

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт белка Российской академии наук

Программа подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре  
06.06.01 Биологические науки  
Направленность (профиль) – Молекулярная биология

Лободин Кирилл Владимирович

**ПОИСК УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ПРИГОДНОГО ДЛЯ  
КРИСТАЛЛИЗАЦИИ ЭЛОНГАЦИОННОГО КОМПЛЕКСА  
Q $\beta$ -РЕПЛИКАЗЫ С ЗАКОННОЙ МАТРИЦЕЙ**

*Аннотация научно-квалификационной работы*

Научный руководитель:  
д.б.н., чл.-корр. РАН А.Б. Четверин

Выпускник: К.В. Лободин

Пущино  
2019

Q $\beta$ -репликаза является РНК-зависимой РНК-полимеразой бактериофага Q $\beta$ , паразитирующего на клетках *Escherichia coli*. Фермент имеет четвертичную структуру и включает в себя четыре субъединицы – рибосомный белок S1, факторы элонгации трансляции EF-T<sub>i</sub> и EF-T<sub>s</sub>, а также  $\beta$ -субъединицу. Только последняя из перечисленных кодируется геномом бактериофага. Остальные три вирус заимствует у клетки-хозяина. Данный фермент является наиболее эффективной среди всех известных РНК-зависимой РНК-полимеразой и способен к экспоненциальному размножению РНК *in vitro*. Это значит, что при значительном избытке количества белка над количеством РНК в растворе размножение происходит в экспоненциальном режиме – в каждом следующем цикле число молекул РНК удваивается.

Такая высокая эффективность сочетается с исключительно высокой специфичностью фермента. Попадая в клетку, вирус крайне эффективно размножает свой геном с помощью фермента, не трогая при этом клеточные РНК. Помимо геномной РНК, в частицах вируса присутствуют сателлитные RQ РНК (от Replicable by Q $\beta$ -replicase), которые также крайне эффективно размножаются ферментом *in vitro*. Для их размножения (как и для размножения геномной РНК) фермент не использует праймеров или промоторных элементов. Последовательности реплицируемых РНК не гомологичны. Единственные общие последовательности, встречающиеся у всех реплицируемых РНК – это 5'-концевой олиго(G) и 3'-концевой олиго(C) кластеры, включающие по три соответствующих нуклеотида. Однако наличие данных кластеров у РНК не является достаточным условием для её репликации. Так, из примерно  $10^{12}$  уникальных случайных последовательностей РНК, несущих данные кластеры, способность к размножению Q $\beta$ -репликазой удалось детектировать лишь у 54.

Несмотря на долгие годы исследований Q $\beta$ -репликазы, в настоящий момент нет ответа на вопрос о том, какими характеристиками должна обладать РНК, помимо наличия упомянутых олигокластеров, чтобы реплицироваться ферментом. Имеющиеся данные говорят о том, что, в отличие от ДНК-зависимых РНК-полимераз, матричная специфичность Q $\beta$ -репликазы определяется не узнаванием специфической структуры матрицы (промотора) в начале инициации, а способностью перехода в закрытую конформацию – событием, происходящим во время инициации. Данный переход происходит только при инициации на законных матрицах, к которым относятся RQ РНК и геномная РНК фага. В связи с этим наиболее плодотворными для раскрытия загадки высокой специфичности представляются структурные исследования функциональных комплексов фермента и законной матрицы, в которых фермент находился бы в закрытой

конформации. Недавние успехи в структурных исследованиях фермента позволяют вплотную подойти к решению данной задачи.

Решение данной задачи стало целью настоящей работы. А именно, целью стало получение кристаллов элонгационного комплекса, образующегося при репликации законной матрицы, и определение его пространственной структуры.

Первой задачей было получение элонгационного комплекса путём остановки Q $\beta$ -репликазы на определённом шаге. Этого добивались удалением из реакционной смеси одного или нескольких нуклеотидов. Второй задачей был поиск условий кристаллизации полученного элонгационного комплекса. При условии получения кристаллов удовлетворительного качества планировалось определение пространственной структуры элонгационного комплекса.

Несмотря на то, что в настоящей работе заявленная цель не была достигнута, проведённые исследования позволили открыть новые факты, проясняющие механизм копирования RQ РНК.