. Identification of the proton pathway in bacterial reaction centers: inhibition of proton transfer by binding of Zn^{2+} or Cd^{2+} // PNAS, 1999, V 96, № 11, p. 6183–6188.
3. Mills D.A. et al. “Membrane potential-controlled inhibition of cytochrome c oxidase by zinc.” // J. Biol. Chem, 2002, V 277, p. 14894–14901.
4. Nicholls P., Singh A.P. “Effect of zinc on proteoliposomal cytochrome oxidase.” // Biochem (Life Sci. Adv.), V 7, p. 321–326.

Молекулярная динамика грамицидинового канала в модели фосфолипидного бислоя ПОФХ⁵

О.В. Левцова

биологический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова

E-mail: sunely@yandex.ru

Грамицидин А является пентадекапептидом и представляет интерес и как антибиотик, и как модель для изучения пептид-мембранных взаимодействий. Наиболее изученными являются две конформации канала, образуемого молекулами грамицидина в мембране: двойная спираль и спиральный димер.

Методом молекулярной динамики был проведен анализ динамического поведения модели бислоя из 64 пальмитоилолеиновых липидов. Расчет траекторий проводился с помощью пакета Gromacs 3.1.4 методом ланжевеновской динамики. Варьировались давление баростата, толщина бислоя и площадь, приходящаяся на один липид. Система приводилась к экспериментальной поверхностной плотности липидов.

В бислое встраивался катион проводящий канал, состоящий из двух молекул грамицидина А в конформации спирального димера. Размер канала составляет 25Å и меньше толщины бислоя (порядка 38Å). При встраивании канала происходит деформация бислоя, которая, возможно, способствует кластеризации каналов в природных биомембранах.

В работе исследуется динамика молекул воды внутри канала. Особый интерес представляет механизм селекции и динамика прохождения протона и др. катионов через канал, а также внутренние сайты связывания ионов. Проводится сравнительное изучение различных конформаций канала в бислое.

⁵ Научный руководитель работы профессор К.В.Шайтан. Авторы признательны РФФИ (04-04-49645) и Роснауке (01.106.11.0001, 01.165.11.0001) за поддержку.

Динамики прохождения ионов и гидратированных комплексов сквозь мембрану гетеромерного ацетилхолинового рецептора, состоящего из ТМ2 фрагментов*Ли Аньбан⁶**биологический факультет МГУ им. Ломоносова,**E-mail: anbang@moldyn.org*

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы состоят из пяти субъединиц, содержащий четырьмя α -спиральями. Трансмембранные домены ТМ1-ТМ4 каждой из α -спиралей формируют ионный канал. Центральная часть канала, собственно пора образуется из ТМ2-фрагментов, обеспечивает функциональную активность рецептора.

В 2003 году получена трёхмерная структура пора ацетилхолинового рецептора (PDB ID: 1OED)^[1]. В этой структуре внутрь канала обращены два незаряженных кольца, образованных боковыми радикалами остатков LEU (α -251) и VAL (α -255) соответственно. Согласно результатам исследований мутагенных форм рецептора, именно эти остатки играют важную роль в проводимости канала ^[2].

В данной работе был применён метод молекулярной динамики^[3], с включенной постоянно действующей силой 1 ккал/(моль·Å), приложенной к проходящему иону или комплексу. Изучалась динамика прохождения следующих атомов и ионов: Na, Na⁺, Cl, Cl⁻, а также гидратированных комплексов. В результате исследований было выявлено три типа поведения при прохождении сквозь канал: незаряженные ионы свободно проходят через канал, незаряженные комплексы останоятся в узкой части канала, а заряженные ионыи комплексы притягиваются к заряженным атомам внутри канала. Сквозь канал полностью проходят только незаряженные ионы Na и Cl. Для них были получены следующие коэффициенты диффузии: Na – $2.05 \cdot 10^{-5}$; Cl – $1.45 \cdot 10^{-5}$. Влияние на прохождение ионов оказывают незаряженные кольца из боковых радикалов остатков LEU (α -251) и VAL (α -255). Заряженные ионы и комплексы не могут проходить близко к гидрофобным неполярным остаткам, находящимся в средней и верхней частях канала. Остатки SER вверху канала (α -266 и α -269) играют роль в притяжении отрицательных ионов и комплексов.

Литература

1. Miyazawa et al. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore // Nature (2003), 423, 949–955
2. Labarca, C. et al. Channel gating governed symmetrically by conserved leucine residues in the M2 domain of nicotinic receptors // Nature 376, 514–516 (1995).
3. KB Egorova, et al. Molecular Dynamics of Strained Retinal in Various Electronic States // IJQC (2004), 94, 219–225

⁶ Научный руководитель работы профессор К.В.Шайтан. Автор признателен РФФИ (04-04-49645) и Роснауке (01.106.11.0001, 01.165.11.0001) за поддержку

Роль водородных связей в процессе электронного транспорта в белках*П.А. Мамонов**МГУ им. М.В. Ломоносова**E-mail: pmatonov@mail.ru*

Современные методы квантово-химического моделирования молекулярных процессов являются одним из основных инструментов теоретической биофизики, позволяющих выделить ключевые элементы структуры биомакромолекул, ответственные за их функционирование.

В настоящей работе методами вычислительной квантовой механики мы исследовали энергетику процесса электронного переноса в реакции рекомбинации между фотоокисленным димером бактериохлорофилла и восстановленным первичным хиноном в фотосинтетическом реакционном центре *Rhodobacter sphaeroides*: $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$

Известно, что при переносе электрона в этой реакции рекомбинация осуществляется прямым туннелированием электрона с первичного хинона на основной уровень димера. Если исходить из того, что электрон с первичного хинона переносится непосредственно на димер, то возникает вопрос о механизме компенсации энергии порядка 0,5 эВ.

В данной работе мы рассматриваем механизм, обуславливающий энергетический баланс в реакции рекомбинации, связанный с перестройкой в системе водородных связей, образуемых первичным хиноном с ближайшим окружением. Суть обсуждаемого механизма состоит в следующем: первичный хинон в составе реакционного центра образует две водородные связи с окружающими аминокислотами (с гистидином His^{M219} и пептидной связью между остатками аспарагина Asn^{M259} и аланина Ala^{M260}). Когда хинон находится в окисленной форме протоны обеих водородных связей локализуются вблизи атомов азота гистидина и пептидной связи соответственно. В результате одноэлектронного восстановления хинона на поверхности потенциальной энергии системы появляются минимумы, соответствующие смещенным положениям протонов уже вблизи соответствующих атомов кислорода первичного хинона. Расчеты (вертикальной) энергии реакции $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ показали значительное ее уменьшение в геометриях со смещенными протонами (один из протонов смещен к соответствующему атому кислорода первичного хинона) по сравнению с энергией посчитаной в геометрии с не смещенными протонами.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что описанные перестройки водородных связей, образуемых первичным хиноном с ближайшим окружением могут играть роль механизма, ответственного за компенсацию энергии в реакции рекомбинации между фотоокисленным димером бактериохлорофилла и восстановленным первичным хиноном в фотосинтетическом реакционном центре *Rhodobacter sphaeroides*.

Лидерная последовательность гена алкогольдегидрогеназы кукурузы является сайтом внутренней инициации трансляции и обеспечивает эффективную трансляцию мРНК в условиях гипоксии

Евгения Сергеевна Мищенко

МГУ им. М.В. Ломоносова

E-mail: jenchik_m@mail.ru

Целью работы являлось изучение роли лидерных нетранслируемых последовательностей мРНК в регуляции экспрессии генов в стрессовых условиях на примере лидерной последовательности гена алкогольдегидрогеназы кукурузы (*adh1*) в условиях гипоксии. Низкая эффективность экспрессии большинства клеточных белков в этих условиях связана с низкой эффективностью трансляции. Одним из примеров гена, мРНК которого эффективно транслируется в условиях гипоксии, является ген алкогольдегидрогеназы кукурузы (*adh1*). Эффективная трансляция в этих условиях обусловлена как 5' UTR, так и 3' UTR районами мРНК, а также небольшим участком, непосредственно следующим за стартовым кодоном, однако, 5' UTR элемент обеспечивает уровень трансляции, сопоставимый с аэробными условиями.

Вместе с тем вопрос о том, может ли 5' UTR гена *adh1* (далее *adh*) функционировать не только в клетках кукурузы, но и в других растениях (и насколько эффективно), оставался открытым. Мы сконструировали репортерные конструкции, содержащие каскеты экспрессии 35S промотор – 5' UTR – GFP- nosT, и, проведя эксперименты по транзientной экспрессии их в клетках *Nicotiana benthamiana*, установили, что присутствие *adh* в качестве 5' UTR обеспечивало уровень экспрессии GFP в условиях гипоксии, сопоставимый с уровнем экспрессии в аэробных условиях. В то же время, в отсутствие *adh* уровень экспрессии снижался более чем в 5 раз. Полученные результаты свидетельствуют о том, что 5' UTR район *adh1* может обеспечивать эффективную трансляцию мРНК в условиях гипоксии в гетерологичной системе, клетках табака.

Вопрос о том, за счет чего лидерная последовательность *adh* обеспечивает эффективную экспрессию целевого гена, оставался открытым. Была выдвинута гипотеза о том, что эта последовательность обеспечивает внутреннюю инициацию трансляции, одинаково эффективную в нормальных и стрессовых условиях. Это предположение было подтверждено в экспериментах по экспрессии бицистронных конструкций, содержащих *adh* между двумя репортерными генами. Полученные результаты свидетельствуют о том, что внутренняя инициация трансляции может являться одним из механизмов, обеспечивающих эффективную трансляцию определенных генов в стрессовых условиях.

Интроны гена рибосомального белка S5 как филогенетические маркеры*Михаил Александрович Никитин**МГУ им. М.В. Ломоносова**E-mail: misha-nik@mail.ru*

Быстрое развитие геномики в последние годы открыло возможность сравнения организации генетического материала среди организмов совершенно разного систематического положения. Эти результаты используются множеством способов, включая широкомасштабное сравнение гомологичных генов для целей реконструкции филогении. Одной из самых интересных филогенетических проблем является происхождение многоклеточных животных (Metazoa) и ранние стадии их эволюции. С конца XIX столетия существует множество противоречивых гипотез об эволюции плана строения животных и отношениях между базальными группами: двустороннесимметричными животными (Bilateria), кишечнополостными (Cnidaria), гребневиками (Stenophora), губками (Porifera) и *Trichoplax* (Placozoa). Мы провели сравнение генов rpS5 из общедоступных баз данных (GenBank) и нашли четкие отличия в расположении интронов между Bilateria, с одной стороны, и грибами, растениями и одноклеточными с другой стороны. Для Bilateria характерны 3 интрона в специфических позициях (106, 152 и 185 по нумерации позиций человека), общих на дистанции от червей до млекопитающих. Высшие грибы имеют один интрон в 99 позиции, у однодольных растений есть интроны в позициях 118 и 189. Дрожжевые грибы и простейшие не имеют интронов в гене rpS5. Из этих отличий можно видеть, что структура гена rpS5 значительно изменилась на ранних стадиях эволюции животных. Это дает нам надежду обнаружить промежуточные структуры гена rpS5 среди низших животных и использовать его как филогенетический инструмент для исследования отношений между низшими Metazoa.

Мы выровняли известные последовательности rpS5 из GenBank, нашли консервативные сайты и разработали праймеры, комплементарные этим сайтам. Эти праймеры были затем использованы для амплификации фрагментов геномной ДНК из 9 представителей всех 4 групп низших животных, включая самого просто устроенного представителя многоклеточных животных, *Trichoplax*, а также 3 представителей внешних по отношению к животным групп. Амплифицированные фрагменты были затем очищены и секвенированы. Интрон-экзонная структура изученных генов rpS5 низших животных сильно отличается от таковой Bilateria. Stenophora и Porifera не имеют интронов в этом гене, подобно простейшим и дрожжевым грибам. *Trichoplax* обладает 2 интронами из этих 3, и те же 2 интрона в позициях 106 и 185 обнаруживаются и во всех 3 частичных последовательностях кишечнополостных. За пределами животных интроны в гене rpS5 либо отсутствуют совсем, как у дрожжей и простейших, либо встречаются в других позициях, как у высших грибов и наземных растений. Набор интронов в позициях 118 и 189, уже известный для однодольных растений, был обнаружен также и у двудольного растения *Ofaiston*

monandrum. Также нами был обнаружен новый вариант расположения интронов в гене *gpS5* – у криптофитовой водоросли *Goniomonas pacificas* в позициях 111 и 160. Показательно, что изученный нами жгутиконосец *Sphaeraeca volvox*, представитель Choanoflagellata – самой близкой к животным группы простейших – не имеет интронов в гене *gpS5*. Все обнаруженные интроны относятся к группе II, фланкированы каноническими динуклеотидами и расположены между кодирующими триплетами. Таким образом, новые молекулярные маркеры – специфические интроны гена *gpS5*, гомологичные интронам Bilateria – подтверждают близкие отношения *Trichoplax*, Cnidaria и Bilateria, а уникальная морфологическая простота *Trichoplax*, по-видимому, является результатом вторичного упрощения и его нельзя более считать живой моделью первичных многоклеточных животных.

Компьютерный анализ потенциальных сайтов фосфорилирования и гликозилирования РНК-полимеразы III человека⁷

Т.В. Никитина, Л.И. Тищенко

Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

E-mail: tanik@tn3532.spb.edu

РНК-полимераза III считывает гены стабильных нетранслируемых клеточных РНК, таких как 5S рРНК, тРНК, U6 мяРНК, 7SK РНК, 7SL РНК, Alu-РНК и других (гены класса III). Долгое время считалось, что транскрипция генов класса III происходит конститутивно и практически не подвержена регуляции. Однако в последние годы были получены данные, свидетельствующие, что транскрипция, осуществляемая РНК-полимеразой III, находится в клетке под строгим контролем множества регуляторных путей, и РНК-продукты РНК-полимеразы III играют значительную роль в таких важных процессах в клетке, как рост, пролиферация и дифференцировка. Очевидно, одним из важнейших путей изменения количества продуктов генов класса III является регуляция транскрипционной активности РНК-полимеразы III. Имеющиеся в литературе данные позволяют предположить, что в этой регуляции участвуют протеинкиназы и протеинфосфатазы, которые могут осуществлять модификации полимеразы. Однако сайты фосфорилирования РНК-полимеразы III, роль этих модификаций, а во многих случаях и протеинкиназы, их осуществляющие, изучены плохо.

До сих пор отсутствуют прямые данные о модификациях субъединиц РНК-полимеразы III человека. Отчасти это объясняется тем фактом, что этот фермент является самым сложно устроенным из всех РНК-полимераз – в его состав входит 17 субъединиц. Поэтому полный субъединичный состав этой полимеразы из клеток человека и первичная структура всех ее субъединиц были выяснены лишь недавно. Появление этих данных позволило поставить задачу об исследовании принципиальной воз-

⁷ Работа поддержана грантами "Университеты России" ур.07.01.033 и ур.07.01.334

возможности модификации субъединиц РНК-полимеразы III человека. С помощью компьютерных программ, осуществляющих поиск потенциальных сайтов посттрансляционных модификаций белков (MotifScan [1], NetPhos 2.0 [2] и YinOYang 1.2 [3]), в составе всех 17 субъединиц РНК-полимеразы III человека нами идентифицированы возможные сайты фосфорилирования и в составе 13 субъединиц – сайты реципрокного фосфорилирования и гликозилирования (сайты «инь-янь»). Из идентифицированных сайтов консервативными для человека, *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe* являются 17 сайтов фосфорилирования в составе 7 субъединиц, из них 2 сайта в составе двух субъединиц являются также и сайтами «инь-янь».

Литература

1. http://scansite.mit.edu/motifscan_id.phtml
2. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>
3. <http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>

Исследование роли положительного заряда в связывании субстрата пенициллинацилазой *in vitro* и *in silico* дизайн электростатических взаимодействий⁸

И.Г.Халиуллин¹, Ф.Н.Новиков¹, Г.Г.Чиров², М.И.Юшко², В.К.Швядас^{1,2}

¹ Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. Ломоносова,

² НИИ Физико-Химической Биологии МГУ им. Ломоносова

Предыдущие исследования пенициллин G ацилазы (PGA) из *E.coli* подняли спорный вопрос о роли двух остатков активного центра — aR145 и bR263 в связывании отрицательно заряженных субстратов. Участие положительного заряженного остатка в связывании субстрата PGA было переоценено в текущем исследовании *in vitro* и *in silico* в приближении электростатических взаимодействий: положительный заряд аргинина был исключен (aR145L мутацией), а отрицательный заряд субстрата был удален путем использования метилового эфира (PGM). Кинетические исследования показали потерю сродства на 0.9 ккал/моль в случае aR145L мутанта и 0.7 ккал/моль в случае эфира. Эти потери, являющиеся относительно небольшими по сравнению с энергией связывания PG (7.5 ккал/моль), указали, что электростатическое взаимодействие с aR145 не было доминирующим в формировании комплекса Михаэлиса. Однако, определенное ухудшение связывания пеницилина нуждается в более однозначной интерпретации на молекулярном уровне. Для получения такого объяснения фермент и модифицированный субстрат были смоделированы *in silico* посредством молекулярного докинга и молекулярной динамики. Молекулярно-динамические исследования пенициллина, связанного с нативным ферментом или с aR145L мутантом показали, что карбоксильная группа пенициллина была размещена ближе к bR263 со средним расстоянием по траектории менее 4Å. Карбоксильная

⁸ Работа была поддержана грантом РФФИ 03-04-48472.

группа была связана водородной связью с амидом основной цепи аспарагина bN388 — непосредственным пространственным соседом bR263. Это специфическое взаимодействие сохранилось при aR145L мутации. В то же самое время, уменьшение связывания пенициллина интерпретировалось как ослабление контакта фермента с субстратом. При мутации плохо структурированный участок a143-a146, подвергся конформационному переходу от так называемой закрытой в открытую конформацию, в которой боковая цепь остатка a145 стала доступна растворителю и потеряла контакты с субстратом. Подобная картина имела место при связывании пенициллина. Субстрат формирует водородные связи с амидом основной цепи bN388, однако, из-за частичной потери заряда, сила специфического взаимодействия уменьшалась. Таким образом текущие исследования позволяют сделать предположения, что aR145 остаток играет в основном структурную роль в поддержании компактной структуры активного участка, в то время как bR263, более вероятно, участвует в электростатическом связывании отрицательно заряженных оснований таких как пенициллин G.

Молекулярная динамика сверхпроникающего пептида HIV-TAT⁹

И.А. Оршанский

биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

Строение и происхождение сверхпроникающих пептидов (Cell Penetrating Peptides, в дальнейшем CPP), открытых в конце 20 века, весьма разнообразно. Некоторые, например TAT, представляют собой часть вирусного белка, другие (Anpr) — часть фактора роста. Существуют также искусственно синтезированные пептиды (транспорган, MAP), но всех их объединяет способность проникать через клеточные мембраны без специальных каналов и переносчиков. Строение и физико-химические свойства этих пептидов достаточно хорошо изучены, но механизм проникновения до сих пор не известен.

Первым открытым и наиболее детально исследованным является TAT — пептид, состоящий из 11 аминокислот. В его состав входит много положительно заряженных аминокислот (ARG и LYS), что обеспечивает достаточно жесткую пространственную структуру. Показано, что TAT с хорошей скоростью проходит через мембрану и способен переносить на С-конце относительно небольшие молекулы (радиоактивные и флуоресцентные метки). Обсуждается два механизма проникновения в клетку: либо он «протыкает» мембрану наподобие стержня, либо — «продавливает» липидный бислой и проникает внутрь в виде фагосом. Для уточнения возможного механизма проводился молекулярно динамический эксперимент.

Использовался полностью гидратированный фосфолипидный бислой пальмитоолеилофосфатидилхолина (POPC). Толщина слоя воды составляла 2 нм. В верхний слой воды был встроены TAT в α -спиральной кон-

⁹ Научный руководитель работы профессор К.В.Шайтан. Авторы признательны РФФИ (04-04-49645) и Роснауке (01.106.11.0001, 01.165.11.0001) за поддержку

формации. Использовался программный пакет PUMA. Так как характерные времена проникновения через мембрану составляют порядка микросекунды и недоступны для МД симуляций, был использован метод управляемой молекулярной динамики (Steered MD). В рамках SMD к атомам пептида прилагалась сила, направленная перпендикулярно поверхности мембраны. В докладе обсуждается динамическая картина проникновения ТАТ через фосфолипидный бислой.

Анализ функции насыщения дрожжевой апотранскетолазы таминдифосфатом¹⁰

Руслан Оспанов

МГУ им. М.В. Ломоносова

E-mail: ospanov@mail.genebee.msu.ru

Транскетолаза (ТК) – фермент пентозофосфатного пути превращения углеводов, катализирующий обратимый перенос двууглеродного фрагмента с кетосахаров на альдосахара. Транскетолаза содержит два активных центра, функционально неэквивалентных по связыванию кофактора – тиаминдифосфата (ТДФ). При связывании ТДФ с дрожжевой апотранскетолазой в спектре поглощения появляется полоса с максимумом при 320 нм, интенсивность которой пропорциональна доле каталитически активного холофермента. Для анализа функции насыщения апоТК коферментом использована схема, включающая связывание ТДФ с каждой из двух субъединиц и их последующее конформационное изменение. Связывание ТДФ с одной субъединицей оказывает влияние на конформационный переход в другой субъединице. В настоящей работе впервые получены строгие математические выражения, описывающие кривые спектрофотометрического титрования апоТК тиаминдифосфатом и рассчитаны равновесные константы связывания ТДФ с апоТК в присутствии ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} . Проанализирована отрицательная кооперативность между лиганд-связывающими центрами для каждого типа ионов. Исследование эффектов кооперативных взаимодействий проводили с помощью графиков зависимости нормированной доли конформационно измененных состояний молекулы фермента от степени насыщения белка лигандом. Отсутствие кооперативных взаимодействий графически представлено прямой линией, проходящей под углом 45° . Отрицательной или положительной кооперативности соответствуют кривые, проходящие выше или ниже этой прямой соответственно.

¹⁰ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант 03 04 49025) и программой "Молекулярная и клеточная биология" Президиума РАН.

Влияние ионных детергентов на аморфную агрегацию белка оболочки вируса табачной мозаики**Ю.В. Панюков, М.А. Немых***МГУ им. М.В. Ломоносова**E-mail: panyukov@belozersky.msu.ru*

При изучении влияния детергентов на аморфную (неупорядоченную) агрегацию белка оболочки (БО) вируса табачной мозаики (ВТМ) ранее нами было обнаружено, что низкие концентрации анионного детергента додецилсульфата натрия (ДСН) ингибируют термоиндуцированную (при 52°C) аморфную агрегацию этого белка и по-разному влияют на стабильность различных сегментов его молекулы [1,2]. В данной работе мы сообщаем, что катионный детергент цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ), широко известный как «искусственный шаперон», в условиях близких к физиологическим в чрезвычайно низких концентрациях индуцирует аморфную агрегацию отрицательно заряженных молекул БО ВТМ, не вызывая существенных изменений в их структуре. При более высоких концентрациях, которые при комнатной температуре уже не вызывают агрегацию, ЦТАБ проявляет по отношению к БО ВТМ свойства «искусственного шаперона, ингибируя и реверсируя термоиндуцированную (при 52°C) агрегацию этого белка. Кроме того, обнаружено, что агрегация БО ВТМ полностью реверсируется добавлением ДСН по ходу процесса при молярном соотношении ДСН : БО = 30 : 1 в случае термоиндуцированной агрегации и ДСН : ЦТАБ = 3 : 1 в случае агрегации индуцируемой ЦТАБ.

Литература

1. Rafikova E. R. et al. A mechanism of macroscopic (amorphous) aggregation of the tobacco mosaic virus coat protein // *Int. J. Biochem. Cell Biol*, 2003, 35, P. 1452-1460.

2. Рафикова Э.Р. и др. Низкие концентрации додецилсульфата натрия ингибируют аморфную агрегацию белка оболочки вируса табачной мозаики и влияют на стабильность белка // *Биохимия*, 2004, 69, С. 1683-1690.

Компьютерное исследование структуры и эволюции функциональных сайтов ДНК-связывающего домена белка р53 человека¹¹**С.С. Пинтус¹, К.В. Гунбин², В.А. Иванисенко²**¹*Новосибирский государственный университет, Россия*²*Институт Цитологии и Генетики СО РАН, Россия**E-mail: pintus@bionet.nsc.ru*

Знания о функциональных сайтах необходимы для понимания функции белков. Важно знать эволюционную судьбу участков белка, чтобы оценить их функциональную значимость. Ранее авторами была разрабо-

¹¹ Работа выполнена при финансовой поддержке по гранту CRDF (REC-008) и Минобразования России в рамках Программы "Фундаментальные исследования и высшее образование".

тана программа PDBSiteScan [1], которая выполняет поиск функциональных сайтов белков их третичных структурах. Поиск осуществляется посредством выравнивания участков пространственной структуры белка на пространственные структуры образцов функциональных сайтов из базы PDBSite [2]. В результате поиска в третичной структуре белка p53 человека было обнаружено, что замена в ДНК-связывающем домене 245Gly->Cys приводит к возникновению нового потенциального сайта связывания иона Zn^{2+} . Целью данной работы было исследование режима эволюции гена p53 у разных видов и, в частности, кодона, в котором у человека была обнаружена замена 245Gly->Cys. В качестве материала из базы данных EMBL были взяты нуклеотидные и аминокислотные последовательности гена p53 для 30 видов. Поиск адаптивных ветвей филогенетического древа и адаптивно эволюционировавших кодонов был проведен с помощью программы codeml из пакета PAML. В ходе исследования было обнаружено, что кодон, соответствующий позиции 245 в белке p53 человека высоко консервативен. Также было обнаружено, эволюция белка p53 сопровождалась адаптивными изменениями. В частности, было обнаружена адаптивная эволюция при переходе от рыб к земноводным. Соотношение скоростей несинонимичных и синонимичных замен для последовательностей гена составило 1.808. Более слабая адаптивная эволюция была выявлена для дивергенции предков копытных от предков современных хищников — значение dN/dS составило лишь 1.353. Кроме того, в гене p53 были обнаружены кодоны, в которых происходили преимущественно несинонимичные замены. В ДНК-связывающем домене человеческого белка этим кодонам соответствуют аминокислотные остатки S106 и A129. Консервативность позиции 245 в p53 человека свидетельствует о наличии мощного стабилизирующего отбора по соответствующему кодону. Это согласуется с наблюдаемой ассоциированностью соматических замен по этой позиции с развитием опухолей, а также с предположением о возникновении в мутантной форме 245Gly->Cys потенциального сайта связывания цинка. Аминокислотные остатки Ser106 и Ala129 участвуют в образовании структурных петель в белке p53. Петля, содержащая Ser106, связывает неструктурный участок Ser105 — Gln104 с β -листом Arg110 — Gly112, а петля, содержащая Ala129 соединяет β -листы Cys124 — Ser127 и Lys132 — Cys135, которые входят в число 11-ти β -листов, образующих бочонок, который несет на себе основные структурные компоненты ДНК-связывающего домена — сайт связывания с ДНК и регулирующий его работу сайт связывания цинка. Аминокислотные замены в позициях 106 и 129, таким образом, могли влиять на пространственную структуру вышеупомянутого бочонка и, как следствие, особенности работы ДНК-связывающего домена в ходе эволюции. Значительное преобладание скорости фиксации несинонимичных замен над таковой для синонимичных замен на стадии выхода предков земноводных на сушу может быть связана с усилением роли p53 как супрессора опухолей

для выживания организмов в более агрессивной, по сравнению с водной, средой обитания.

Литература

1. Ivanisenko V.A., Pintus S.S., Grigorovich D.A., Kolchanov N.A. PDBSiteScan: a program for search of the active, binding and posttranslational modification sites in the 3D structures of proteins // *Nucleic Acids Research*. 2004. V.32. P.W549-W554.

2. Ivanisenko V.A., Pintus S.S., Grigorovich D.A., Kolchanov N.A. PDBSite: a database of the 3D structure of protein functional sites // *Nucleic Acids Research*. 2005. V.33. P.D1-D5.

Определение амидазной активности аминоксилазы при помощи аммоний селективного электрода

Н.А. Пчелинцев¹, А.В. Сидорова², О.В. Ямскова², М.И. Юшко³

¹химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,

²факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова,

³НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ
им. М.В. Ломоносова

E-mail: parochka@yandex.ru

Аминоксилаза I представляет собой коммерчески доступный и недорогой фермент с широкой субстратной специфичностью, который может быть выделен из ряда микробных, растительных и животных источников. Недавние исследования, проведенные в нашей лаборатории, показали, что каталитическая активность аминоксилаз не ограничена только реакциями превращения N-ацильной группы, что открывает новые перспективы в использования этого коммерчески привлекательного фермента для получения оптически чистых соединений. В частности, была показана способность препарата аминоксилазы из *Aspergillus spp.* осуществлять гидролиз амидов и эфиров аминокислот с очень высокой энантиоселективностью^[12]. В связи с этим, важной задачей является разработка удобного и надежного метода слежения за амидазной активностью данного препарата фермента. Между тем, на сегодняшний день хроматографический анализ является единственным универсальным методом определения каталитической активности амидаз. К основным недостаткам этого метода относятся: его относительно высокая стоимость и низкая производительность, связанная с необходимостью пробоотбора и большой продолжительностью индивидуального анализа.

В нашей работе предложен новый метод слежения за амидазной активностью аминоксилаз и определены границы его применимости. Данная методика основана на количественном определении иона аммония, образующегося в ходе реакции ферментативного гидролиза амидов аминокислот, при помощи аммоний селективного электрода. Это позволяет непрерывно детектировать концентрацию выделяющегося катиона в ре-

¹² Maxim I. Youshko, Luuk M. van Langen, Roger A. Sheldon and Vytas K. Svedas "Application of aminoacylase I for enantioselective resolution of α -amino acid esters and amides", *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, vol 15 (12), 1933-1936.

акционной смеси, обеспечивая, таким образом, высокую экспрессность и точность определения амидазной активности. С использованием данного метода, были найдены кинетические параметры гидролиза (K_M и V_{max}) амида аминокбутановой кислоты, который является субстратом аминоксилатазы-I из *Aspergillus melleus*, охарактеризована температурная зависимость амидазной активности этого препарата и стабильность при экстремальных значениях pH.

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

Д.А. Равчеев

*факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова,
E-mail: ravcheyev@iitp.ru*

Многие прокариотические организмы, например гамма-протеобактерия *Escherichia coli*, способны к использованию различных субстратов для дыхания, что позволяет им приспосабливаться к широкому диапазону условий. В отсутствие молекулярного кислорода наиболее предпочтительными акцепторами электронов являются нитрат и нитрит. В *E. coli* процесс нитрат-нитритного дыхания регулируется сложной системой, включающей сенсорные белки NarX и NarQ и факторы транскрипции NarL и NarP [1].

Целью нашей работы стало детальное исследование регуляции данного процесса в геномах различных гамма-протеобактерий, для чего были применены различные методы сравнительной геномики [2].

Нами было обнаружено, что в десяти из тринадцати полных геномов присутствует одиночный регулятор NarP вместе с сенсорным белком NarQ. В двух случаях, когда наблюдалась нестандартная пара NarP-NarX, в аминокислотных последовательностях сенсорного белка наблюдались изменения, позволяющие думать, что данный белок выполняет функцию NarQ.

Исследование NarP-регулога в этих десяти геномах позволило сделать следующие выводы:

1. В исследованных геномах белок NarP регулирует экспрессию всех генов, в *E. coli* контролируемых двумя факторами транскрипции.

2. Несмотря на то, что структура регулона может достаточно сильно варьировать в разных геномах, регуляция генов восстановления нитрата и нитрита является эволюционно консервативной.

3. Упрощение регуляторной системы связано с упрощением системы нитрат-нитритного дыхания.

4. В исследованных геномах возрастает роль NarP в регуляции дыхания. В геномах бактерий семейства Pasteurellaceae под NarP контролируется экспрессию ряда генов аэробного метаболизма: *cydAB*, *sucAB* и *mdh*.

Литература

1. Neidhart F.C. Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology. Washington, 1996, p.217-286.

2. Mironov A.A., Koonin E.V., Roytberg M.A., Gelfand M.S. «Computer analysis of transcription regulatory patterns in completely sequenced bacterial genomes» // Nucleic Acid Research, 99, 27, p.2981-2989.

Application of «cassette» mutagenesis and periplasmatic expression for heterological expression of recombinant adrenodoxin in E.coli

T.A. Skrahina, Y.G. Pokhodnia, A.G. Lapko
International Sakharov Environmental University
E-mail: skrahina@gmail.com

Adrenodoxin reductase (AR) is an FAD-containing enzyme, a component of cytochrome P-450_{scc} dependent steroid hydroxylating system of adrenal cortex mitochondria. The function of AR in the system encloses the transfer of two electrons from NADPH to adrenodoxin, which then transports them to P450 cytochromes.

Heterological expression of AR in bacterial cells E.coli transformed with pBAR1957 occurs in high level, but a quantity of the separation protein from cells is low. E.coli shows a tendency, especially for eukariotic proteins like AR, to express the synthesized polypeptide in inclusion bodies because of misfolding. The co-expression of AR with chaperones HSP60 results in increased amount of correctly folded proteins and high yield. One of the mechanisms of chaperone effect is maintaining of atom oscillatory motion in synthesized de novo protein for certain time. That provides formation of correct intramolecular bonds between amino acid radicals, characterized by minimum of energy.

We hypothesized laser, which is used in clinical medicine, has energy comparable to energy of atom oscillatory motion. The energy is enough to provide biopolymer dynamic motion, which is necessary to assume protein native confirmation. In order to check the hypothesis we compared protein yield in three cases of heterological expression of AR: conventional - with plasmid BAR1957, co-expression of AR with HSP60-chaperone and expression of AR under laser exposure. The recombinated AR (in each of the three experiments) was isolated by two following affinity chromatographies on an ADP-Sepharose column and an adrenodoxin-Sepharose column, indicating that it assumed its native confirmation.

In comparison to normal heterological expression the high-yield expression HSP60 system increased the fraction of soluble, folded AR to 10 and laser to 5 times.

Laser effect on heterological expression of AR in E.coli is rather considerable. It is comparable to molecular chaperones effect, but less significant.

**ClusterTree: программа кластеризации регуляторных сигналов
с помощью бинарного дерева**

*Елена Дмитриевна Ставровская*¹³
Институт проблем передачи информации РАН
E-mail: esta191@fromru.com

Мотивация

Использование техники филогенетического футпринтинга при анализе регуляторных сигналов бактерий ведет к выявлению большого количества потенциальных регуляторных сайтов, найденных в областях перед ортологичными генами. Следующим шагом такого анализа является кластеризация сайтов, относящихся к одному сигналу и, таким образом, являющихся сайтами связывания одного регулятора. В данной работе мы представляем алгоритм кластеризации регуляторных сигналов для идентификации групп совместно регулируемых генов и приводим результаты его тестирования на реальных выборках.

Алгоритм

Алгоритм включает в себя две стадии: построение дерева и его обход. Каждому узлу дерева соответствует множество выровненных сайтов, а каждому листу – один сигнал из исходного набора. Построение дерева является итеративным процессом. На каждой итерации рассматривается набор поддеревьев (в начале – набор листьев). Для каждого узла дерева (множества сайтов) вычисляется информационное содержание [1].

Для каждой пары поддеревьев вычисляется расстояние между ними:

$$D = \sum_{k=1}^l I_k \frac{\sum_{i=A,C,G,T} f_1(i,k) f_2(i,k)}{F_1 F_2} \quad F_j = \sqrt{\sum_{i=A,C,G,T} f_j^2(i,k)}$$

$$f_j(i,k) = (n_j(i,k) + 0.15\sqrt{N_j}) / (N_j + 0.6\sqrt{N_j})$$

где I_k – информационное содержание в позиции k для общего набора сайтов, $f_j(i,k)$ – частота встречаемости нуклеотида i в позиции k для набора сайтов поддерева,

$$0.15\sqrt{N_j} \quad 0.6\sqrt{N_j} \text{ – псевдокаунты.}$$

Выбираются два наиболее близких поддерева и объединяются в одно. В итоге получаем бинарное дерево, корень которого соответствует полному множеству исходных сайтов.

На стадии обхода ClusterTree просматривает все узлы дерева и выделяет среди них те, для которых выполняется условие локального максимума информационного содержания:

¹³ Работа выполнена под руководством А.А. Миронова.

$$(I > I_p) \& ((I > I_l) \vee (I > I_r))$$

где I – информационное содержание для текущего узла, I_p – для родительского узла, а I_l и I_r – для левого и правого узлов соответственно. Для решения проблемы кластеризации сигналов, имеющих разную длину, алгоритм ClusterTree оценивает статистическую значимость для всех позиций набора сайтов и суммирует информационное содержание только для значимых позиций.

Результаты

Программа ClusterTree тестировалась на выборке регуляторных сигналов из гамма-протеобактерий. Исходные сигналы были получены путем применения программы SeSiMCMC [2] к областям перед ортологичными генами в этих геномах. Некоторые результаты приведены в таблице:

Regulator	Number of known signals in the sample	Number of signals in a cluster	Number of known signals in a cluster
argR	4	5	4
purR	6	6	6
metJ	4	4	4
lexA	9	8	8

Литература

1. Gelfand M.S., Koonin E.V., Mironov A.A. // Prediction of transcription regulatory sites in Archaea by a comparative genomic approach. *Nucleic Acids Res.*, 2000, V.28. 695-705.
2. Favorov A.V., Gelfand M.S., Gerasimova A.V., Mironov A.A., Makeev V.J. // Gibbs sampler for identification of symmetrically structured, spaced DNA motives with improved estimation of the signal length and its validation on the *arcA* binding sites. *BGRS'2004. Proceedings. 2004. V. 2. P. 269–272.*

Новый молекулярно-динамический подход к уточнению структур белков, полученных моделированием по гомологии¹⁴

В.С. Стройлов¹, Г.Г. Чиров³, В.К. Шведас^{2,3}

¹ химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

² факультет Биоинженерии и Биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова

³ НИИ Физико-Химической Биологии МГУ им. М.В. Ломоносова

E-mail: stroilov@sumail.ru

Пенициллинацилаза из *E.coli* является самым изученным ферментом-класса Ntn-гидролаз, получен ряд рентгеновских структур самого фермента и его комплексов с ингибиторами, что позволяет проводить теоре-

¹⁴ Работа поддержана грантом РФФИ № 04-04-08064.

тические исследования субстратной специфичности. В ходе экспериментальных исследований пенициллинацилазы из альтернативного источника - *A.faecalis* были обнаружены интересные свойства, сделавшие объект интересным для моделирования. Учитывая высокую схожесть первичных последовательностей в этом классе ферментов, было проведено моделирование трехмерной структуры пенициллинацилазы из *A.faecalis* по гомологии с использованием стандартной методологии программного пакета SwissModel. Однако положения остатков активного центра в полученной структуре не отличались от соответствующих положений в структуре фермента из *E.coli*, что не позволило объяснить различия в субстратной специфичности данных ферментов. Кроме того, полученная модель была нестабильна в ходе молекулярно - динамических расчетов. В данном исследовании разработана методика молекулярно-динамического уточнения структур, полученных по гомологии и показана ее эффективность. Проведен анализ качества упаковки аминокислотных остатков в полученной модели с помощью программного пакета WHATIF. В соответствии с полученным рейтингом аминокислотные остатки были разделены на 4 группы, с которых постепенно с разной скоростью снимались позиционные ограничения. С остатков, получивших наименьший рейтинг, ограничения снимались в первую очередь, что позволяло таким остаткам занимать равновесное положение в течение всей релаксации. Для дополнительной стабилизации остатков активного центра методом молекулярного докинга была получена структура комплекса фермента с природным субстратом пенициллином G. Позиционные ограничения были сняты полностью за 3.4 ns, затем для свободного фермента и фермент-субстратного комплекса были записаны молекулярно-динамические траектории длиной 10 ns. В результате получены устойчивые во времени структуры, характеризующиеся средним RMSD 3Å, что сравнимо с аналогичным показателем для рентгеновских структур. Время достижения равновесной конформации для фермент-субстратного комплекса составило 3.5 ns против 5 ns для структуры нативного фермента, что свидетельствует о некоторой стабилизации активного центра субстратом. Выявлены структурные различия между полученной и начальной структурами. Пенициллин образовал контакт с bR261, отсутствовавший в начальной модели. Произошли также конформационные изменения в петле b380-b382, участвующей в связывании уходящей группы субстрата.

Пенициллинацилаза из *Bacillus megaterium* характеризуется высокой стабильностью в щелочной среде¹⁵

Д.А. Суплатов¹, Д.Т. Гуранда², Ш. Янг³, В.К. Швядас^{2,3}.

¹факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова

²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ

³Институт физиологии растений и экологии, Шанхайские институты биологических наук Китайской академии наук

E-mail: genesup@belozersky.msu.ru

Исследована стабильность и термостабильность малоизученной пенициллинацилазы (ПА) из грамположительной бактерии *Bacillus megaterium* в широком интервале рН, и проведено сравнение стабильности пенициллинацилаз из различных источников. Следует отметить, что ферменты этого семейства чрезвычайно стабильны при физиологических значениях рН, однако быстро теряют активность в кислых и щелочных средах. Анализ рН-зависимости эффективной константы инактивации ПА-з указывает на ключевую роль ионных пар в поддержании их стабильной конформации. Разрушение солевых мостиков в результате протонирования/депротонирования аминокислотных остатков, образующих ионные пары, обуславливает инактивацию за счет образования нестабильных «кислотных» и «щелочных» форм фермента. Отличительной особенностью ПА из *Alcaligenes faecalis* и *Bacillus megaterium* является высокая стабильность в щелочной среде. На основании данных РСА для ПА из *Escherichia* и *Providencia*, рассчитана трехмерная структура ПА из *Alcaligenes* и *Bacillus*. Как показывает анализ третичной структуры, образование солевых мостиков внутри глобулы белка имеет решающее значение в определении рН-стабильности пенициллинацилаз.

SOS-регуляция в эубактериях

Л.В. Сычёва, Е.А. Пермина, М.С. Гельфанд

МГУ им. М.В. Ломоносова

E-mail: ladasychova@rambler.ru

Система SOS-ответа *Escherichia coli* состоит из множества реакций, индуцирующихся повреждением ДНК. Сигнал к запуску SOS-системы — появление участков одноцепочечной ДНК, например, при попытке клетки реплицировать повреждённую ДНК. Специальный белок — транскрипционный фактор LexA репрессирует работу генов, вовлечённых в SOS-ответ, когда в клетке нет нарушений в ДНК; и активирует их работу, когда появляется одноцепочечная ДНК, взаимодействуя с другим белком — RecA, что приводит к расщеплению LexA [1].

Целью данной работы было исследование SOS-регулона у других геномов, объединённых в таксон γ -протеобактерий, с целью провести геномное сравнение, выделить консервативную часть регулона и проверить наличие таксон-специфической регуляции.

Операторы SOS-генов обладают сродством к LexA и имеют сходные последовательности, называемые SOS-боксом [2]. Для изучения SOS-ответа использовался метод сравнительного анализа регуляции [3], позволяющий предсказывать гены, которые могут быть участниками SOS-системы, по сигналу, которым является участок последовательности в 3'-некодирующей области, связывающий LexA. Таким образом был найдено 13 генов — потенциальных новых членов SOS-регулона, среди них *yigN* (кодирующий гомолог рекомбиназы RumC), *rpoH* (кодирующий σ -фактор, регулирующий ответ на тепловой стресс), *otsB* (участвующий в регуляции осмотического давления), *sbmC* (кодирующий ингибитор гиразы). Функции этих генов дают серьёзные основания для поддержки гипотезы об их участии в SOS-ответе.

Эти данные могут оказаться полезными не только в проведении фундаментальных исследований, но также в прикладных науках - медицине и биотехнологии.

Литература

1. Horii T., Ogawa T., Nakatani T., Hase T., Matsubara H., Ogawa H. "Regulation of SOS functions: purification of E.coli LexA protein and determination of its specific site cleaved by the RecA protein" // Cell, 1981, Vol. 27, pp. 515-22.
2. Little J.V., Mount D.W., Yanish-Perron C.R. "Purified lexA protein is a repressor of the recA and lexA genes" // Biochemistry, 1981, Vol. 78, No. 7, pp. 4199-4203.
3. Гельфанд М.С., Миронов А.А. "Компьютерный анализ регуляторных сигналов в полных бактериальных геномах" // Молекулярная биология, 1999, Т. 33, С. 772-778.

Объектно-ориентированная система описания, классификации и моделирования биологических объектов и ее применение к грибам *Trichoderma*

Денис Станиславович Тарасов

*Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина,
Казань, Россия*

E-mail: dtarasov@compnera.com

Объектно-ориентированному подходу к моделированию и описанию биологических систем в последнее время уделяется особое внимание [1,2]. Объектная ориентация это способ представления знаний и стиль программирования, обеспечивающий быстрый переход от концептуальных моделей к функционирующим программам. Данная парадигма хорошо приспособлена для описания и моделирования сложных биологических систем, вследствие того, что существует прямая связь между представлением данных в компьютерной программе и природными компонентами биологических систем.

Однако существующие средства объектного моделирования и программирования имеют ряд существенных недостатков, плохо передают особенности биологических систем [1]. Кроме того, их изучение сложно для неспециалистов в области программирования.

Целью нашей работы явилось создание объектно-ориентированной системы описания, классификации и моделирования биологических объектов и ее апробация. В качестве модельного объекта для тестирования системы были использованы грибы рода *Trichoderma*.

Были получены следующие результаты:

Результаты:

- Разработан новый объектно-ориентированный язык, специально приспособленный для описания структуры и развития биологических объектов.
- Реализована среда разработки и концептуального моделирования исследуемых объектов.
- Разработан и реализован новый способ классификации биологических объектов, базирующийся на объектно-ориентированном подходе.
- Использование разработанной системы при изучении грибов рода *Trichoderma* продемонстрировало ее целесообразность и позволило построить новую более адекватную классификацию видов и изолятов данного рода.
- Применение разработанной системы позволило ускорить процесс идентификации изолятов рода *Trichoderma*.

Литература

1. Sequeira R.A., Olson R.L., McKinion J.M. Implementing generic, object-oriented models in biology// *Ecological Modelling*, 1997, N94 p. 17-31
2. Roux-Rouquié M., Caritey N., Gaubert L., Rosenthal-Sabroux C. Using the Unified Modelling Language (UML) to guide the systemic description of biological processes and systems// *BioSystems*, 2004, N75, p.3–14

Определение клеточных распределений по размерам

А.Ф. Лобков, Э.В. Терёшкин
МГУ им. М.В. Ломоносова

Величина размераи клеточного объема регулируетсямножеством взаимосвязанных физиологических и биохимических процессов [1]. При некоторых патологических состояниях происходит нарушение этой регуляции. Отношение площади поверхности к объему этих клеток является одним из основных параметров, определяющих реологические свойства крови [2]. Поэтому важную роль в жизнедеятельности организма играет регуляция объема эритроцитов. Это делает весьма актуальной разработку методов, позволяющих эффективно определять функции распределения клеток по размерам и, в частности, наблюдать кинетику изменения клеточных размеров с высокимвременным разрешением.

В качестве экспериментального материала были выбраны нормальные эритроциты человека. Особенности строения и доступность получения этих клеток делают удобным объектом для изучения. Для определения функций распределения эритроцитов по размерам использовалась оригинальная многоцелевая аналитическая система (лазерный цитомонитор) [3]. Работа системы основана на известном методе измерения малоуглового рассеяния света на взвешенных в жидких средах малоразмерных объектах. Лазерный цитомонитор позволяет получить функции распределения клеток по размерам и их эволюцию во времени. Изучались методические вопросы применения лазерного цитомонитора для исследования эритроцитов человека, ресуспендированных в различных солевых средах. С помощью метода лазерного цитомониторинга были получены функции распределения эритроцитов по размерам в зависимости от осмотичности ресуспендирующих сред. На основании сравнения распределений объема эритроцитов, полученных методом цитомониторинга, с реальным объемом клеток этого были построены калибровочные функции. Также наблюдали кинетику изменения клеточных размеров в первые 5 минут после добавления ионофора. Полученные результаты показывают, что метод лазерного цитомониторинга чувствителен к изменению объема эритроцитов и позволяет наблюдать кинетику изменения размеров клеток.

Литература

1. Lang F., Busch G.L., Ritter M., Volkl H., Waldegger S., Gulbins E., Haussinger D. "Functional significance of cell volume regulatory mechanisms" // *Physiol. Rev.* 1998, V. 78, P. 247-306.
2. Атауллаханов Ф. И., Витвицкий В. М., Лисовская И. Л., Тужилова Е. Г. "Анализ геометрических параметров и механических свойств эритроцитов" // *Биофизика*. Т. 39, № 4 1994. С. 672-680
3. Шайтан К. В., Лобков А. Ф., Тимофеев И. Б., Лисовская И. Л., Чижов А. А., Терешкин Э. В. Метод лазерного цитомониторинга и его применение для определения размеров эритроцитов // *Биологическая мембрана* 2002, т. 19 No 3, с. 210-218.

Кинетика изменения размеров клеток

Э. В. Терешкин, А. Ф. Лобков

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

В настоящее время методы, позволяющие наблюдать кинетику изменения клеточных размеров с высоким разрешением, развиты недостаточно, что делает актуальным их развитие. В данной работе используется многоцелевая аналитическая система (лазерный цитомонитор), которая представляет собой комплекс методических и технических средств, работающих в автоматическом режиме [1, 2, 3]. В основу системы положен известный метод малоуглового рассеяния света на взвешенных в различных жидких средах малоразмерных объектах. Метод лазерного цитомонито-

ринга позволяет получить функции распределения частиц по размерам и проследить их эволюцию во времени.

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

Литература

1. Lang F., Busch G.L., Ritter M., Volkl H., Waldegger S., Gulbins E., Haussinger D. "Functional significance of cell volume regulatory mechanisms" // *Physiol. Rev.* 1998, V. 78, P. 247-306.

2. Шайтан К.В., Лобков А.Ф., Тимофеев И.Б., Лисовская И.Л., Чижов А.А., Терешкин Э.В. Метод лазерного цитомониторинга и его применение для определения размеров эритроцитов // *Биологические мембраны* 2002, т.19 № 3, с.210-218.

3. Шайтан К.В., Лобков А.Ф., Тимофеев И.Б., Чижов А.А., Терешкин Э.В. О восстановлении функций распределения для мелкодисперсных и ультрадисперсных сред по рассеянию лазерного излучения. // *Исследовано в России.* 2002. №115 С.1265-1278

Исследование динамики прохождения ионов и гидратированных комплексов сквозь мембрану гомомерного глицинового рецептора, состоящего из ТМ2 фрагментов $\alpha 1$ -субъединиц¹⁶

К.Б. Терёшкина

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Глициновые рецепторы формируют в мембране лиганд-активируемые ионные каналы, обеспечивая тем самым быструю нейротрансдукцию в ЦНС. Рецептор состоит из пяти субъединиц, образованных четырьмя α -спиралями. Трансмембранные домены ТМ1-ТМ4 каждой из α -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 глицинового рецептора. В данной работе рассматривается структура с

¹⁶ Научный руководитель работы профессор К.В.Шайтан. Автор признателен РФФИ (04-04-49645) и Роснауке (01.106.11.0001, 01.165.11.0001) за поддержку.

двумя выступающими внутрь канала положительно заряженными и одним отрицательно заряженным кольцом. Они образуются боковыми радикалами остатков аргинина и аспарагиновой кислоты соответственно. Согласно результатам исследований мутагенных форм рецептора, именно эти остатки играют важную роль в проводимости канала [1].

В данной работе был применён метод управляемой молекулярной динамики [2], с включенной постоянно действующей силой до 10 ккал/(моль·А), приложенной к проходящему иону или комплексу. Изучалась динамика прохождения следующих ионов: F^- , Cl^- , Br^- , I^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , а также гидратированных комплексов. В результате исследований было выявлено три типа поведения при прохождении сквозь канал: свободное прохождение, остановка в узкой части канала и притяжение к заряженным атомам внутри канала. Сквозь канал полностью проходят только отрицательно заряженные ионы. Для них были получены следующие коэффициенты диффузии, зависящие от прохождения по различным частям канала: Cl^- $1.38 \cdot 10^{-5} - 1.45 \cdot 10^{-6}$; Br^- $1.25 \cdot 10^{-5} - 3.25 \cdot 10^{-6}$; F^- $1.66 \cdot 10^{-6} - 1.47 \cdot 10^{-6}$; I^- $2.04 \cdot 10^{-6} - 3.63 \cdot 10^{-6}$ см²/пс. При прохождении отрицательных ионов сквозь канал важную роль играют остатки аргинина и глутамина (для I^-). Для положительных ионов нельзя выделить значимых остатков.

Таким образом, наиболее быстрая диффузия наблюдается для Cl^- и Br^- . При этом хлор проводит связанным с аминокислотными остатками рецептора гораздо меньше времени, по сравнению с другими ионами.

Литература

1. A. Keramidas, et al. « M2 Pore Mutations Convert the Glycine Receptor Channel from Being Anion- to Cation-Selective » // Biophys.J. (2000), 78, 247-259
2. KB Egorova, et al. «Molecular Dynamics of Strained Retinal in Various Electronic States» // IJQC (2004), 94, 219-225.

Новые методы детекции генетического полиморфизма у человека.

М.А. Тимофеева

Биологический факультет МГУ им. Ломоносова

E-mail: marizzka-sun@yandex.ru

Генетическим полиморфизмом называют вариабельность последовательностей данного участка ДНК, который определяется более чем у 1% особей в популяции. Самым распространенным является полиморфизм единичных нуклеотидов (SNP). SNP могут появляться в кодирующих регионах генов, где могут обусловить замену аминокислоты в белке, что может привести к изменению либо утрате ферментом своей функции. Для определения SNP нами были выбраны полиморфные гены следующих групп:

- 1) система биотрансформации ксенобиотиков и эндобиотиков (группа генов CYP450, GST, NAT2, ADH1B, ALDH2),
- 2) фермент контроля кровяного давления (ACE),
- 3) система свертывания крови (F2, F5, SER-

PINE1, FGB), 4) ферменты катаболизма липопротеинов (APOC3, LPL), 5) фермент, отвечающий за превращение фолиевой кислоты в её активную форму (MTHFR).

Была проведена работа по сравнению различных систем детекции полиморфизмов: рестриктоного анализа, масспектрометрии и биологических микрочипов. Использовалась ДНК 10 спортсменов и 12 здоровых доноров. Идентификация полиморфизма позволяет прогнозировать развитие физических качеств человека и может иметь большое значение для эффективного отбора спортсменов в определенные виды спорта.

Рестриктный анализ основан на появлении или исчезновении в генах, несущих SNP, дополнительных сайтов рестрикции по сравнению с генами дикого типа. Это можно определить путем амплификации обработкосоответствующей рестриктазой необходимого участка гена. Метод масспектрометрии заключается в ионизации амплифицированных участков ДНК и последующем их разгоне в электрическом поле по направлению к детектору. Регистрируется время движения, которое обратно пропорционально скорости молекулы, которая, в свою очередь, прямо пропорциональна отношению массы летящей молекулы к ее заряду. Эти параметры (отношение массы к заряду) - уникальны для каждой молекулы и определяются исключительно ее нуклеотидной последовательностью. Биочипы позволяют одновременно детектировать несколько полиморфизмов. Они представляют собой матрицу из гелевых элементов, содержащих олигонуклеотиды, комплементарные анализируемому участку ДНК. Флуоресцентно меченые продукты амплификации гибридизуют с данными олигонуклеотидами. Если иммобилизованная и гибридизуемая ДНК точно комплементарны друг другу, то образующиеся дуплексы (совершенные) будут термодинамически более устойчивы, чем дуплексы с одним неспаренным основанием (несовершенные). В результате при конечных температурах совершенных дуплексов будет больше, чем несовершенных, и им будет отвечать больший гибридационный флуоресцентный сигнал.

Ведётся работа по изучению особенностей генетического полиморфизма у спортсменов различными методами. Устанавливается связь генетического полиморфизма с перенесением тяжелых физических нагрузок спортсменами на разных этапах тренировочного процесса.

МД расчёты липидной мембраны в столкновительном термостате¹⁷

Е.В. Турлей

Биологический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова

В данной работе изучалась молекулярная динамика объёмных анизотропных структур на примере полностью гидратированной пальмитоил-олеилфосфатидилхолиновой мембраны в столкновительном термостате и баростате Берендсена. Представлено достаточно полное описание усло-

¹⁷ Научный руководитель работы профессор К.В.Шайтан. Авторы признательны РФФИ (04-04-49645) и Роснауке за поддержку.

вий и протоколов, совокупность которых никогда ранее не была применена при МД расчётах данной системы. При этом производится сравнение с данными МД, полученными в различных силовых полях и при различных условиях.

В исследовании был произведён специальный подбор параметров протокола МД, который позволил привести поверхностную плотность и толщину мембраны в соответствие с экспериментом. Использовалась высокая степень гидратации мембраны, что позволило уменьшить эффекты, вызванные введением периодических граничных условий. Для поддержания изотермических условий применялся столкновительный термостат, который не приводит к нелинейным аттракторным режимам, искажающим статистически равновесное распределение энергии по степеням свободы. Помимо обычного метода МД была разработана и применена версия метода управляемой молекулярной динамики (SMD), которая позволяет ускорять динамику молекулярных процессов по определённым степеням свободы. В результате оказалось возможным оценить величину мембранной микровязкости в различных частях исследуемого анизотропного бислоя. Таким образом, использование SMD позволяет дать количественную оценку параметрам, описывающим физические механизмы элементарных актов массопереноса в микрогетерогенных структурах.

Анализ мембранной топологии субъединицы NqrC натрий-транслоцирующей NADH:хинон оксидоредуктазы *Vibrio harveyi*

М.С. Фадеева

*факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М. В. Ломоносова,
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии*

им. А. Н. Белозерского

E-mail: masha@genebee.msu.ru

Натрий-транслоцирующая NADH:хинон оксидоредуктаза (Na^+ -NQR) — первый компонент дыхательной цепи у некоторых умеренно галофильных, морских и патогенных бактерий. Перенос электронов от NADH на хинон в этом ферменте сопряжен с образованием трансмембранного градиента ионов натрия, необходимого для нормальной жизнедеятельности микроорганизмов.

Из шести субъединиц, составляющих фермент, только одна гомологична другим белкам с известными функциями, в то время как все остальные субъединицы — уникальны. Так же необычен набор кофакторов (четыре флавина, один из которых — рибофлавин), способ ковалентного присоединения FMN (через треонин) и использование двух флавинов в качестве одноэлектронных переносчиков. Многие детали механизма трансмембранной транслокации натрия этим ферментом остаются невыясненными и представляют повышенный интерес для биоэнергетики. Известно, что большая часть кофакторов Na^+ -NQR расположена с цитоплазматической стороны клеточной мембраны, однако до сих пор нет

сведений о локализации двух ковалентно связанных FMN. Данные об этой локализации позволили бы нам определить механизм работы Na^+ -NQR, т.е. функционирует ли он как “Митчелова петля” или как натриевая помпа.

По первичной структуре субъединицы NqrC компьютерные программы (TopPred, TMpred, ТМНММ – <http://cn.expasy.org/tools/>) предсказывают два варианта пространственной структуры. Согласно первому, субъединица содержит лишь одну трансмембранную спираль. В этом случае небольшой N-концевой участок находится в цитоплазме, а довольно протяженный C-концевой домен, несущий FMN, расположен в периплазме. Второй вариант подразумевает присутствие двух трансмембранных столбов. При этом небольшой N-концевой участок будет находиться в цитоплазме, далее идет трансмембранная спираль, большая периплазматическая петля, вторая трансмембранная спираль и цитоплазматический C-концевой домен, содержащий FMN. Второй вариант менее вероятен и предсказывается далеко не для всех организмов, содержащих Na^+ -NQR. Поэтому за рабочую гипотезу был взят вариант с одной трансмембранной спиралью.

Один из ковалентно связанных флавинов находится на субъединице NqrC/ Анализ топологии NqrC проводили с помощью мышиных поликлональных антител на участок NqrC, несущий FMN. Для получения данного пептида был клонирован и встроен в плазмиду pBAD соответствующий участок гена NqrC из *V. harveyi*. Для выяснения локализации FMN инвертированные СБЧ *Vibrio harveyi* инкубировали с высокими концентрациями протеиназы К при 37°, после чего реакционную смесь разделяли ДСН-электрофорезом. Белки Вестерн-блоттингом переносили на нитроцеллюлозную мембрану, которую затем инкубировали с сывороткой иммунизированных мышей и вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. В соответствии с первой моделью после обработки протеиназой К мы должны были получить не изменяющуюся во времени полосу NqrC, если клонированный фрагмент находится с периплазматической стороны мембраны, или исчезновение этой полосы, если фрагмент локализован в цитоплазме. Однако полученные результаты свидетельствуют в пользу второго предсказанного программой варианта, согласно которому в субъединице NqrC имеются две трансмембранные спирали. Таким образом, FMN, ковалентно связанный с субъединицей NqrC, локализован в цитоплазме.

1.. Богачев А. В. и Верховский М. И. (2005). Биохимия, 70, вып. 2, с. 177 – 185. Na^+ Транслоцирующая NADH : хинон оксидоредуктаза – достигнутый прогресс и перспективы исследований.

Ядерно-цитоплазматический транспорт белков Nrf2 и Keap1 в регуляции ответа клетки на окислительный стресс

С.В. Мельников, Г.С. Филонов

НИИ физико-химической биологии им. Белозерского МГУ

В течение жизни эукариотическая клетка испытывает неблагоприятные воздействия окружающей среды. К их числу относится проникновение в клетку высоко-реакционноспособных электрофилов и оксидантов, способных повреждать клеточные молекулы и структуры и переводить цитозоль и кариозоль в окисленную форму. Клетка может бороться с подобной угрозой, активируя синтез белков, напрямую нейтрализующих вредные вещества или способствующих их нейтрализации. Этот клеточный ответ носит название окислительного стресса.

Ключевым игроком, осуществляющим активацию синтеза защитных белков в условиях окислительного стресса, является транскрипционный фактор Nrf2 [1]. Согласно современным литературным данным, в нормальных условиях Nrf2 связан со специфическим белком-репрессором Keap1 и локализуется в цитоплазме, пространственно разобщенный со своими генами-мишенями, расположенными в ядре. Помимо этого, Keap1 является компонентом убиквитин-лигазного комплекса и способствует деградации Nrf2 через 26S протеасому, что приводит к снижению уровня Nrf2 в клетке. В условиях окислительного стресса происходит дерепрессия Nrf2: при этом Nrf2 избегает Keap1-зависимой деградации и перераспределяется в ядро, где активирует транскрипцию подконтрольных генов [2].

В ходе исследований, проведенных в нашей лаборатории, мы установили, что Nrf2 и Keap1 не удерживаются статически в цитоплазме, но являются белками-челноками, т.е. постоянно перемещаются между цитоплазмой и ядром. Наблюдаемая в нормальных условиях цитоплазматическая локализация этих белков является результатом динамического равновесия процессов импорта в ядро и экспорта из него, причем последний процесс преобладает.

Более того, в структуре Keap1 был идентифицирован классический лейцин-богатый сигнал экспорта из ядра и было оказано, что его активность необходима для транспорта из ядра как самого Keap1, так и Nrf2.

Неожиданным результатом исследований явился тот факт, что присутствие в клетке Keap1 с мутацией в сигнале экспорта из ядра способствует дополнительному усилению транскрипции генов-мишеней Nrf2, т.е. нарушение экспорта из ядра Keap1 превращает его из репрессора в активатор Nrf2-зависимой экспрессии генов.

Полученные нами результаты позволяют рассматривать ядерно-цитоплазматический транспорт в качестве нового аспекта регуляции активности Nrf2 [3]. Похожий механизм уже описан для ряда

транскрипционных факторов и их репрессоров: p53/Mdm2, NF- κ B α /I κ B α , β -катенин/APC.

Литература

1. Alam J, Stewart D, Touchard C, Voinapally S, Choi AM, Cook JL “Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene.” // J Biol Chem., 1999, 274, 26071-8.

2. McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD., “Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression.” // J Biol Chem., 2003, 278, 21592-600.

3. Karapetian RN, Evstafieva AG, Abaeva IS, Chichkova NV, Filonov GS, Rubtsov YP, Sukhacheva EA, Melnikov SV, Schneider U, Wanker EE, Vartapetian AB., “Nuclear oncoprotein prothymosin alpha is a partner of Keap1: implications for expression of oxidative stress-protecting genes.” // Mol Cell Biol., 2005, 25, 1089-99.

Влияние синтетических полианионов на тепловую агрегацию глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы¹⁸

И.Н. Шалова¹, Р.А. Асриянц², В.И. Муронец^{1,2}

факультет биоинженерии и биоинформатики¹ МГУ им. М.В.Ломоносова,

НИИ Физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского² МГУ

им. М.В.Ломоносова

E-mail: shalova@belozersky.msu.ru

Исследовано влияние синтетических полианионов на тепловую агрегацию глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) из мышц кролика. В качестве полианионов в работе были использованы полиметакриловая кислота (ПМАК), полиакриловая кислота (ПАК) и полистиролсульфонат натрия (ПСС).

Ранее нами было показано, что присутствие полианионов в инкубационной среде приводит к уменьшению тепловой агрегации фермента, за счёт уменьшения размеров агрегатов белка, либо к ее полному предотвращению.

Изучена тенденция зависимости тепловой агрегации ферментов от концентрации и степени полимеризации полианионов. Увеличение концентрации полианиона с высокой степенью полимеризации, приводит к появлению отрицательно заряженных петель, способных поддерживать белковые глобулы в растворенном состоянии, предотвращая их агрегацию. Полученные данные свидетельствуют, что для предотвращения тепловой агрегации фермента наиболее перспективны достаточно длинные синтетические полианионы. При уменьшении степени полимеризации наблюдается тенденция снижения защитного эффекта полиэлектролитов.

Из использованных полианионов в данных условиях (рН 7,5) наименьший эффект на предотвращение агрегации белка оказывает наибо-

¹⁸ Работа была поддержана грантом РФФИ № 02-04-48076 и БелРФФИ №04-04-81038

лее слабозаряженная ПМАК. Степень ионизации ПАК составляет порядка 60%. Присутствие 10 мМ ПАК (со степенью полимеризации 2360) приводит к полному предотвращению агрегации белка, концентрацией 0,7 мкМ. ПСС полностью ионизирован в широком диапазоне значений рН, что резко повышает его способность предотвращать агрегацию ГАФД. Так, 0,1 мМ ПСС (со степенью полимеризации 430 мономерных звеньев) полностью предотвращает агрегацию белка. Таким образом, нами было продемонстрировано, что значительную роль на свойства белок-полианионного комплекса оказывает не только концентрация и степень полимеризации используемого полианиона, но и значение рК.

В работе обсуждается вопрос о возможности использования синтетических полианионов в качестве препаратов для предотвращения образования белковых агрегатов, возникающих при нейродегенеративных заболеваниях, и создании искусственных шаперонов.

Получение одноцепочечных антител к EGFR (HER 1) в растительных продуцентах¹⁹

О.В. Ширшикова^{1,3}, О.А. Стрёмовский², Е.Г. Семенюк¹

¹Филиал Института биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН,

²Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,

³Пушинский государственный университет

В данной работе получены трансгенные растения и суспензионные клеточные культуры *Nicotiana tabacum* — продуценты одноцепочечных антител большой клинической значимости, направленных против белка - опухолевого маркера HER-1 (EGFR) (рак головы и шеи, легкого, яичников).

Для экспрессии антител в клетках растений было создано две генетические конструкции, включающие гены варибельных доменов антител к HER1 и ген бактериального белка барстара, под контролем различных промоторов (двойного промотора 35SCaMV и агробактериального суперпромотора). Для направления антител в апопласт растительной клетки мы использовали лидерный пептид растительного белка экстензина.

Трансгенные растения были получены методом агробактериальной трансформации, после чего была подтверждена интеграция перенесенных генов в растительный геном. Присутствие рекомбинантного белка в клетках растений установлено при помощи иммуноблотинга с антителами к барстару. Суспензионные культуры клеток трансгенного табака были получены из листовых эксплантов через индукцию каллуса, после чего быстрорастущие каллусные культуры переносили в жидкую среду.

Полученные растения и клеточные культуры будут использованы для очистки антител методом аффинной хроматографии.

¹⁹ Работа была поддержана грантом РФФИ № 05-04-48399

Конструирование и исследование иммуногенных свойств полиэпитопной анти-ВИЧ ДНК-вакцины**О.С. Юдина**

*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»,
НИИ Биоинженерии, Россия
E-mail: olya_y@ngs.ru*

При создании вакцин против таких сложных вирусов, как ВИЧ, необходимы нетрадиционные подходы. Один из наиболее перспективных подходов к созданию нового поколения эффективных и безопасных вакцин связан с идентификацией Т- и В-клеточных эпитопов в вирусных белках и созданием на их основе синтетических полиэпитопных анти-ВИЧ вакцин. Такие вакцины будут лишены многих дефектов, свойственных вакцинам, создаваемым на основе нативных субъединиц или живых аттенуированных и целых инактивированных патогенов.

Была сконструирована кандидатная вакцина против ВИЧ-1, в форме вирусоподобных частиц, основу которой составляют два полиэпитопных белка ТВ1 и ТС1. Белок ТВ1 (T and B cell epitopes containing immunogen) был спроектирован для стимуляции гуморального ВИЧ-специфического ответа. Этот белок представляет собой конструкцию с оптимальным набором В-клеточных нейтрализующих и Т-хелперных эпитопов из белков Env и Gag ВИЧ-1. Поли-ЦТЛ-эпитопный Т-клеточный иммуноген - ТС1 спроектирован для стимуляции ВИЧ-специфического цитотоксического ответа. В состав ТС1 были включены эпитопы из основных вирусных белков ВИЧ-1: Env, Gag, Pol и Nef. Получена ДНК-вакцина pcDNA-ТС1, содержащая ген *tci*, под контролем эукариотического промотора.

Чтобы объединить гуморальные и клеточные элементы вакцины, были сконструированы оригинальные искусственные структуры представляющие собой вирусоподобные частицы (ВПЧ), внутри которых находится плазида pcDNA-ТС1, покрытая конъюгатом спермидин-полиглюкин, а на поверхности экспонирован рекомбинантный белок гесА-ТВ1.

Была исследована специфическая активность кандидатной вакцины на модели лабораторных животных. Была проведена иммунизация мышей линии BALB/c.

В сыворотке животных, иммунизированных кандидатной вакциной, были обнаружены ВИЧ-специфические антитела, причем эти антитела обладали вируснейтрализующей активностью, ингибируя репликацию вируса *in vitro*. Иммунизация анти-ВИЧ ДНК-вакциной, несущей плазмиду pcDNA-ТС1 вызывала так же индукцию специфического СТЛ-ответа. Результаты нашей работы показали перспективность использования вирусоподобных частиц для доставки ДНК-вакцин.