

УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
**ИНСТИТУТ БЕЛКА РАН**



**ЕЖЕГОДНАЯ  
НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ**

Сборник тезисов

8 - 9 июня 2010 г.  
г. Пущино

# Программа конференции

8 ИЮНЯ, ВТОРНИК

*Утреннее заседание, начало в 10.00*

## ОТКРЫТИЕ КОНФЕРЕНЦИИ

### **БИОСИНТЕЗ БЕЛКА**

*Председатель: Л. П. Овчинников*

В.А. Широков, Ж.А. Афоина, В.Д. Васильев, А.С. Спирин, А.Г. Мясников, Ж.-Ф. Менетре, Б.П. Клахольц. Трехмерная архитектура эукариотических полисом. (15 мин.)

О.М. Алехина, К.С. Василенко, С.Е. Дмитриев, А.С. Спирин. Влияние структуры 5'-нетранслируемой области мРНК на инициацию трансляции у эукариот. (15 мин.)

М.С. Светлов, А.С. Спирин и В.А. Колб. При какой длине растущей полипептидной цепи рибосома приобретает устойчивость к действию макролидов? (15 мин.)

Е.А. Согорин, Н.Э. Широких, С.Ч. Агаларов, А.С. Спирин. Исследование адресно-измененных форм РНК омега-последовательности ВТМ. (15 мин.)

*Перерыв (11:30-11:45)*

### **РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА. СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ КОМПОНЕНТОВ АППАРАТА ТРАНСЛЯЦИИ**

*Председатель: В. А. Колб*

Д.Н. Лябин, И.А. Елисеева, О.В. Скабкина, Л.П. Овчинников. Вклад белков YB-1 и PABP в специфическую регуляцию трансляции мРНК YB-1. (15 мин.)

О.В. Кравченко, И.В. Митрошин, В. Пиндл, С.В. Никонов и М.Б. Гарбер. Кристаллографическая модель двухдоменного N-концевого фрагмента архейного рибосомного белка P0 (L10) позволяет прояснить структуру основания «P1-выступа» большой субчастицы архейной рибосомы. (15 мин.)

И.Н. Сердюк, С.Г. Гурьянов, О.М. Селиванова, Г.А. Енин, Л.П. Овчинников. Белок YB-1 и его фрагмент AP-CSD обладают способностью к молекулярной самосборке в протяженные тяжи длиной несколько микрометров. (20 мин.)

В.С. Аверков, М.В. Крючков, С.А. Хаустов, Н.А. Плешкова, В.Л. Катанаев. Идентификация ряда человеческих рибосомальных белков как потенциальных протоонкогенов методом трансгеноза плодовой мушки *Drosophila melanogaster*. (20 мин.)

*Перерыв*

**8 ИЮНЯ, ВТОРНИК**

***Вечернее заседание, начало в 15.30***

**НАДМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ И КЛЕТКИ**

*Председатель: В. Н. Ксензенко*

И.Б. Бродский, Е.С. Надеждина. Транспортный компартмент между эндоплазматическим ретикулумом и аппаратом Гольджи как организатор клеточных микротрубочек. (20 мин.)

Е.М. Чудинова, А.А. Саблина, П.А. Иванов, Е.С. Надеждина. Факторы, значимые для образования стрессовых гранул. (15 мин.)

А.А. Гордеев, Т.Р. Саматов, Е.В. Четверина, А.Б. Четверин. Высокопроизводительный скрининг клеток в двумерном формате. (15 мин.)

А.Г. Алатырев, А.В. Галева, М.Г. Пятибратов. Идентификация нового белка, участвующего в регуляции подвижности архей. (15 мин.)

*Перерыв (16:45-17:00)*

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**

*Председатель: И. Н. Сердюк*

А.С. Глухов, А.И. Крутилина, В.В. Марченков, В.Н. Ксензенко. Область генов тРНК T5-подобных бактериофагов как модель для изучения незаконной рекомбинации. (20 мин.)

Н.Н. Васильев, З.К. Тнимов, В.И. Угаров, Л.Б. Дженнер, М.М. Юсупов, Е.В. Четверина, А.Б. Четверин. Химерная Q $\beta$ -репликаза, содержащая термофильный EF-Ts. (15 мин.)

Т.С. Калебина, Е.Е. Безсонов, А.А. Горковский, И.Б. Кудряшова, Г.В. Семисотнов. Температурно-индуцированные конформационные переходы глюкантрансферазы Bgl2p, выделенной из клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. (15 мин.)

А.С. Благодатский, В.Л. Катанаев. Молекулярные механизмы регуляции соматического гипермутирования иммуноглобулиновых генов (15 мин.)

В.А. Балобанов, Н.Б. Ильина, И.А. Кашпаров, В.Е. Бычкова. Избирательная стабилизация промежуточного состояния апомиоглобина фосфолипидной мембраной. (15 мин.)

**9 ИЮНЯ, СРЕДА**

***Утреннее заседание, начало в 10.00***

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ**

*Председатель: С. А. Потехин*

Т.Н. Мельник, Т.В. Поварницына, С.Р. Евдокимов, М.А. Дудина, Б.С. Мельник.  $\mu$ -анализ – хорошо, ф-анализ – плохо, или почему некоторые экспериментальные подходы не применимы при исследовании многостадийно сворачивающихся белков. (15 мин.)

С.А. Гарбузинский, Д.Н. Иванков, Н.С. Богатырёва, А.В. Финкельштейн. «Золотой треугольник» для скоростей сворачивания глобулярных белков. (15 мин.)

Л.Б. Переяславец, М.В. Баранов, Е.И. Леонова, О.В. Галзитская. Предсказание ядер сворачивания в молекулах РНК. (15 мин.)

*Перерыв (11:15-11:30)*

*Председатель: В. В. Филимонов*

А.В. Глякина, О.В. Галзитская. Моделирование сворачивания альфа-спиральных белков. (15 мин.)

Н.В. Довидченко, О.В. Галзитская. Моделирование образования амилоидных структур. (15 мин.)

Е.А. Бошкова, А.В. Ефимов. Замкнутые в циклы структуры в белках, содержащих  $3\beta$ -уголки. (15 мин.)

А.В. Ефимов. Замкнутые в циклы структурные мотивы в белках. (20 мин.)

**ПРОВЕДЕНИЕ КОНКУРСА НА ЛУЧШИЙ ДОКЛАД**

**ЗАКРЫТИЕ КОНФЕРЕНЦИИ**

**ПИКНИК 14:30**

# Тезисы докладов

## **ТРЕХМЕРНАЯ АРХИТЕКТУРА ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ПОЛИСОМ**

**В.А. Широков, Ж.А. Афонина, В.Д. Васильев, А.С. Спирин,**

*Институт белка РАН, Пущино, и*

**А.Г. Мясников, Ж.-Ф. Менетре, Б.П. Клахольц**

*Институт генетики и молекулярной и клеточной биологии, Страсбург*

*shirokov@vega.protres.ru*

В процессе синтеза белка рибосомы, транслирующие одну и ту же молекулу мРНК, формируют полисомы. Имеется целый ряд структурных и функциональных свидетельств в пользу того, что эукариотические полисомы могут иметь циркулярную организацию, при которой 5' и 3' концы мРНК сближены, обеспечивая эффективную реинициацию трансляции в полисоме. Ранее нами было показано, что двурядные полисомы, образуемые в бесклеточной системе из зародышей пшеницы, могут быть интерпретированы как циркулярные, и была предложена их топологическая модель. В настоящей работе исследование таких полисом методом криоэлектронной томографии позволило построить структурную модель двурядных полисом. Обнаружено, что в каждом из рядов в составе двурядной полисомы рибосомы ориентированы одинаковым образом, что предполагает однонаправленность хода цепи мРНК вдоль такого ряда. При этом в двух рядах полисомы ориентация рибосом противоположна, и, следовательно, соответствующие участки цепи мРНК анти-параллельны. Предварительные данные по электронно-микроскопической локализации меченых 5' и 3' концов мРНК в полисомах указывает на их пространственную сближенность у одного из торцов двурядной полисомы. Таким образом, ход цепи мРНК в двурядной полисоме оказывается кольцевым, что подтверждает предложенную ранее модель ее циркулярной организации.

## **ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ 5'-НЕТРАНСЛИРУЕМОЙ ОБЛАСТИ мРНК НА ИНИЦИАЦИЮ ТРАНСЛЯЦИИ У ЭУКАРИОТ**

**О.М. Алехина, К.С. Василенко, С.Е. Дмитриев, А.С. Спирин**

*olga-alekhina@rambler.ru*

Согласно общепринятой модели, процесс эукариотической инициации трансляции включает связывание кэпированного 5' конца мРНК с последующим направленным поиском инициаторного кодона (сканированием). Ранее нами было показано, что продолжительность процесса инициации линейно зависит от длины 5'НТО мРНК. В этой работе мы исследовали зависимость времени инициации от стабильности вторичной структуры 5'НТО. В неструктурированную область 5'НТО мРНК ретротранспозона L1 человека были вставлены взаимно комплиментарные нуклеотидные последовательности, способные образовывать шпильки разной стабильности. Было обнаружено, что хотя включение шпилек с высокой энергией плавления (~50 kcal/mol) существенно уменьшает скорость накопления синтезированного белка, т.е. эффективность инициации, средняя продолжительность процесса инициации остается во всех случаях практически неизменной. Был сделан вывод, что вторичная структура мРНК оказывает влияние не на скорость, как считалось ранее, а лишь на процессивность сканирования. Чтобы показать, что наблюдаемые эффекты определяются именно сканированием 5'НТО при кэп-зависимой инициации, мы использовали альтернативный механизм внутренней инициации, вставляя в природные лидеры разной длины специфическую IRES последовательность из РНК вируса энцефаломиокардита на одинаковом расстоянии от инициаторного кодона. В этом случае время инициации оставалось неизменным при разной суммарной длине 5'НТО. Полученные данные позволяют заключить, что линейная зависимость времени инициации от длины 5'НТО определяется именно процессом сканирования, средняя скорость которого слабо зависит от вторичной структуры лидера.

## **ПРИ КАКОЙ ДЛИНЕ РАСТУЩЕЙ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ РИБОСОМА ПРИОБРЕТАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ К ДЕЙСТВИЮ МАКРОЛИДОВ?**

**Светлов М.С., Спирин А.С. и Колб В.А.**

Участок связывания макролидных антибиотиков (MBS, macrolide binding site), в число которых входит эритромицин, расположен в рибосомном туннеле вблизи пептидилтрансферазного центра рибосомы. Связанный антибиотик не препятствует инициации трансляции и нескольким последующим раундам элонгации полипептидной цепи, однако затем рост цепи останавливается. Поскольку просвет туннеля в районе MBS оказывается существенно суженным, считается, что антибиотик стерически препятствует продвижению синтезируемого пептида вдоль туннеля. В соответствии с этим предположением синтезируемый полипептид также способен препятствовать связыванию макролида с транслирующей рибосомой, перекрывая по мере своего роста доступ к участку связывания антибиотика. Действительно, эритромицин не ингибирует трансляцию на полисомах, несущих растущие полипептиды. Однако длина полипептидов, препятствующих связыванию макролидов, не была экспериментально определена. Теоретическая оценка этой длины, основанная на расстоянии между MBS и пептидилтрансферазным центром рибосомы, приводит к значению в пять аминокислотных остатков. Поэтому принято считать, что растущая полипептидная цепь длиной в пять и более аминокислотных остатков закрывает участок связывания антибиотика и предотвращает его связывание с рибосомой.

Проверяя это предположение, мы определили минимальную длину растущей полипептидной цепи, при которой транслирующая рибосома теряет способность связывать эритромицин. Оказалось, что рибосома становится устойчивой к действию антибиотика (а, следовательно, неспособной его связывать) только после достижения растущим полипептидом длины в 31 и более аминокислотных остатков. Это противоречит принятому объяснению отсутствия ингибирования эритромицином синтеза белка на полисомах. Очевидно, что синтезируемый полипептид не проходит вблизи участка связывания эритромицина с рибосомой (т.е. макролид не является стерическим препятствием для растущей цепи). Возможно, что устойчивость транслирующей рибосомы к действию макролида обусловлена не перекрыванием MBS синтезируемым полипептидом, а тем, что растущая цепь препятствует входу антибиотика внутрь рибосомы, исключая его дальнейшую миграцию к участку связывания.



## **ИССЛЕДОВАНИЕ АДРЕСНО-ИЗМЕНЕННЫХ ФОРМ РНК ОМЕГА-ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ВТМ.**

**Е.А. Согорин, Н.Э. Широких, С.Ч. Агаларов, А.С. Спирин**

*sultan@vega.protres.ru*

5'-нетранслируемая область РНК вируса табачной мозаики (ВТМ), так называемая омега-последовательность, - известный энхансер трансляции. Особенности ее первичной структуры являются отсутствие гуаниловых нуклеотидов, наличие повторяющихся (САА) мотивов в центральной ее части и нерегулярной U-богатой области на 3'-конце последовательности. Ранее в нашей лаборатории было показано, что, несмотря на отсутствие канонических уотсон-криковских взаимодействий, омега-РНК обладает стабильной и компактной структурой в растворе. В настоящей работе проведены исследования адресно-измененных форм РНК омега-последовательности. Были получены три измененных формы омега-РНК: М1 – замена (САА)-богатой центральной части на олиго (U)-последовательность; М2 – три точечных замены А на С в следующих друг за другом (САА) мотивах; М3 – замена 3'-(U)-богатой области на случайную G,C,U-последовательность. Полученные формы наряду с омега-РНК дикого типа были исследованы методами аналитического ультрацентрифугирования и изменения УФ-поглощения при повышении температуры (плавления). В результате исследования было выявлено, что все три изменения, внесенных в структуру омега-РНК дикого типа, приводят к уменьшению ее коэффициента седиментации, нарушению кооперативности плавления и снижению температуры плавления. Сделан вывод, что для поддержания стабильной и компактной структуры омега-РНК необходимы как ее центральная (САА)- богатая часть, так и 3'-концевая U-богатая область. Особо следует подчеркнуть, что всего три точечных замены в (САА)-богатой области приводят к заметной дестабилизации структуры омега-РНК. Последнее может косвенно свидетельствовать в пользу ранее предложенной Ефимовым и Спириным модели, которая предполагает сворачивание участков РНК определенной длины, содержащих последовательные (САА) повторы, в стабильную и компактную тройную спираль.

## **ВКЛАД БЕЛКОВ YB-1 И РАВР В СПЕЦИФИЧЕСКУЮ РЕГУЛЯЦИЮ ТРАНСЛЯЦИИ МРНК YB-1**

**Лябин Д.Н., Елисеева И.А., Скабкина О.В., Овчинников Л.П.**

*lyabin@vega.protres.ru*

YB-1 принадлежит семейству белков с доменом холодового шока. Белок YB-1 участвует практически во всех ДНК- и мРНК-зависимых процессах, а изменение его внутриклеточной концентрации ведет к серьезным изменениям в экспрессии генов на уровне как транскрипции, так и трансляции. Ранее мы показали, что мРНК *YB-1* содержит в своей 3' нетранслируемой области регуляторную последовательность (РП), специфически связывающую два мажорных белка мРНК: YB-1 и поли(А)-связывающий белок (РАВР). Сайты связывания YB-1 и РАВР перекрываются, и два белка конкурируют друг с другом за взаимодействие с этой последовательностью. При этом YB-1 избирательно подавляет трансляцию собственной мРНК в лизате ретикулоцитов кролика, а РАВР, наоборот, ее стимулирует на одном и том же этапе процесса инициации трансляции. В данной работе мы получили мРНК *YB-1* без РП и показали, что трансляция такой мРНК не подвергается ни специфическому ингибированию белком YB-1, ни специфической стимуляции белком РАВР. Таким образом, РП мРНК *YB-1* необходима для YB-1- и РАВР-опосредованной специфической регуляции синтеза YB-1. Далее мы получили мРНК *YB-1* с мутациями в РП, препятствующими специфическому связыванию либо только YB-1, либо только РАВР. В бесклеточной системе трансляции мы исследовали влияние YB-1 и РАВР на трансляцию таких мутантных мРНК *YB-1*. Оказалось, что удаление YB-1-связывающего сайта из мРНК *YB-1* существенно снижает ингибиторное действие YB-1 и снимает позитивный эффект РАВР на трансляцию мРНК *YB-1*. Частичное удаление РАВР-связывающего сайта приводит к неспособности РАВР восстанавливать трансляцию мРНК *YB-1*, подавленную белком YB-1. При этом ингибирующее действие YB-1 на трансляцию мРНК *YB-1* сохраняется. Эти результаты позволяют заключить, что YB-1 обладает прямым ингибирующим действием на собственный синтез, в то время как позитивное действие РАВР на трансляцию мРНК *YB-1* обусловлено главным образом способностью РАВР вытеснять YB-1 с РП.

**КРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДВУХДОМЕННОГО N-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА АРХЕЙНОГО РИБОСОМНОГО БЕЛКА P0 (L10) ПОЗВОЛЯЕТ ПРОЯСНИТЬ СТРУКТУРУ ОСНОВАНИЯ «P1-ВЫСТУПА» БОЛЬШОЙ СУБЧАСТИЦЫ АРХЕЙНОЙ РИБОСОМЫ**

**О.В. Кравченко, И.В. Митрошин, В. Пиндл, С.В. Никонов и М.Б. Гарбер**

*garber@vega.protres.ru*

Архейные рибосомные белки P0 и P1, формирующие в большой рибосомной субчастице функционально важный боковой P1-выступ (аналогичный L12-выступу в бактериальных рибосомах), существенно отличаются от бактериальных белков L10 и L12 и близки по первичной структуре эукариотическим рибосомным белкам P0 и P1/P2. Эти белки играют ключевую роль в специфическом взаимодействии рибосомы с факторами элонгации. Показано, что архейный комплекс P0-P1 может *in vitro* замещать в рибосоме *Escherichia coli* комплекс L10-L7/L12, причем, получившаяся гибридная рибосома начинает узнавать архейные и эукариотические факторы элонгации и перестает узнавать свои бактериальные факторы.

Структура рибосомной 50S субчастицы из археи *Haloarcula marismortui* была определена десять лет тому назад с разрешением 2.4 Å, но P1-выступ в этой модели отсутствовал полностью. Позднее структура N-концевого домена белка P0 (гомолога белка L10) была локализована в этой модели 50S субчастицы на уровне низкого разрешения. Нашей группе удалось определить структуру двухдоменного N-концевого фрагмента белка P0 из археи *Methanococcus jannaschii*, второй домен которого соответствует специфической для архей и эукариот вставке в аминокислотной последовательности этого белка. Встраивание полученной нами структуры в модель рибосомной 50S субчастицы *H.marismortui* позволяет существенно уточнить структуру основания P1-выступа архейной рибосомы. Более того, встраивание нашей структуры в модели комплексов бактериальной рибосомы с факторами элонгации показывает каким образом специфический домен архейного белка P0 может мешать связыванию бактериальных факторов гибридными рибосомами *E. coli*.

## **БЕЛОК YB-1 И ЕГО ФРАГМЕНТ AP-CSD ОБЛАДАЮТ СПОСОБНОСТЬЮ К МОЛЕКУЛЯРНОЙ САМОСБОРКЕ В ПРОТЯЖЕННЫЕ ТЯЖИ ДЛИНОЙ НЕСКОЛЬКО МИКРОМЕТРОВ**

**Сердюк И.Н., Гурьянов С.Г., Селиванова О.М., Енин Г.А., Овчинников Л.П.**

serdyuk@vega.protres.ru

В последние годы интерес к белку YB-1 лавинообразно растет. Это связано с обнаружением его способности связываться со многими биологическими макромолекулами, включая ДНК и РНК. Недавно нами было открыто новое удивительное свойство белка YB-1 – способность к молекулярной самосборке, выражающаяся в образовании в 2М LiCl протяженных тяжей, линейные размеры которых доходят до нескольких микрометров.

Поскольку белок YB-1 состоит из трех доменов: небольшого N-концевого домена (AP), домена холодового шока (CSD) и протяженного C-концевого домена (С-домен), то естественно возникает вопрос о том, способна ли образовывать тяжи какая-то часть белка. Наши исследования показали, что такими свойствами обладает фрагмент YB-1, состоящий только из доменов AP и CSD (AP-CSD). Более того, оказалось, что способность к молекулярной самосборке проявляется у фрагмента AP-CSD не только в 2М LiCl, но и в физиологическом буфере, содержащем 150 мМ KCl. Интересно, что такой способностью не обладает фрагмент YB-1, содержащий помимо доменов AP и CSD половину С-домена.

Детальное исследование полноразмерного белка и его AP-CSD фрагмента методами седиментации, атомно-силовой и электронной микроскопии позволило выявить ряд характерных особенностей образования тяжей. Они включают в себя полиморфизм, наличие ядер (зародышей) образования тяжей, полярность, наличие порядка (периода) в образуемых тяжях и явно выраженную зависимость длины образуемых тяжей от времени.

Поскольку фрагмент AP-CSD образует тяжи в физиологическом буфере, то принципиальный интерес приобретает исследование образования им фибрилл в клетке и его возможной физиологической роли. Кроме того, предстоит понять, как соотносится найденная нами способность белка YB-1 и его фрагментов образовывать протяженные тяжи с его известными ранее способностями взаимодействовать с большим числом молекулярных партнеров.

## **ИДЕНТИФИКАЦИЯ РЯДА ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ РИБОСОМАЛЬНЫХ БЕЛКОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОТООНКОГЕНОВ МЕТОДОМ ТРАНСГЕНЕЗА ПЛОДОВОЙ МУШКИ *DROSOPHILA MELANOGASTER***

**Аверков В.С., Крючков М.В., Хаустов С.А., Плешкова Н.А., Катанаев В.Л.**

*vladimir.katanaev@uni-konstanz.de*

*D. melanogaster* - популярный модельный организм, сыгравший огромную роль в выяснении базовых законов генетики и клеточной биологии. Все более распространенными становятся дрозофильные модели различных заболеваний человека.

Мы поставили целью провести скрининг человеческих белков - потенциальных протоонкогенов на основе высокопроизводительного трансгеноза дрозофилы кДНК-библиотекой, приготовленной из раковой ткани молочной железы. Конечной целью проекта HumanaFly является создание исчерпывающей коллекции линий трансгенных мушек, несущих человеческие белки, суперэкспрессия которых приводит к нарушению развития глаза дрозофилы. На данный момент нами получено около десятка таких линий, в том числе линии, экспрессирующие рибосомальные белки: P0 (L10), L3 и S12. Среди этих белков суперэкспрессия P0 приводит к довольно редкому фенотипу 'glazed'. Этот "зеркальный" фенотип наблюдается при суперпроизводстве фактора роста Wnt. Известно, что P0 и Wnt избыточно экспрессируются в раковых клетках молочной железы, причем суперэкспрессия Wnt рассматривается как одна из основных причин ракового перерождения этой ткани. Мы показали, что снижение экспрессии Wnt в клетках глаза приводит к значительному восстановлению нормального развития глаза мушек, суперэкспрессирующих P0. Таким образом, наша рабочая гипотеза предполагает, что суперпроизводство рибосомального белка P0 как в глазу дрозофилы, так и в клетках молочной железы приводит к избыточному синтезу фактора роста Wnt. Последний в свою очередь вызывает нарушение развития глаза у дрозофилы и раковое перерождение у человека. Дальнейшие эксперименты на дрозофиле и человеческих культурах клеток необходимы для подтверждения нашей модели. Наши результаты доказывают действенность подхода HumanaFly как инновативного метода выявления новых протоонкогенов и механизмов их действия.

## **ТРАНСПОРТНЫЙ КОМПАРТМЕНТ МЕЖДУ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКИМ РЕТИКУЛУМОМ И АППАРАТОМ ГОЛЬДЖИ КАК ОРГАНИЗАТОР КЛЕТОЧНЫХ МИКРОТРУБОЧЕК**

**Бродский И.Б., Надеждина Е.С.**

nadezhdina@vega.protres.ru

Микротрубочковый цитоскелет в эукариотических клетках служит «рельсами» для направленного транспорта различных клеточных компонентов на значительные расстояния. В радиальной сети микротрубочек их минус-концы собраны в центре, где часто находится centrosoma, а плюс-концы расположены на периферии клетки, что создает общую анизотропию цитоплазмы. Установлено, что радиальная система микротрубочек может образовываться и без участия centrosoma. В частности, это происходит в бесcentrosомных цитопластах культивируемых эпителиальных клеток HeLa и BSC-1. Предполагают, что формирование бесcentrosомной радиальной сети микротрубочек идет за счет самоорганизации микротрубочек и мембран аппарата Гольджи (АГ), поскольку мембраны АГ концентрируются в центре цитопластов и могут нуклеировать микротрубочки и передвигаться по ним. Однако ингибирование сборки компактного АГ воздействием брeфeлдина А не препятствовало возникновению радиальной системы микротрубочек в цитопластах. Мы предположили, что в организации микротрубочек участвует мембранный транспортный компартмент между эндоплазматическим ретикулумом (ЭР) и АГ, сохраняющийся в брeфeлдине. Для проверки этого предположения получили бесcentrosомные цитопласты из клеток, синтезирующих доминантно-негативный мутант ГТФазы Sar1a – Sar1a[T39N], ингибирующий экспорт белков из ЭР. Оказалось, что такие цитопласты не могли эффективно образовывать радиальную систему микротрубочек без участия centrosoma, в отличие от цитопластов, синтезирующих Sar1a дикого типа или конститутивно-активную Sar1a[H79G]. При синтезе в клетках или в цитопластах Sar1a[H79G] транспортный компартмент образовывал кластеры в центре клеток, причем образование кластера зависело от микротрубочек и от целостности динеин-динактинового комплекса. При нарушении последнего Sar1a-содержащие везикулы диспергировались по цитоплазме, и система микротрубочек делалась хаотичной.

Таким образом, в организации радиальной системы микротрубочек участвует мембранный транспортный компартмент между ЭР и АГ.

Работа поддержана грантом РФФИ № 08-04-01697а.

## **ФАКТОРЫ, ЗНАЧИМЫЕ ДЛЯ ОБРАЗОВАНИЯ СТРЕССОВЫХ ГРАНУЛ**

**Е.М. Чудинова, А.А. Саблина, П.А. Иванов, Е.С. Надеждина**

*chudiel@mail.ru*

Стрессовые гранулы (СГ) –РНП-структуры, образующиеся в цитоплазме клеток в результате воздействия различных стрессовых факторов. Считается, что СГ возникают в результате ингибирования трансляции на стадии инициации. Однако СГ не всегда образуются в ответ на прекращение синтеза белка. Мы исследовали зависимость образования СГ от значений рН культуральной среды. Оказалось, что понижение рН культуральной среды до 6,0 ингибирует как образование СГ под воздействием арсенита натрия, так и растворение предобразованных СГ под воздействием циклогексимида. При внешнем рН 6,0 также полностью прекращалось движение СГ в цитоплазме.

Другой фактор, влияющий на образование СГ- целостность микротрубочек. Ранее нами и другими исследователями было показано ухудшение образования СГ в клетках с разрушенными микротрубочками. Мы решили провести более детальное исследование этого явления.

Как показали наши исследования, разрушение системы микротрубочек полностью препятствует образованию СГ при воздействии низких концентраций арсенита натрия в течение 30 минут. При более длительной инкубации СГ начинают возникать в части клеток, и со временем (до 2-3 часов) доля клеток с Сг увеличивается. При увеличении концентрации арсенита в клетках с разрушенными микротрубочками также образуются СГ. СГ, образованные при разрушенных клеточных микротрубочках, отличаются от контрольного варианта мелкими размерами и хаотичностью расположения. Пороговые значения концентрации арсенита, необходимые для быстрого формирования стрессовых гранул, зависят от линий клеток. Мы предполагаем, что процесс формирования СГ состоит из двух стадий – на первой стадии происходит образование мелких СГ «зерен», на второй – слияние их между собой и формирование крупных структур, которые располагаются в цитоплазме в виде характерного кольца. Микротрубочки участвуют на обеих стадиях этого процесса, причем слияние СГ зависит от их перемещений в цитоплазме.

Работа поддержана грантом РФФИ 10-04-01107-а.

## ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ СКРИНИНГ КЛЕТОК В ДВУМЕРНОМ ФОРМАТЕ

**Гордеев А.А., Саматов Т.Р., Четверина Е.В., Четверин А.Б.**

*a.a.gordeev@gmail.com*

Сейчас все большее применение находят методы высокоэффективного скрининга клеток. В частности, такие методы требуются для анализа и извлечения индивидуальных клонов из геномных библиотек размером до  $10^{12}$  последовательностей.

Для решения этой проблемы разработана технология слитых гелей, позволяющая иммобилизовать клетки в виде монослоя. Это дает возможность одновременно наблюдать и сравнивать огромное число клеток, а также подвергать клетки различным обработкам *in situ* без изменения их расположения. В данной работе использовали акриламид-акриламидные и акриламид-агарозные слитые гели, в которых иммобилизовали клетки прокариот (*Escherichia coli*) и эукариот (НЕК 293). Разрешающая способность метода составляет  $10^5$  клеток прокариот или  $10^3$  клеток эукариот на  $1 \text{ мм}^2$  поверхности слитого геля.

Клетки, трансформированные плазмидой, кодирующей GFP (зеленый флуоресцирующий белок), регистрировали по их флуоресценции. Проведен модельный скрининг клеток *E.coli* и продемонстрирована возможность обнаружения единственной клетки, продуцирующей GFP, на фоне 10000 клеток, не содержащих данного белка.

Иммобилизованные клетки сохраняют жизнеспособность и способность к размножению. В слитых гелях, помещенных в питательную среду, клетки *E. coli* растут, делятся и образуют микроколонии. Показано, что клетки из таких микроколоний можно извлечь и перенести на питательный агар, где они вырастают и формируют обычные колонии.

Предложенный метод позволяет проводить высокоэффективный скрининг клеток, их подращивание и последующее извлечение интересующих клонов. Таким образом, разработанный метод может потенциально стать эффективной альтернативой современным методам скрининга клеток, таким как выращивание колоний клеток на питательном агаре или проточная цитометрия.



## ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВОГО БЕЛКА, УЧАСТВУЮЩЕГО В РЕГУЛЯЦИИ ПОДВИЖНОСТИ АРХЕЙ

Алатырев А. Г., Пятибратов М. Г., Галева А. В.

*artem.alatyrev@gmail.com*

Многие бактерии и археи обладают двухкомпонентной системой хемотаксиса, включающей набор консервативных белков (рецепторы сигнала, гистидин-киназа CheA, аспартат-киназа CheY). Бактериальные белки хемотаксиса гомологичны археальным и имеют общее эволюционное происхождение. В то же время, представители этих двух царств резко отличаются по белковому составу жгутикового мотора и самого жгутика. Гомологи белков, составляющих бактериальный мотор, у архей отсутствуют. До настоящего времени археальный мотор мало изучен: исследования касаются в основном внешней нити жгутика. У бактерий хорошо изучено как устройство мотора, так и весь путь передачи сигнала при хемотаксисе. В частности установлено, что взаимодействие фосфорилированной (активированной) формы CheY с белком мотора FliM приводит к изменению вращения жгутика.

До сих пор оставалось неясным, каким образом высококонсервативная система хемотаксиса регулирует работу археального двигательного аппарата. Очевидно, что имеется специфический археальный белок-регулятор для сопряжения систем хемотаксиса и подвижности. Мы провели сравнительный анализ геномов архей и выявили ген, названный нами «*cheM*», который присутствует только у подвижных архей, имеющих систему хемотаксиса. Этот консервативный ген не имеет гомологов ни у бактерий, ни у эукариот. Мы показали, что делеция данного гена у клеток галофильного археона *Halobacterium salinarum* R1 приводит к полному нарушению хемотаксиса, хотя клетки при этом остаются подвижными. Кроме того, было показано, что белок CheM из *H. salinarum* совыделяется с CheY, в условиях активации. Специфичное взаимодействие между CheM и CheY, также было нами показано на примере белков из гипертермофильного археона *Pyrococcus horikoshii*. Таким образом, открытое нами новое семейство специфичных археальных белков, уникально и строго необходимо для регуляции подвижности. Мы полагаем, что белок CheM выполняет адапторную функцию между универсальной для бактерий и архей системой хемотаксиса и специфическим археальным двигательным аппаратом.

## **ОБЛАСТЬ ГЕНОВ $\tau$ РНК T5-ПОДОБНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ НЕЗАКОННОЙ РЕКОМБИНАЦИИ**

**Глухов А.С., Крутилина А.И., Марченков В.В., Ксензенко В.Н.**

*gltol@rambler.ru*

Механизмы протекания незаконной рекомбинации изучены довольно плохо. Во многом это связано с отсутствием удобных модельных систем, в которых бы наблюдалась достаточно высокая частота таких рекомбинационных событий. Попытка создания системы для исследования механизмов незаконной рекомбинации была предпринята в данном исследовании. Используя ранее сделанное наблюдение о том, что делеционные мутанты T5-подобных бактериофагов обладают повышенной устойчивостью к нагреванию в присутствии хелатирующих агентов, нами была получена представительная коллекция делеционных мутантов фага T5 (несколько сотен мутантных фагов). Было проведено точное картирование границ делеций у более тридцати мутантов. Их анализ показал, что для протекания рекомбинационного процесса такого типа требуется наличие коротких (2-19 н.п.) прямых повторов в ДНК. Методом "ПЦР реального времени" была определена частота возникновения шести индивидуальных делеций в популяции фага T5 дикого типа, а также у T5-подобных фагов BF23 и CEV2. Прежде всего следует отметить, что частота возникновения делеций в популяции фага T5 может достигать очень высоких величин ( $\sim 5 \times 10^{-5}$ ). В целом, наблюдалась корреляция между частотой возникновения делеций и длиной прямых повторов. На основании данных о частоте возникновения делеций у фагов BF23 и CEV2, у которых отсутствует большинство генов сайт-специфических эндонуклеаз фага T5, было выдвинуто предположение о том, что в инициации возникновения делеций может принимать участие одна из них. Также было показано, что процесс возникновения делеций не зависит от рекомбиназы хозяина – RecA.

Основным результатом данной работы можно считать создание удобной модельной системы для изучения механизмов незаконной рекомбинации.

Работа была частично финансирована Российским фондом фундаментальных исследований (08-04-01690).

**ХИМЕРНАЯ Q $\beta$ -РЕПЛИКАЗА, СОДЕРЖАЩАЯ ТЕРМОФИЛЬНЫЙ EF-Ts**

**Васильев Н.Н., Тнимов З.К., Угаров В.И., Дженнер Л.Б.\*, Юсупов М.М.\*, Четверина Е.В., Четверин А.Б.**

\*IGBMC, Illkirch, France

**nikita.vasiliev@rambler.ru**

Q $\beta$ -репликаза – РНК-зависимая РНК полимераза бактериофага Q $\beta$ , является гетеротетрамерным белковым комплексом, состоящим из кодируемой фагом каталитической  $\beta$ -субъединицы и трех белков клетки-хозяина *Escherichia coli*, обычно занятых в процессе трансляции: факторов элонгации Tu и Ts и рибосомного белка S1. Изучение структуры Q $\beta$ -репликазы необходимо для выяснения механизма узнавания и репликации РНК, а также помогло бы лучше понять роль EF-Tu, EF-Ts и S1 в синтезе белка на рибосоме. Получить кристаллы Q $\beta$ -репликазы дикого типа не удастся, вероятно, из-за недостаточной стабильности и жесткости ее молекулы. В данной работе мы попытались увеличить стабильность Q $\beta$ -репликазы путем замены белков *E. coli* (Eco) на их аналоги из термофильной бактерии *Thermus thermophilus* (Tth).

Белок S1 легко диссоциирует от Q $\beta$ -репликазы. Полученный трехсубъединичный кор-фермент обладает такой же активностью в поли(С)-зависимой реакции, как и четырехсубъединичный холофермент, но существенно меньшей способностью реплицировать природные матрицы. Добавление к кор-ферменту белка Eco S1 восстанавливает репликационную активность, тогда как добавление Tth S1 приводит к полному ингибированию репликационной активности. Последнее указывает на способность Tth S1 специфически взаимодействовать с кор-ферментом, однако прочного комплекса получить не удастся.

Eco EF-Ts может быть обменян на Tth EF-Ts как в денатурирующих, так и в нативных условиях, в которых Q $\beta$ -репликаза проявляет максимальную активность: при относительно низкой ионной силе (50-100 мМ NaCl) и температуре около 30°C. С еще большей эффективностью химерную молекулу, содержащую Tth EF-Ts, можно получить *in vivo* при совместной экспрессии в клетках *E. coli* генов, кодирующих  $\beta$ -субъединицу и Tth EF-Ts. Несмотря на то, что Tth EF-Ts меньше, чем Eco EF-Ts, химерная репликаза имеет больший молекулярный вес, чем репликаза дикого типа. Это, по-видимому, связано со способностью Tth EF-Ts образовывать димер и в таком виде связывать две молекулы EF-Tu. В условиях, оптимальных для белка дикого типа, химерная репликаза обладает такой же активностью – как в поли(С)-зависимой реакции синтеза поли(Г), так и при репликации природных матриц (RQ РНК). В то же время, химерная репликаза обладает повышенной термостабильностью: она теряет половину активности после 10-минутной инкубации при 40°C, в то время как репликаза дикого типа уже при 30°C. Вероятно благодаря повышенной стабильности, кор-фермент химерной репликазы способен кристаллизоваться.

В отличие от EF-Ts, Eco EF-Tu не может быть заменен на термофильный аналог ни при каких условиях, в том числе, если для обмена использовать готовый комплекс Tth EF-Tu·EF-Ts.

## **МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ СОМАТИЧЕСКОГО ГИПЕРМУТИРОВАНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫХ ГЕНОВ**

**Благодатский А.С., Катанаев В.Л.**

Институт белка РАН, г. Пушкино;

*bswin2000@gmail.com*

Соматическое гипермутирование иммуноглобулиновых генов - уникальное явление, воспроизводящее в ускоренном темпе процесс эволюции и направленного отбора для популяции В-лимфоцитов отдельно взятого организма. Биологический смысл соматического гипермутирования – в повышении аффинности вырабатываемых организмом антител, однако, его исследование помимо расширения области знаний о генетике иммуноглобулинов, поможет применить механизмы используемой организмами позвоночных «молекулярной эволюции» в области биотехнологии, а также понять природу связанного с абберрантным гипермутированием канцерогенеза.

Целью настоящей работы являлся поиск и характеристика цис-действующих элементов, контролирующих соматическое гипермутирование. Нами была создана репортерная конструкция на основе зелёного флуоресцентного белка, позволяющая количественно оценивать интенсивность соматического гипермутирования на модели линии куриных В-лимфоцитов DT40. В ходе экспериментов по делециям и инсерциям последовательностей локуса легкой цепи иммуноглобулинов курицы нами охарактеризована цис-действующая последовательность ДНК, необходимая и достаточная для индукции соматического гипермутирования в любом геномном локусе. Эту последовательность размером 9,8 тыс. п.о мы назвали элементом DIVAC от англ. «активатор диверсификации». Элемент DIVAC способен действовать, находясь по обе стороны от репортерной конструкции и на достаточно больших расстояниях.

В качестве прикладного использования соматического гипермутирования мы разработали систему «искусственной эволюции» в приложении к белкам-агонистам Wnt-Frizzled сигнального каскада. Этот каскад контролирует пролиферацию и дифференцировку клеток, и его улучшенные агонисты, полученные в ходе искусственной эволюции могут выступать в роли препаратов для культивирования стволовых клеток, средств для регенерационной медицины и терапии болезни Альцгеймера.

## **ИЗБИРАТЕЛЬНАЯ СТАБИЛИЗАЦИЯ ПРОМЕЖУТОЧНОГО СОСТОЯНИЯ АПОМИОГЛОБИНА ФОСФОЛИПИДНОЙ МЕМБРАНОЙ**

Балобанов В.А., Ильина Н.Б., Кашпаров И.А., Бычкова В.Е.

*uralm62@rambler.ru*

Фосфолипидная мембрана является важным фактором, влияющим на структуру белков. Её влияние важно как для мембранных белков, так и для белков водорастворимых. Было показано что искусственные фосфолипидные мембраны способны вызывать переход апомиоглобина в промежуточное состояние. Промежуточные состояния являются критическими в сети конформационных состояний белка и поэтому исследование деталей процесса взаимодействия глобулярного водорастворимого белка с мембраной представляется интересным и необходимым.

В качестве модельной системы было исследовано взаимодействие апомиоглобина с малыми бислойными везикулами, получаемыми из отрицательно заряженного пальмитоилолеилфосфотидилглицерина (POPG) или его смеси с нейтральным пальмитоилолеилфосфотидилхолином (POPC).

Показано, что фосфолипидная мембрана стабилизирует промежуточное состояние апомиоглобина относительно нативного и развёрнутого и, вследствие этого, может выступать как умеренно денатурирующий агент для нативного состояния и как структурирующий для развёрнутого. Процесс взаимодействия проходит как минимум в две стадии. Общая его скорость зависит от удельного заряда мембраны и понижается с уменьшением доли отрицательно заряженных фосфолипидов. При исследовании взаимодействия мутантных форм апомиоглобина с везикулами показано, что скорость первой стадии хорошо коррелирует со стабильностью нативного состояния белка. По всей видимости, эта стадия соответствует денатурации белка под воздействием мембраны и его взаимодействию с везикулами. Скорость второй стадии мало зависит от замены и, скорее всего, соответствует перестройкам в структуре белка, уже связанного с фосфолипидной мембраной и лишённого своей плотной упаковки.

Работа поддержана программой МКБ РАН, грантами РФФИ(09-04-01348), ФАНИ(02.770.11.0295) и ННМИ(55005607) А.В. Финкельштейна.

**μ-АНАЛИЗ – ХОРОШО, ф-АНАЛИЗ – ПЛОХО, ИЛИ ПОЧЕМУ НЕКОТОРЫЕ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ НЕ ПРИМЕНИМЫ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ  
МНОГОСТАДИЙНО СВОРАЧИВАЮЩИХСЯ БЕЛКОВ.**

**Мельник Т.Н, Поварницына Т.В, Евдокимов С.Р, Дудина М.А, Мельник Б.С.**

*bmelnik@phys.protres.ru*

Интенсивные экспериментальные и теоретические исследования процесса самоорганизации небольших глобулярных белков, сворачивающихся по одностадийному механизму, показали, что приобретение такими белками нативной структуры инициируется ядрами сворачивания, формирующимися в переходном состоянии на вершине энергетического барьера, разделяющего нативное и полностью развернутое состояния. Для изучения ядер сворачивания, то есть остатков, влияющих на формирование энергетического барьера, одностадийно сворачивающихся белков, в настоящее время используется экспериментальный подход (□-анализ) который заключается в изучении скоростей сворачивания/разворачивания мутантных белков с одиночными заменами аминокислотных остатков (в основном гидрофобных) при разных концентрациях денатуранта. Такие исследования позволяют рассчитать вклад замененных аминокислот в стабильность нативного и переходного состояний белка. В данной работе на примере белков, сворачивание которых проходит через формирование одного или нескольких промежуточных состояний (миоглобин, карбоксиангидраза и зеленый флуоресцентный белок) показано, что ф-анализ оказывается неинформативным при исследовании таких белков. При этом нами предложен новый подход, который заключается в исследовании мутантных белков с внесенными дисульфидными связями (μ-анализ). Показано, что такой подход позволяет получить информацию о влиянии разных элементов вторичной структуры белка на энергетические барьеры, разделяющие разные промежуточные состояния белка. (Работа поддержана программами «Молекулярная и клеточная биология», ФЦП № 02.740.11.0295 и ФЦП № П304 и грантом «Научная школа» (НШ-2791.2008.4)

## «ЗОЛОТОЙ ТРЕУГОЛЬНИК» ДЛЯ СКОРОСТЕЙ СВОРАЧИВАНИЯ ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ

**С. А. Гарбузинский\*, Д. Н. Иванков, Н. С. Богатырёва, А. В. Финкельштейн**

\* Электронная почта: [sergey@alpha.protres.ru](mailto:sergey@alpha.protres.ru)

Ранее нами было теоретически показано, что: (1) скорость сворачивания однодоменного глобулярного белка, в точке термодинамического равновесия его нативного и денатурированного состояний, должна лежать в пределах  $10^8 \text{ с}^{-1} \times \exp\left(-\frac{1}{2}L^{2/3}\right) \div 10^8 \text{ с}^{-1} \times \exp\left(-\frac{3}{2}L^{2/3}\right)$ , где  $10^8 \text{ с}^{-1}$  – определенная на опыте скорость конформационной перестройки одного аминокислотного остатка, а  $L$  – число остатков в цепи белка; (2) если  $\Delta G$  – разность свободной энергии нативного и денатурированного состояния белка, то скорость его сворачивания должна падать примерно в  $\exp(-\Delta G/2RT)$  раз, где  $T$  – температура, а  $R$  – газовая постоянная. Кроме того, по понятным биологическим причинам, скорости сворачивания белков не должны быть меньше, чем  $\sim 10^{-3} \div 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ . Очерченные выше условия создают «золотой треугольник», в который, теоретически, должны попадать скорости сворачивания однодоменных глобулярных белков любой величины и стабильности. Теперь мы показываем, что все наблюдаемые на опыте скорости сворачивания белков – а их около двух сотен – действительно, попадают в этот «золотой треугольник». Кроме того, мы предсказываем (1) предел величины белкового домена, самоорганизация которого находится под чисто термодинамическим контролем, и (2) максимально возможный размер однодоменного глобулярного белка или белкового домена. Работа выполнена при поддержке Программы "Молекулярная и клеточная биология" Президиума РАН, Федерального агентства по науке и инновациям (грант № 02.740.11.0295), Гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских учёных (МК-4894.2009.4) и Howard Hughes Medical Institute (международный грант № 5500560).

**ПРЕДСКАЗАНИЕ ЯДЕР СВОРАЧИВАНИЯ В МОЛЕКУЛАХ РНК****Л.Б. Переяславец, М.В. Баранов, Е.И. Леонова, О.В. Галзитская**

e-mail: ogalzit@vega.protres.ru

*Цели и мотивации:* Предсказание как самого процесса сворачивания РНК, так и высоты барьера переходного состояния, который характеризует скорость сворачивания/разворачивания биополимера, а также обнаружение нуклеотидов, вовлеченных в ядро сворачивания РНК - все это является важной задачей для решения основных проблем в исследованиях, связанных с изучением молекул РНК. Предсказание ядер сворачивания РНК дает возможность по-новому взглянуть на проблему возможных путей сворачивания нуклеотидных последовательностей РНК, на стабильность структуры РНК, а также вопросов, связанных с неправильным сворачиванием РНК и др.

*Методы и алгоритмы:* За основу был взят алгоритм поиска ядер сворачивания в молекулах белков, разработанный ранее, который был адаптирован к РНК. Энергия  $E(I)$  промежуточных структур на пути сворачивания/разворачивания конкретной молекулы РНК, вычислялась на основе экспериментально полученных структурных и энергетических параметров. Нами был смоделирован процесс разворачивания РНК с помощью метода динамического программирования в точке термодинамического равновесия, где свободные энергии нативного и развернутого состояния равны друг другу. Свободная энергия промежуточной структуры вычислялась следующим образом:  $F(I) = E(I) - T[\sigma N_{free.nucl} + S_{loops}]$ , где  $\sigma$  характеризует энтропию конкретного нуклеотида, находящегося в развернутой части молекулы РНК. Этот параметр может быть рассчитан при уравнивании свободных энергий нативного и развернутого состояний в точке термодинамического равновесия.

*Результаты:* Для того чтобы предсказать ядро сворачивания структуры РНК, мы рассчитывали значения  $\Phi$ -величин для каждого из нуклеотидов конкретной цепи РНК. Значения  $\Phi$ -величин нуклеотидных остатков РНК идентичны по смыслу таковым в аминокислотных остатках белков. Таким образом, нами было рассмотрено около 120 РНК, с известной трехмерной структурой. Хотя в настоящий момент существует мало экспериментальных работ, которые бы строго описывали ядро сворачивания какой-либо РНК, наши результаты косвенно соотносятся с экспериментальными данными по сворачиванию тРНК и домена Р4-Р6 рибозима *Tetrahymena* интрона I группы. *Благодарности:* Работа выполнена при поддержке программы «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН (01200959110), Федерального агентства по науке и инновациям, а также Российского фонда фундаментальных исследований (08-04-00561, 10-04-00162-а).



## **МОДЕЛИРОВАНИЕ СВОРАЧИВАНИЯ АЛЬФА-СПИРАЛЬНЫХ БЕЛКОВ**

**Глякина А.В., Галзитская О.В.**

*ogalzit@vega.protres.ru*

Важный вопрос, который поднимается в данной работе, может ли моделирование сворачивания уловить разницу между сворачиванием структурно похожих белков, но с различным механизмом сворачивания. В данной работе проведено моделирование сворачивания четырех  $\alpha$ -спиральных белков из семейства гомеодоменов, близких по размеру, используя методы Монте-Карло и динамического программирования. Методом Монте-Карло определена наиболее часто встречающаяся последовательность сворачивания  $\alpha$ -спиралей для каждого белка. Продемонстрирована корреляция между экспериментальной скоростью сворачивания и числом монте-карловских шагов. Определены аминокислотные остатки, важные для сворачивания с помощью метода динамического программирования. Выделенные участки коррелируют с последовательностью сворачивания элементов вторичной структуры в рассматриваемых белках, как в эксперименте, так и при моделировании.

Работа выполнена при поддержке Программы "Молекулярная и клеточная биология" Президиума РАН и Федерального агентства по науке и инновациям.

**МОДЕЛИРОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ АМИЛОИДНЫХ СТРУКТУР****Довидченко Н.В., Галзитская О.В.***bones@phys.protres.ru*

Образование амилоидных фибрилл имеет нуклеационную природу, в то же время не совсем ясно какой из процессов при образовании ядра является лимитирующим. Ранее полагалось, что формирование амилоидных структур возможно только из полностью или частично денатурированного белка. Последние экспериментальные данные свидетельствуют, что образование фибрилл возможно так же и из нативного состояния. Целью нашей работы являлась разработка математической модели роста амилоидной фибриллы на основе последних экспериментальных данных. Была построена кинетическая схема, описывающая включение мономеров в различных стадиях роста фибриллы: первая стадия характеризуется переносом будущих мономеров из пула белков с нативной структурой в пул белков с нативо-подобным состоянием, в котором белки уже способны образовывать агрегаты. После накопления достаточного количества мономеров (белков в нативо-подобном состоянии) образуются олигомеры. Олигомерные частицы могут, как увеличиваться, так и уменьшаться путем присоединения/диссоциации мономеров. Олигомерные частицы нестабильны и их нестабильность максимальна при достижении критического размера. В тоже время олигомеры критического размера способны претерпевать структурные перестройки и образовывать зародыши новой фазы – амилоидные фибриллы минимального размера. Такие зародыши, как и амилоидные фибриллы, являются стабильными и способны только увеличиваться за счет присоединения мономеров. Компьютерные симуляции показали, что модель корректно описывает наблюдаемые в эксперименте стадии роста амилоидных фибрилл. На основе данных полученных из модели были сделаны выводы о значимости каждой из стадий в процессе сборки амилоидных фибрилл.

Работа выполнена при поддержке Программы "Молекулярная и клеточная биология" Президиума РАН, Федерального агентства по науке и инновациям и фонда Дмитрия Зимина «Династия».

## **ЗАМКНУТЫЕ В ЦИКЛЫ СТРУКТУРЫ В БЕЛКАХ, СОДЕРЖАЩИХ $\beta$ -УГОЛКИ**

**Е.А. Бошкова, А.В. Ефимов**

В настоящей работе проведён анализ путей роста белковых структур на примере структурного древа  $\beta$ -белков, содержащих  $\beta$ -уголки, и установлено следующее. «Заселенности» различных ветвей древа завершёнными структурами известных белков значительно различаются. Это означает, что разрешенные пути роста структур реализуются в белках с разной частотой и не являются равновероятными. В 67% случаев пристраивание ближайших по цепи одного-двух  $\beta$ -тяжей к корневому  $\beta$ -уголку и в 15% случаев пристраивание трех  $\beta$ -тяжей приводят к образованию замкнутых в циклы или цилиндры структур. Из этого следует, что на первых шагах роста  $\beta$ -уголка реализуются, в основном, те пути, которые ведут к замкнутым структурам. В работе также проведен анализ левых суперспиралей, которые замыкают  $\beta$ -уголки. Показано, что в большинстве участков, которые обеспечивают переход цепи их одного  $\beta$ -слоя в другой, имеются один-два остатка в стерически напряженных  $\alpha_L$ - или  $\varepsilon$ -конформациях, которые должны быть глицинами или остатками с гибкими боковыми цепями, чтобы эти напряжения снять или уменьшить.

## **ЗАМКНУТЫЕ В ЦИКЛЫ СТРУКТУРНЫЕ МОТИВЫ В БЕЛКАХ**

**А.В. Ефимов.**

В работе рассматриваются различные структурные мотивы, которые часто встречаются в белках. Проведен сравнительный анализ замкнутых в различные циклы мотивов, а также их открытых аналогов. Показано, что замкнутые структурные мотивы встречаются в известных белках на порядок (и более) чаще, чем открытые аналоги. Кроме того, большинство структурных мотивов с уникальными укладками полипептидной цепи являются замкнутыми структурами.