

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт белка Российской академии наук

Программа подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре
06.06.01 Биологические науки

**Поиск белков, взаимодействующих с
G-квадруплексами в РНК**

Аннотация выпускной научно-квалификационной работы

Научный руководитель:
академик Л.П. Овчинников



Выпускник:
Д.Н. Поляков



Пушино
2018

1. ВВЕДЕНИЕ

G-квадруплексы (G4) - четырехцепочечные структуры в нуклеиновых кислотах, состоящие из находящихся в стекинге гуаниновых квартетов. Последовательности, образующие G4, найдены в теломерах, промоторах многих генов, на границе интронов и экзонов, в микроРНК и мРНК. Показана важная роль G4 в регуляции репликации, транскрипции и трансляции, защите концов хромосом. G4 играют ключевую роль в развитии некоторых нейродегенеративных заболеваний, таких как боковой амиотрофический склероз и фронтотемпоральная деменция.

Свои функции G4 выполняют взаимодействуя с различными белками. На сегодняшний день известно более 100 белков, взаимодействующих с G4 в ДНК, и всего около 15 в РНК. В то же время появляется все больше доказательств того, что G4 в мРНК играют важную роль в регуляции трансляции. Такое небольшое количество найденных белков-партнеров G4 в РНК объясняется тем, что их поиск, обычно, ведется путем аффинной хроматографии на иммобилизованном олигонуклеотиде, формирующем G4, и до недавнего времени последовательностей, формирующих G4 в ДНК было известно гораздо больше, чем в РНК. Однако при таком подходе используется один олигонуклеотид, в то время как G4, образованные разными последовательностями, могут существенно отличаться по морфологии и, следовательно, связывать разный набор белков.

Мы предлагаем другой подход для поиска белков, специфично взаимодействующих с G4: если мы знаем расположение сайтов связывания белка с мРНК, и знаем расположение G4 в мРНК, мы можем оценить колокализацию G4 и сайтов связывания белка и найти белки, для которых перекрытие между сайтами связывания белка и G4 значительно отличается от случайного.

Постановка и решение данной задачи стали возможны благодаря двум разработанным в 2016 году методам. Во-первых, новый метод

секвенирования G4 в мРНК (rG4-seq), позволил получить данные о расположении более чем 4000 G4. Во-вторых, консорциум ENCODE с помощью eCLIP, разработанной ими модификации протокола определения положения сайтов связывания белка с РНК (iCLIP), получила данные по расположению сайтов связывания 121 РНК-связывающих белков.

Основываясь на этих данных, мы отобрали белки, для сайтов связывания которых наблюдается статистически значимая колокализация с G4. Мы получили генетические конструкции для экспрессии этих белков в *E.coli* и выделили эти белки. Для каждого белка отобрали мРНК, содержащие сайт его связывания с G4 в 5' или 3'НТО и получили генетические конструкции для транскрипции *in vitro* мРНК с кодирующей областью люциферазы и отобранными НТО для проверки влияния G4 на трансляцию.

Недавно было показано, что белок YB-1 специфично связывается с G4, из 5' фрагмента тРНК^{Ала}, образующегося в результате расщепления по антикодону эндорибонуклеазой ангиогенином. В данной работе методом спектроскопии кругового дихроизма (КД) мы проверили, влияет ли YB-1 на структуру G4 5' фрагмента тРНК^{Ала}. Используя полученные в нашей лаборатории данные по расположению сайтов связывания YB-1 и по положению известных квадруплексов в мРНК, мы проверили, имеет ли YB-1 повышенное сродство к мРНК с квадруплексами, чем ко всем остальным мРНК.

Таким образом, у данной работы две цели: поиск белков, специфично взаимодействующих с G4 в мРНК, и изучение влияния белка YB-1 на структуру G4 в РНК.

Для достижения целей были поставлены следующие задачи:

Поиск РНК-связывающих белков, сайты связывания которых обогащены G4, на основе данных по положению G4 (rGQseq) и сайтов связывания РНК-связывающих белков (eCLIP) в мРНК;

Дальнейший отбор белков-кандидатов на основе силы их связывания с G4 и разницы в GC-составе сайтов с G4 и без;

Выделение и очистка отобранных белков;

Отбор G4-содержащих мРНК-мишеней для каждого белка и получение на их основе генетических конструкций в векторе pSP36t для транскрипции *in vitro*;

Изучение влияния белка YB-1 на структуру G4 с помощью спектроскопии кругового дихроизма;

Изучение специфичности YB-1 к G4 с использованием данных высокопроизводительного секвенирования.

