

**СЕКЦИЯ «БИОЛОГИЯ»****ПОДСЕКЦИЯ «МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ»****Особенности транскрипции генов оперонов хлоропластов.***Алейникова Анастасия Юрьевна, Зубо Ян Олегович**аспирант, научный сотрудник, к.б.н.**Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва, Россия**E-mail: anastasia\_ale@mail.ru*

Часто гены, кодирующие белки одного метаболического пути или определяющие близкородственные функции, регулируются согласованно. Экспрессия таких генов начинается и заканчивается или согласованно продолжается в ответ на один и тот же регуляторный сигнал. Гены, объединенные в опероны, транскрибируются с промотора, находящегося на 5'-конце такой группы генов, в виде единственной молекулы РНК, которая в дальнейшем подвергается процессу «созревания». Часть генов в хлоропластном геноме входит в состав оперонов. Это свойство они унаследовали от своих предшественников - сине-зеленых водорослей. Хлоропласты имеют также прокариотического типа трансляционную систему и характерные для бактерий регуляторные транскрипционные элементы. Однако в процессе эволюции хлоропласты приобрели и некоторые эукариотические признаки - наличие интронов в генах, процесс редактирования РНК и др.

С помощью метода run on транскрипции была изучена интенсивность транскрипции нескольких оперонов пластома ячменя. Основой транскрипционной системы служили лизированные хлоропласты, которые были выделены из первых листьев ячменя разного возраста (4-х, 9-ти и 18-ти дневные). В ходе реакции транскрипции (длительность 10 мин) во вновь синтезированные молекулы РНК включался радиоактивно-меченный УТФ ( $\alpha^{32}\text{P}$ -УТФ), что позволяло в дальнейшем детектировать только вновь синтезированные транскрипты. Ограниченное время реакции практически исключает влияние процессов деградации РНК на количество синтезированных транскриптов. Установлено, что у большинства изученных оперонов гены транскрибируются с различной интенсивностью. Наиболее равномерная транскрипция наблюдалась для *pro*-оперона, содержащего *proB-proC1-proC2* гены. Необходимо отметить, что это, вероятно, единственный оперон пластома ячменя, состоящий только из генов, кодирующих субъединицы одного белкового комплекса (субъединицы РНК-полимеразы бактериального типа). Другие опероны, также несущие большинство генов одной функциональной группы, характеризовались различиями в интенсивности транскрипции генов. Так, у оперона *rps2-atpI-atpH-atpF-atpA* считывание РНК значительно повышалось (в 7-10 раз) для *atpF* гена по сравнению с предыдущими и последующим геном. Транскрипция гена *psaB* в опероне *psaA-psaB-rps14* так же была интенсивнее как минимум вдвое, чем транскрипция первого и последнего генов оперона. Отмечены и значительные изменения в оперонах, содержащих гены, кодирующие компоненты различных функциональных групп хлоропластов. Так оперон *atpB-atpE-trnV-ndhC-ndhK-ndhJ* характеризуется значительно большей интенсивностью транскрипции генов *atpB* и *trnV*, в сравнении с другими генами (превышение в среднем не менее чем в 3 раза).

Таким образом для нескольких оперонов обнаружен эффект значительного различия интенсивности транскрипции индивидуальных генов.

Авторы выражают признательность профессору, д.б.н. Кузнецову В.В. за помощь в подготовке тезисов.

## Консервативность регуляторных элементов, контролирующих экспрессию оперона *rpsB-tsf* у гамма-протеобактерий

Асеев Леонид Викторович

аспирант

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
РАН, Москва, Россия

E-mail: aleroy@yandex.ru

Биосинтез рибосом в *Escherichia coli* является координированным процессом, который регулируется многочисленными механизмами транскрипционного и трансляционного контроля синтеза отдельных компонентов рибосомы. Транскрипция рибосомных РНК (рРНК) чувствительна к условиям среды, в то время как синтез рибосомных белков (р-белков) тесно связан с уровнем рРНК в клетке по механизму отрицательной обратной связи, называемому аутогенной регуляцией. В большинстве оперонов р-белков один из генов кодирует белок-регулятор, который, если синтезируется в избытке по отношению к рРНК, способен действовать в качестве аутогенного репрессора, связываясь с собственной мРНК и подавляя трансляцию. Для многих оперонов механизм регуляции детально изучен. Исключение составляет оперон *rpsB-tsf*, кодирующий рибосомный белок S2 и фактор элонгации трансляции Ts, для которого даже положение промотора оставалось неизвестным. Наша работа посвящена исследованию регуляции этого жизненно важного для бактерий оперона.

Картирование 5'-конца *rpsB* мРНК методом удлинения праймера на тотальной РНК *E.coli* показало, что транскрипция начинается за 162 нуклеотида до инициаторного AUG кодона *rpsB* с единственного промотора, который принадлежит к редкому классу удлинённых -10 промоторов TGTGG TATAAA. Удлинённый -10 элемент промотора *E.coli* отделён от места начала транскрипции GC-богатой областью, характерной для промоторов находящихся под строгим контролем. Последовательность промотора в сочетании с GC-богатой последовательностью перед стартом транскрипции является высоко консервативной среди  $\gamma$ -протеобактерий. Экспериментально подтверждено, что фрагменты ДНК из *E.coli*, *Y.pestis*, *H.influenzae* и *P.aeruginosa* несущие предполагаемый удлинённый *rpsB* промотор, 5'-нетранслируемую область (5'-НТО) и начало кодирующей части *rpsB*-гена, слитые в рамке с *lacZ*-геном, обладают промоторной активностью и управляют синтезом репортерного *lacZ*-гена в *E.coli*. Также была изучена аутогенная регуляция экспрессии гена *rpsB* белком S2 in trans (синтезируемым с плазмиды экспрессирующей ген *rpsB*). Оказалось, что белок S2 из *E.coli* способен ингибировать экспрессию *rpsB*'-*lacZ* даже в тех случаях, когда эти конструкции содержат фрагмент *rpsB* из *Y.pestis*, *H.influenzae* и *P.aeruginosa*. Это наблюдение показывает, что механизмы регуляции оперона *rpsB-tsf* в  $\gamma$ -протеобактериях высоко консервативны. При значительном различии в длине 5'-НТО *rpsB* у разных видов  $\gamma$ -протеобактерий компьютерное моделирование вторичной структуры РНК показало высокую консервативность укладки, что вероятно играет важную роль в регуляции. Несколько специфических элементов последовательности в 5'-НТО оказались универсально консервативными, что предполагает их непосредственное участие в аутогенном контроле. Это предположение было подтверждено экспериментально. Филогенетическая консервативность структур мРНК, участвующих в аутогенной регуляции р-белков в  $\gamma$ -протеобактериях была показана ранее для оперонов *rpsA*, *S10* и *srs*. Наши исследования показывают, что мРНК *rpsB* является ещё одним примером подобной консервативности.

Работа поддержана грантом РФФИ 60-04-4853

**Протеом митохондрий сердца *Bos taurus*: анализ топологии мембранных белков****Барылюк Константин Владимирович<sup>1</sup>, Гринкевич Владимир Антонович<sup>2</sup>**<sup>1</sup>студент, <sup>2</sup>доцент кафедры биоорганической химии, к. х. н.

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

e-mail: constbar@rambler.ru

Расшифровка протеома эукариотической клетки в настоящий момент представляет собой практически неразрешимую задачу из-за сложности белкового состава. В связи с этим митохондрии являются идеальным объектом для протеомного анализа, так как имеют не слишком высокий уровень белковой организации. При этом митохондрии играют важную роль в жизнедеятельности клеток и целого организма. Известно, что митохондриальные дисфункции, связанные с дефектами митохондриальных белков, приводят к развитию более 40 различных заболеваний человека. В данной работе в качестве объекта исследования были выбраны митохондрии сердца *Bos taurus*.

С целью упрощения белкового состава анализируемого объекта был разработан метод выделения митохондриальных компартментов в качестве индивидуальных фракций. Данное сообщение посвящено анализу белков фракции внутренних мембран митохондрий. Для этого использовали сочетание различных методов расщепления белковой цепи с последующим фракционированием полученных пептидов хроматографическими методами. Для идентификации пептидов и соответствующих белков использовали тандемную масс-спектрометрию и специализированные программные продукты. В результате было идентифицировано более 170 индивидуальных белков, для которых проанализировано распределение по локализации в клетке и по функциям. Отдельной задачей исследования было получение информации о топологии идентифицированных мембранных белков. Решение трехмерной структуры мембранных белков представляет собой сложную задачу. Методы рентгеновской кристаллографии и ЯМР-спектроскопии довольно трудоемки, дорогостоящи и требуют больших затрат времени. В то же время результаты таких исследований не всегда дают представление о нативной структуре белка. Существующие в настоящее время вычислительные методы оценки топологии мембранных белков недостаточно точны. Получение информации о топологии мембранных белков протеомными методами имеет очевидные преимущества перед вышеперечисленными методами: меньшие затраты времени, высокая чувствительность и точность, нативность анализируемых белков, высокая производительность. Для изучения топологии белков внутренней мембраны митохондрий был разработан метод получения пептидов, относящихся к экстрамембранным («немембранные») и трансмембранным («мембранные») участкам белковой цепи, в виде отдельных фракций, которые далее анализировали протеомными методами независимо. По идентифицированным пептидам определяли белки, для которых затем можно было определить экстрамембранные участки и трансмембранные тяжи, сравнивая «немембранные» и «мембранные» пептиды с последовательностью целого белка. Для проверки достоверности получаемой информации среди идентифицированных белков выбрали те из них, для которых трехмерная структура была определена методами рентгеноструктурного анализа или ЯМР-спектроскопии. Результаты наших исследований сравнивали с известной трехмерной структурой отобранных белков. Была показана высокая достоверность идентификации и хорошая степень совпадения экспериментальных данных и трехмерной структуры.

**Получение антител к узловой структуре ковалентного соединения РНК  
и терминального белка VPg пикорнавирусов**

**Гаврюшина Елена Сергеевна, Дрыгин Юрий Федорович**

*аспирант, д.х.н., старший научный сотрудник*

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

*E-mail: [esgavryushina83@mail.ru](mailto:esgavryushina83@mail.ru), [drygin@belozersky.msu.ru](mailto:drygin@belozersky.msu.ru)*

Ковалентные соединения вирусных геномов с терминальными белками широко представлены в природе: у пикорнавирусов, потивирусов, бактериофагов, аденовирусов и др. к 5'-концу РНК или ДНК ковалентно присоединен белок, играющий важную роль в инициации репликации вирусного генома. Есть основания считать, что подобные по структуре соединения образуются и в неинфицированной клетке. Для изучения инициации репликации подобных вирусных геномов и поиска новых клеточных комплексов нуклеиновых кислот с белками необходима разработка новых инструментов, позволяющих специфически определять ковалентные соединения нуклеиновых кислот и белков. Одним из инструментов для определения ковалентных соединений этого типа являются антитела к узловой структуре фосфодиэфирной связи между нуклеиновой кислотой и белком.

В настоящей работе был впервые получен препарат антител к синтетическому модельному соединению, имитирующему структуру «узла связи» между 5'-концевым остатком уридиловой кислоты РНК и тирозином терминального белка VPg пикорнавирусов. Проводили иммунизацию кролика модельным соединением, конъюгированным с яичным лизоцимом, и получали антисыворотки. Для получения антител проводили сульфат-аммонийное фракционирование антисывороток, ионообменную хроматографию, антитела очищали на протеин А сефарозе и на аффинном сорбенте с модельным соединением в качестве лиганда. На всех стадиях очистки специфичность антител определяли методом «иммунозолото» на нитратцеллюлозных и нейлоновых мембранах. Было показано, что антитела к модельному соединению специфически узнают геномы пикорнавирусов (вируса энцефаломиокардита и вируса Менго). Антитела к узлу связи между РНК и терминальным белком пикорнавирусов могут быть использованы для изучения процесса инициации репликации вирусного генома и для поиска клеточных ковалентных соединений РНК и белка.

**Структурно-термодинамические исследования химер типа «Бержерак»****Гуцина Л.В., Габдулхаков А.Г., Филимонов В.В.***аспирантка, научный сотрудник, ведущий научный сотрудник**Институт белка РАН, Пущино, Россия**E-mail: [ljubin@vega.protres.ru](mailto:ljubin@vega.protres.ru)*

Проблема самоорганизации белков, то есть самопроизвольного сворачивания полипептидной цепи в уникальную пространственную структуру, остается одной из центральных в современной молекулярной биологии и имеет три основных аспекта: структурный, термодинамический и кинетический.

Наиболее подходящими для исследования самоорганизации являются маленькие глобулярные белки, способные поддерживать нативную структуру без дополнительных факторов, таких как прочно связанные лиганды или дисульфидные мостики. Одними из наиболее популярных объектов исследований являются изолированные SH3 домены, полученные в виде рекомбинантных белков. Ранее путем удлинения центральной  $\beta$ -шпильки на восемь остатков было сконструировано несколько химерных вариантов спектринового SH3-домена. Предполагалось, что такая вставка придаст  $\beta$ -шпильке дополнительную стабильность, и она будет выступать за пределы глобулы в виде «носа», в связи с чем эти химерные белки были названы «Бержераками». Они уже были использованы для уточнения ряда кинетических аспектов процесса самоорганизации, а в настоящее время изучаются нами в качестве удобной модели для определения термодинамических параметров образования изолированной  $\beta$ -структуры.

Калориметрические данные были получены нами для нескольких вариантов Бержераков в широком диапазоне pH при различных концентрациях белка. Согласно этим данным тепловое разворачивание белков происходит равновесно, обратимо и с хорошей точностью описывается моделью двух состояний при низких концентрациях белка и pH ниже 3,5. То есть выступающий нос образует с телом домена единую кооперативную систему, тепловой эффект разворачивания которой выше теплоты денатурации исходного белка в среднем на 14 кДж/моль. С целью структурной интерпретации полученных данных методом рентгеноструктурного анализа была определена трехмерная структура одного из белков (так называемого SHH варианта), которая показала, что вставленный фрагмент действительно образует жесткую  $\beta$ -шпильку. В случае SHH взаимодействие этих шпилек приводит к образованию тетрамеров в процессе кристаллизации химер.

Данная работа поддержана грантом Программы МКБ РАН и грантом ИНТАС (№ 03-55-5569).

## Протеом митохондрий сердца *Bos taurus*: анализ растворимых белков

Дайниченко Екатерина Владимировна<sup>1</sup>, Болдырев Андрей Николаевич<sup>1</sup>, Гринкевич Владимир Антонович<sup>2</sup>

<sup>1</sup>студент, <sup>2</sup>доцент кафедры биоорганической химии, к. х. н.

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

e-mail: danone2006@yandex.ru

Расшифровка и анализ геномов организмов предоставили важную информацию о механизмах функционирования живых систем. Однако этих данных оказалось недостаточно для полного понимания всех процессов, происходящих в клетке. Следующим шагом в развитии системной биологии стала протеомика, в задачи которой входит изучение белкового состава клетки, а также локализации, функций и взаимодействий белков. Эукариотическая клетка содержит огромное количество различных белков, поэтому идентификация протеома целой клетки затруднена. В связи с этим целесообразным является разделение такой сложной смеси белков на подмножества – протеомы органелл.

Митохондрии являются жизненно важными органеллами клетки и играют большую роль в жизнедеятельности организма. Нарушения функций митохондрий могут привести к серьезным последствиям для клетки и целого организма. Успех работы по идентификации протеома митохондрий позволит найти новые молекулярные мишени для терапевтического вмешательства при лечении различных болезней, поможет создать новые более эффективные лекарства.

Для достижения более полного определения белков митохондрии дополнительно разделяли на три фракции: внешние и внутренние мембраны, а также растворимые белки матрикса и межмембранного пространства. Целью данного этапа исследований являлась идентификация растворимых белков митохондрий миокарда сердца *Bos taurus*. Эти белки анализировали двумя способами: 1) поиск белков по фингерпринтам пептидных масс; 2) стратегия многомерной идентификации белков MudPIT.

Согласно первому методу, были получены индивидуальные белки с помощью двумерного гель-электрофореза, вырезаны точки, соответствующие белкам на геле, и проведено триптическое расщепление на пептиды. Далее пептидные гидролизаты анализировали с помощью МАЛДИ-времяпролетной масс-спектрометрии, и по полученным фингерпринтам были определены белки.

Во втором эксперименте обессоленные белки обрабатывались трипсином, из смешанного триптического гидролизата выделялись цистеин-содержащие пептиды с помощью аффинной хроматографии на колонке с тиопропилсефарозой. Пептиды, не сорбированные на колонке, идентифицировали с помощью масс-спектрометра, оснащенного ИЭР и ионной ловушкой, совмещенного «онлайн» с двумерной хроматографией. Цистеин-содержащие пептиды элюировали с аффинной колонки β-меркаптоэтанолом, модифицировали иодацетамидом и фракционировали с помощью обращеннофазовой ВЭЖХ. Полученные образцы анализировали на МАЛДИ-времяпролетном масс-спектрометре. В результате было определено около 220 белков.

MudPIT – Multidimensional Protein Identification Technology

МАЛДИ – матрично-активированная лазерная десорбция-ионизация

ИЭР – ионизация электрораспылением

**Поиск и картирование энхансерных элементов внутри длинных геномных последовательностей*****Дидыч Дмитрий Александрович****аспирант**Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова  
Российской академии наук, Москва, Россия**E-mail: dmitry\_D@inbox.ru*

Нами разработан экспериментальный метод селекции, идентификации и картирования потенциальных энхансерных элементов внутри длинных геномных последовательностей. Предложенный метод позволяет проводить одновременный поиск всех элементов, проявляющих энхансерную активность, среди множества коротких фрагментов ДНК, перекрывающих исследуемую область генома. Используемый в работе подход основан на способности энхансеров активировать промотор репортерного гена. Набор коротких фрагментов ДНК, полученных расщеплением участка длиной 1 млн. п.н. хромосомы 19 человека, был клонирован в специально сконструированный нами самоинактивирующийся ретровирусный вектор, содержащий репортерный ген неомидин-фосфотрансферазы II под контролем минимального промотора цитомегаловируса. В дальнейшем был получен пул ретровирусных частиц, которыми инфицировали клетки линии HeLa, после чего, были отобраны неомидин-устойчивые клоны, содержащие интегрированные в геном конструкции с фрагментами ДНК, обладающими активностью энхансеров. ДНК неомидин-устойчивых клонов использовали для амплификации соответствующих фрагментов, которые затем клонировали в плазмидный вектор. Таким образом, была получена библиотека потенциальных энхансеров. Клоны библиотеки секвенировали и была построена карта расположения энхансеров в интересующем нас локусе хромосомы 19 человека. Анализ библиотеки выявил 15 энхансер-подобных последовательностей в полигенном локусе хромосомы 19 человека длиной 1 млн. п.н., энхансерная активность 13 из них была подтверждена в экспериментах по транзientным трансфекциям с помощью системы двойной люциферазной детекции. Найденные последовательности преимущественно расположены в 5' прилегающих к генам областях либо внутри интронов.

**Изучение барьерной активности WARI-инсулятора у *Drosophila melanogaster***  
**Ерохин Максим Максимович, Четверина Дарья Александровна, Георгиев Павел**  
**Георгиевич**

*Аспирант, аспирант, доктор биологических наук*  
*Институт Биологии Гена, РАН, Москва, Россия*  
*E-mail: yermaxbio@yandex.ru*

Инсуляторами называют регуляторные элементы в геноме высших эукариот, которые обладают двумя основными свойствами: во-первых, инсулятор, находящийся между промотором и энхансером, способен блокировать активирующее действие энхансера на данный промотор; во-вторых, инсулятор способен предотвращать распространение гетерохроматина. Последнее свойство инсуляторов получило название барьерной активности. Барьерная активность инсуляторов может выражаться как в способности блокировать репрессивные сигналы, идущие от сайленсеров, так и в свойстве защищать трансгенные конструкции от «эффекта положения». Мы протестировали недавно открытый в нашей лаборатории инсулятор WARI, находящийся непосредственно за геном *white* у *Drosophila melanogaster*, на способность блокировать репрессию генов *yellow* и *mini-white*, опосредованную известным сайленсером PRE Ubx. Мы показали, что WARI-инсулятор может блокировать действие сайленсера PRE Ubx, причем барьерная активность зависит от расстояния между инсулятором и защищаемым промотором. Более того, мы обнаружили, что мутации по генам *su(Hw)* и *e(y)2* влияют на способность WARI-инсулятора нейтрализовать действие сайленсера, но не играют роли в энхансер-блокирующей активности инсулятора.

## Инактивация фактора транскрипции TnrA в клетках *Bacillus subtilis* путем протеолиза

**Каюмов Айрат Рашитович, Шарипова М.Р., Форихаммер К.**

*Младший научный сотрудник*

*Казанский государственный университет, Казань, Россия; Университет г. Тюбингена,  
Германия;*

*airat\_kayumov@rambler.ru*

В естественной среде обитания доступные бактериям источники азота различаются по количеству и химическому составу. Для их эффективной ассимиляции микроорганизмы выработали различные системы регуляции, которые отвечают на изменение доступности азотсодержащих соединений и контролируют экспрессию определенных групп генов. Результатом этого является синтез различных вне- и внутриклеточных ферментов и белков, а также изменение азотного метаболизма внутри самой клетки. Ключевыми белками-регуляторами азотного метаболизма в клетках бацилл являются фактор транскрипции TnrA и его структурный гомолог GlnR – репрессор глутаминсинтетазы (ГС). TnrA активен в условиях лимитации азотом, GlnR является его антагонистом и функционирует при росте с избытком легкодоступного источника восстановленного азота. Активность фактора TnrA регулируется не фосфорилированием, а образованием белкового комплекса с ГС. В активном состоянии TnrA находится в комплексе с мембраносвязанным белком NrgB. Белки NrgB и NrgA в клетках *B.subtilis* формируют аппарат транспорта аммония в клетки. При этом белок NrgA является транспортным, а NrgB – сенсорным. Было обнаружено, что возможен другой способ регуляции активности фактора транскрипции TnrA – путем его внутриклеточного протеолиза. При переносе отмытых клеток из бедной азотом среды (фактор TnrA активен) в среду без источника азота этот белок исчезает в течении 15 минут. В то же время этого не наблюдается в клетках дефектных по генам *nrgA* и *nrgB*, что свидетельствует об участии этих белков в передаче сигнала о наличии азота, доступного клетке. Мы провели протеолиз *in vitro* очищенного белка TnrA грубым экстрактом клеток *B.subtilis*, а также его мембранной и цитоплазматической фракциями. Эксперименты показали, что протеолитическая активность, гидролизующая белок TnrA, локализована в цитоплазме. По-видимому, данная протеаза относится к вегетативным белкам клетки: TnrA подвержен протеолизу экстрактом, полученным из клеток до и после их переноса в среду без источника азота. Обнаруженная протеаза высоко специфична по отношению к регуляторным белкам: внутриклеточные ферменты, участвующие в синтезе аминокислот (ГС и NAG-киназа), не подвержены протеолизу клеточным экстрактом в условиях *in vitro*, в отличие от регуляторного белка NrgB и фактора TnrA. Исследовали влияние различных ингибиторов на протеолитическую активность клеточного экстракта. Показано, что при инкубации в течение 20 мин клеточного экстракта с ингибитором сериновых протеаз PMSF (5мМ) активность подавляется полностью, с ингибитором трипсиноподобных сериновых протеаз бензамидином (5мМ) – на 60-80%. ЭДТА (10мМ) не оказывает влияния на протеолитическую активность. Эти результаты позволили сделать заключение, что обнаруженная нами протеаза относится к классу сериновых протеаз. Был установлен рН-оптимум по гидролизу очищенного белка TnrA. Максимум активности наблюдается при рН 7.0, при значениях рН 8.0 и выше остаточная активность составляет 5-10%. Наши дальнейшие исследования будут направлены на очистку и идентификацию протеазы, осуществляющей протеолиз фактора транскрипции TnrA.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта программы «Михаил Ломоносов» DAAD и Минобрнауки РФ №А/05/58617

**Структурные исследования белка HlyIIIR – транскрипционного регулятор гена гемолизина II *Bacillus cereus***

**Ковалевский Олег Владимирович<sup>1,2</sup>, Антсон Альфред<sup>2</sup>, Солонин Александр Сергеевич<sup>1</sup>**  
аспирант

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пуцзино (Россия),

<sup>2</sup>University of York, Structural Biology Laboratory, York (UK).

E-mail: kovoleg@rambler.ru

*Bacillus cereus* - широко распространенный в окружающей среде грам-положительный спорообразующий микроорганизм, условно-патогенный для человека, отдельные штаммы которого способны вызывать пищевые отравления, в том числе с летальным исходом, а также ряд других заболеваний. Патогенные свойства *B. cereus* определяются синтезом многочисленных белковых токсинов. В настоящее время в литературе описано только три регулятора, участвующих в контроле экспрессии генов токсинов *B. cereus*. В их числе – HlyIIIR, специфичный транскрипционный регулятор цитотоксина гемолизина-II. Ранее было показано, что HlyIIIR способен специфично связываться с оператором гена гемолизина II и негативно регулировать его экспрессию. Однако молекулярная логика работы данного регулятора, а значит и детали регуляции экспрессии гемолизина-II, оставались не выясненными.

Данная работа посвящена структурным исследованиям белка HlyIIIR. Нами была исследована олигомеризация HlyIIIR *in vitro* с помощью методов химической сшивки, гель-фильтрации и седиментации, и *in vivo* с использованием бактериальной гибридной системы “CI fusion”. Были получены дифрагирующие кристаллы нативного HlyIIIR, его селено-метионинового производного и мутантной формы. Методом рентгеноструктурного анализа была экспериментально определена структура HlyIIIR и его мутанта, компьютерный анализ позволил выяснить детали его функционирования.

В результате проделанной работы установлено, что HlyIIIR существует в виде гомодимера как в растворе, так и в бактериальных клетках, и не способен к образованию других олигомерных форм. Анализ пространственной структуры HlyIIIR, определенной с разрешением 2,4 Å, показал, что этот белок относится к TetR-семейству транскрипционных регуляторов. На основании структуры был создан мутант HlyIIIR с удаленной неупорядоченной областью L170-E185. Мутант обладал улучшенными кристаллизационными свойствами, однако из-за перестройки сегмента P161-D168 в районе димеризационного интерфейса мутант сформировал альтернативный димер. Данное наблюдение позволяет сделать вывод о важности сегмента P161-D168 для поддержания нативной структуры димера HlyIIIR. Кроме того, выявлена удивительная способность HlyIIIR к образованию альтернативных белок-белковых контактов на одном и том же интерфейсе. Анализ пространственной структуры нативного HlyIIIR выявил важную особенность структуры - наличие гидрофобной полости объемом 550 Å<sup>3</sup>. Сравнительный анализ показал, что данная полость является лиганд-связывающим сайтом, а связывание предполагаемого лиганда модулирует ДНК-связывающие свойства HlyIIIR, обеспечивая тонкую настройку регуляции гена гемолизина II. Прделанная работа позволяет расширить наше понимание молекулярных механизмов функционирования белков-регуляторов и логику регуляции экспрессии токсинов *B. cereus*.

**Пространственно-временная экспрессия RGS-содержащих RhoGEF и гетеротримерного G-белка Ga13 на ранних стадиях развития *Xenopus laevis***

**Копанцева, Елена Евгеньевна**

студент

Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгарта РАН, Москва, Россия

E-mail: y\_kopantseva@yahoo.com

Малые ГТФазы семейства Rho – Rho, Rac, Cdc42 являются важными участниками регуляционных путей в раннем развитии организма. Основной темой проекта является исследование множественных путей молекулярных взаимодействий, инициированных сигналом извне и приводящих к активации Rho-ГТФаз и их мишеней, а также роли этих путей в развитии.

В нашей лаборатории исследуется активация Rho факторами обмена гуаниловыми нуклеотидами (RhoGEF), содержащими RGS-домен, с помощью которого RhoGEF регулируются гетеротримерными G-белками. Проводится работа по определению места этих белков в системе молекулярных взаимодействий сигнального каскада лиганд – рецептор – G-белок – GEF – Rho-ГТФаза на модели раннего развития *Xenopus laevis*, а также выясняется их роль в регуляции процессов раннего морфогенеза *Xenopus laevis*. Конкретной задачей данного исследования являлось определение экспрессии фактора обмена гуаниловыми нуклеотидами xLARG и гетеротримерного G-белка xGa13 на различных стадиях развития *Xenopus laevis*, а также на полюсах эмбриона.

При анализе постадийного паттерна экспрессии генов xLARG и xGa13 у зародышей *Xenopus* методом гибридизации *in situ* было установлено, что на стадиях дробления и бластулы в анимальном полушарии присутствует транскрипт материнского происхождения. С началом зиготической экспрессии генома на стадии 8,5 развития количество транскрипта xGa13 сохранялось, а уровень экспрессии xLARG имел тенденцию к снижению к концу гастрюляции (стадия 13). Новая волна экспрессии генов xLARG и xGa13, локализованная преимущественно в головном отделе, начиналась в период нейруляции, и количество транскрипта равномерно нарастало на стадиях нейрулы-хвостовой почки вплоть до последней исследованной стадии (стадия 40). Результаты были проверены и подтверждены методом исследования кинетики амплификации, а также высокочувствительным методом ПЦР с радиоактивной меткой с последующей количественной обработкой результатов.

Аналогичные методические подходы были использованы при исследовании распределения материнских транскриптов в различных зонах зародыша на стадии развития 8. Было показано, что, несмотря на высокое содержание желтка в вегетативных клетках, относительное содержание мРНК xGa13 во всех зонах зародыша одинаково. В то же время относительное содержание мРНК xLARG на вегетативном полюсе в десятки раз ниже, чем в анимальной, дорсальной и вентральной зонах.

Из приведенных результатов сделано заключение, что xGa13 имеет более равномерный характер распределения, чем xLARG. В настоящее время планируется взять для исследования еще один белок из подсемейства RGS-содержащих RhoGEF – xRhoGEF11. Белок xRhoGEF11 содержит тот же набор функциональных доменов, что и xLARG: DH-PH, PDZ и RGS – а потому также может быть членом сигнального каскада с участием Ga13. Планируется провести исследование пространственно-временного паттерна экспрессии xRhoGEF11 в раннем развитии *Xenopus laevis*.

## Анализ хитин-связывающего сайта гена растительных изопероксидаз

**Кузьмина Ольга Ильинична**

аспирант

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа

E-mail: phyto@anrb.ru

Пероксидаза - один из распространенных ферментов, интерес к изучению которого с годами не ослабевает. Среди кодирующих растительных пероксидаз, образующих большое мультигенное семейство, особое место занимают патоген-индуцируемые пероксидазы, активность которых коррелирует с развитием устойчивости растений к фитопатогенам. Ранее в лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УНЦ РАН было показано, что некоторые изопероксидазы у многих видов растений характеризуются свойством связывания с хитином. К сожалению, на фоне активного изучения физиологических функций пероксидаз роль структуры хитин-связывающего сайта в последующем проявлении растениями устойчивости к фитопатогенам остается слабо изученной. Можно предположить, что свойство сорбции пероксидаз на хитин связано с наличием общего полисахарид-связывающего мотива в их аминокислотной последовательности, что предполагает и определенную гомологию в структуре генов, их кодирующих. Изучение молекулярных механизмов регуляции отдельных изопероксидаз внесет вклад в понимание физиологических основ устойчивости растений к фитопатогенам. Ранее, к нуклеотидной последовательности хитин-связывающего сайта гена анионной пероксидазы пшеницы были подобраны и сконструированы праймеры. С использованием данной пары праймеров нами была проведена ПЦР на ДНК разных видов пшеницы, эгилопса, арабидопсиса и табака.

Обнаружено, что у испытанных видов пшеницы и эгилопса проявляется целевой ампликон размером 190-200 п. н., что совпадает с теоретически рассчитанными размерами, отжигающимися полученными праймерами с гена анионной пероксидазы этих злаков. Данный факт подтверждает предположение о сходной организации этого участка гена. Интересно, что у *Arabidopsis thaliana* ампликон, полученный после ПЦР, был размером около 150 п. н. Анализ генов, кодирующих пероксидазы, по известным из международного генбанка нуклеиновым последовательностям *Arabidopsis thaliana*, показал, что из большого количества генов пероксидазы арабидопсиса (70 генов) только у одного имелся подобный мотив размером 175 нуклеотидов и близкий к полученному после ПЦР. При использовании ДНК *Nicotiana tabacum*, к сожалению, не происходило формирования искомого ампликона. Поскольку анализ известных генов пероксидазы *Nicotiana tabacum* также не выявил подобных последовательностей, можно предположить, что структура этого ампликона у табака отличается от полученной для пшеницы и требует подбора другой пары праймеров. Таким образом, нами проведен анализ размера ампликона хитин-специфичного сайта пероксидаз из разных видов растений. Более точные результаты предполагается получить после секвенирования ампликонов этих видов и сравнение их последовательностей.

Работа выполнялась при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект №05-04-48310-а).

Тезисы доклады основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта Российского фонда фундаментальных исследований (грант №05-04-48310-а).

Автор выражает признательность д.б.н. Максимова И.В. за помощь в подготовке тезисов.

## Органная специфичность метилирования и экспрессии промотора гена пататина класса I в растениях картофеля

Наумкина Елена Михайловна<sup>1</sup>

научный сотрудник, к.б.н.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

E-mail: emk24-kr@yandex.ru

Промотор гена пататина класса I – это тканеспецифичный промотор, обеспечивающий экспрессию гена главным образом в клубнях. Ранее было показано [2], что невысокий уровень экспрессии обнаруживается и в других органах картофеля. Проведенный нами количественный флюориметрический анализ функционирования пататинового промотора в трансгенных линиях картофеля сорта Дезире В33::GUS, где репортерный ген GUS поставлен под контроль пататинового (В33) промотора показал, что уровень экспрессии уменьшался в ряду клубень>>стебель>лист>корень. Органная специфичность функционирования пататиновых генов может зависеть от эпигенетических механизмов, в том числе метилирования ДНК [1]. В данной работе определяли уровень метилирования остатков цитозина консервативного проксимального участка В33-промотора. В исследуемом участке (477 н.о.) промотора выявлены два тетра nukлеотида GCGG, остаток цитозина которых является потенциальным субстратом ДНК-метилазы. Степень метилирования этих тетра nukлеотидов определяли с помощью метилчувствительной рестриктазы AсiI, которая способна расщеплять узнаваемый сайт только в том случае, если он не содержит метилированный цитозин. Обработанные AсiI препараты ДНК, выделенные из разных органов/линий картофеля, использовали в качестве матриц для ПЦР с праймерами на исследуемый участок В33-промотора или на участок промотора и начало гена GUS. ПЦР на матрицах необработанных рестриктазой препаратов ДНК из разных органов приводила к наработке примерно равных количеств амплифицируемой ДНК В33-промотора. Это указывало на сходство набора матриц и их доступности в препаратах ДНК, выделенных из разных органов растения. Однако после рестрикции AсiI количества получаемых ампликонов сильно различались в зависимости от источника ДНК. Наиболее бледными были полосы ампликонов, полученные с использованием рестрицированных ДНК из клубней и листьев анализируемых растений. Это свидетельствует о значительной степени расщепления пататинового промотора рестриктазой AсiI, т.е. о низком уровне его метилирования в данных органах. Максимальный уровень метилирования промотора был выявлен в корнях и стеблях растений картофеля. Существенных различий между трансгенными и нетрансгенными растениями картофеля по уровню метилирования GCGG-сайтов промотора не обнаружено. Органная специфичность метилирования встроенного В33-промотора в В33::GUS-трансформантах была сходной со специфичностью метилирования эндогенного пататинового промотора. Обнаружена существенная обратная корреляция между уровнем метилирования GCGG-сайтов В33-промотора и уровнем его активности в органах растений. Вместе с тем, неполная обратная корреляция метилирования и экспрессии В33-промотора в разных органах предполагает участие, помимо метилирования, и других регуляторных факторов, определяющих органную специфику промоторной активности.

<sup>1</sup> Автор выражает признательность профессору, д.б.н. Романову Г.А. за помощь в подготовке тезисов.

### Литература

1. Ванюшин Б. Ф. (2005) Эпигенетическое метилирование ДНК – эпигенетический контроль за генетическими функциями клетки // Биохимия, №70, 598-611.
2. Rocha-Sosa M., et al. (1989) Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene // The EMBO Journal, № 8, p. 23-29.

## Изменение взаимного расположения хромосомных территорий под действием этопозиды

**Рубцов Михаил Александрович**

*Аспирант*

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

*ma\_rubtsov@mail.ru*

Согласно современным представлениям, как интерфазные хромосомы, так и гены занимают в ядре достаточно жестко определенные радиальные положения. Считается общепринятым тот факт, что близкое расстояние между локусами может являться причиной незаконной рекомбинации между ними, часто приводящей к развитию лейкозов. Возникающие в результате транслокаций лейкозы, могут носить как первичный, так и вторичный характер. Возникновение вторичных лейкозов связывают с терапией рака ингибиторами ДНК топоизомеразы II. ДНК топоизомераза II является жизненно необходимым ферментом, так как катализирует топологические изменения в ДНК в ходе сегрегации дочерних хромосом после завершения процесса репликации ДНК, транскрипции, рекомбинации и реорганизации хроматина. Именно поэтому при терапии раковых заболеваний применяются препараты, ингибирующие активность топоизомеразы II и вызывающие гибель активно делящихся клеток.

В настоящей работе исследовалось взаимное пространственное расположение генов, являющихся частыми партнерами при транслокациях, ведущих к возникновению первичных и вторичных лейкозов (AML/ETO, MLL/AF4, AF6, AF9, BCR/ABL).

Методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) было показано, что радиальное распределение флуоресцентных сигналов, соответствующих гену ETO и хромосомной территории 8-ой хромосомы во внутриядерном пространстве делящихся клеток является случайным. Также было показано, что при обработке клеток этопозидом (VP16) - ингибитором ДНК топоизомеразы II - характер распределения сигналов резко меняется и сигналы, в значительной степени, группируются на внутриядерной орбите, соответствующей 45% радиуса ядра.

Для частого партнера гена ETO по транслокациям, гена AML, было показано, что основная масса сигналов, соответствующих гену AML и хромосомной территории 21-ой хромосомы в интактных клетках, сосредоточена на той же орбите (45% радиуса ядра), и что такое распределение сигналов не изменяется после обработки клеток этопозидом. Анализ размера геномной ДНК с применением метода электрофоретического разделения ДНК в пульсирующем поле показал возникновение большого числа разрывов в ДНК вследствие обработки клеток этопозидом.

Таким образом, продемонстрировано, что в условиях, имитирующих противораковую терапию, происходит сближение генов ETO и AML. Это сближение, сопровождающееся расщеплением ДНК ингибитором топоизомеразы II, может вести к хромосомным транслокациям и развитию вторичных лейкозов.

Предполагается, что анализ изменений радиального распределения возможных генов-партнеров по транслокациям во внутриядерном пространстве делящихся клеток при терапии онкологических заболеваний с применением различных типов химиотерапевтических агентов, может лечь в основу тест-системы, направленной на прогнозирование и предотвращение случаев возникновения вторичных лейкозов.

**Сайт-специфическая никаза N.BspD6I: условия образования гомогенного комплекса с ДНК-дуплексом, содержащим сайт GAGTC**

**Юнусова А.К.<sup>3</sup>, Секерина С.А.<sup>1,2</sup>, Рогулин Е.А.<sup>3</sup>, Артюх Р.И.<sup>3</sup>, Качалова Г.С.<sup>4</sup>, Железная Л.А.<sup>3</sup>, Матвиенко Н.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт белка РАН, Пуццино, Россия

<sup>2</sup>Тюменский государственный университет, Россия

<sup>3</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуццино, Россия

<sup>4</sup>Max-Planck Research Unite for Structural Molecular Biology, Hamburg, Germany

E-mail: svetlana-sekerina@yandex.ru

Сайт-специфические эндонуклеазы рестрикции представляют собой прекрасную модельную систему для изучения аспектов специфического ДНК-белкового взаимодействия. Сайт-специфическая ДНК-никаза N.BspD6I представляет собой одну из субъединиц гетеродимерной сайт-специфической эндонуклеазы рестрикции R.BspD6I [1]. Она несет функцию узнавания специфического сайта двухцепочечной ДНК и расщепления одной из ее цепей на расстоянии 4 п.о. в стороне от сайта узнавания [2]. Структура никаза N.BspD6I была определена нами ранее методом рентгеноструктурного анализа [3].

Настоящая работа посвящена изучению олигомерного состояния растворенной никаза при высокой концентрации, и ее способности в этих условиях связывать ДНК-дуплекс. Работа выполнена в рамках проекта по кристаллизации комплекса с ДНК сайт-специфической никаза N.BspD6I. В работе использовались методы нативного электрофореза в ПАА-геле, гель-фильтрационной хроматографии на колонке Superdex200 10/300 и методом динамического светорассеяния (DLS). В ходе работы оптимизирована методика индукции клеток штамма-продуцента, а также модифицирована техника выделения белка. При выделении использовалась аффинная хроматография на гепарин-сефарозе и Ni-NTA-агарозе, в результате чего была получена никаза N.BspD6I с чистотой 95% и выше. Выход составил ~4 мг/л культуры. Установлено, что в растворе при концентрации от 0.04 мг/мл никаза N.BspD6I образует димеры, тримеры и более высокомолекулярные конгломераты, причем молекулярный вес конгломератов прямо пропорционален концентрации никаза в растворе. Присутствие специфического дуплекса разбивает эти конгломераты – образуется комплекс мономерной никаза и дуплекса. Для образования гомогенного комплекса достаточно превышения концентрации дуплекса над концентрацией никаза в 1,3 раза в молярном соотношении при концентрации никаза 1,5 мг/мл. Исследовано влияние 2-валентных ионов ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) на поведение белка в присутствии дуплекса. Показано, что в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  образуется пререакционный комплекс никаза и ДНК, тогда как в присутствии ионов  $\text{Mg}^{2+}$  образуется постреакционный комплекс; после внесения разрыва в цепь ДНК никаза остается связанной с дуплексом, а не покидает его, как это показано для сайт-специфических эндонуклеаз рестрикции типа IIP. Получены комплексы никаза с дуплексами 18 п.о. и 21 п.о. длиной. Комплексы сконцентрированы до концентрации 14 и 20 мг/мл соответственно и использованы для получения кристаллов методом сидячей капли.

### Литература

1. Юнусова А.К., Рогулин Е.А., Артюх Р.И., Железная Л.А., Матвиенко И.Н. (2006) Никаза N.Bsp6I – большая субъединица гетеродимерной эндонуклеазы рестрикции R.BspD6I // Биохимия, т. 71, № 7. 1002-1008.

2. Железная Л.А., Перевязова Т.А., Альжанова Д.В., Матвиенко Н.И. (2001) Сайт-специфическая нуклеаза из штамма *Bacillus species* D6 // Биохимия, т. 66, №9, с. 1215-1220.
3. Kachalova G.S., Rogulin E.A., Artyukh R.I., Perevyazova T.A., Zheleznaya L.A., Matvienko N.I. and Bartunik H.D. (2005) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the site-specific DNA nickase Nb.BspD6I. Acta Crystallographica F61, p. 332-334.

## Транспортный белок ТБГ1 гордеивируса взаимодействует *in vitro* с белком ядрышка фибрилларинном

Семашко М.А.

аспирант

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

E-mail: semaha@list.ru

Функция клеточных белков в транспорте вирусов в зараженном растении представляет значительный интерес. Недавно было показано, что для транспорта умбравируса мозаики арахиса по проводящей системе растения необходим белок ядрышка фибрилларин [1]. Белок дальнего транспорта умбравируса транспортируется в ядра, проходит в ядрышки, где локализуется с фибрилларинном, а затем возвращается назад в цитоплазму. Этот процесс сопровождается перемещением фибрилларина в цитоплазму и абсолютно необходим для формирования в цитоплазме вирусных рибонуклеопротеидных частиц (вРНП), требующихся для дальнего транспорта вируса. Выявлено прямое взаимодействие между белками *in vitro* [2], которое необходимо как для экспорта фибрилларина из ядра, так и для образования транспортного вРНП. Наши данные указывают на возможность реализации аналогичного механизма у другой таксономической группы вирусов - гордеивирусов.

С помощью стандартных методов клонированы полноразмерные гены вирусного и клеточного белков и их делеционные варианты. Рекомбинантные белки экспрессировали в *E. coli* и очищали с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе. Белок-белковые взаимодействия изучали Фар-Вестерн методом, взаимодействия белок-РНК - методом задержки в геле.

Показано, что рекомбинантный фибрилларин, экспрессированный в *E. coli*, взаимодействует с транспортным ТБГ1 белком гордеивируса полупатентного вируса мятлика (ПЛВМ), который, как и транспортный белок умбравируса, способен локализоваться в ядре и принимает участие в формировании вРНП. С помощью серии делеционных мутантов фибрилларина и ТБГ1 белка ПЛВМ локализованы участки гетерологичных белок-белковых взаимодействий в составе клеточного и вирусного белков. Ими оказались глицин-аргинин-богатый домен фибрилларина и участок в составе N-концевой части ТБГ1 белка. Возможно, что именно взаимодействие ТБГ1 белка с фибрилларинном и участие последнего наряду с ТБГ1 белком в образовании вРНП комплексов необходимо для реализации функции дальнего транспорта гордеивирусов.

<sup>1</sup>Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта РФФИ.

<sup>2</sup> Автор выражает признательность д.б.н. Калининой Н.О. за руководство работой и помощь в подготовке тезисов.

### Литература

1. Kim SH, Ryabov EV, Kalinina NO, Rakitina DV, Gillespie T, MacFarlane S, Haupt S, Brown JW, Taliansky M. Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. EMBO J. 2007 Apr 18;26(8):2169-79. Epub 2007 Apr 5.
2. Kim SH, Macfarlane S, Kalinina NO, Rakitina DV, Ryabov EV, Gillespie T, Haupt S, Brown JW, Taliansky M. Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarinn is required for systemic virus infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jun 26;104(26):11115-20. Epub 2007 Jun

## Модифицированные олигонуклеотиды – эффективные ингибиторы интегразы ВИЧ-1 с новым механизмом действия

*Сычева Анна Максимовна, Агапкина Юлия Юрьевна*

*студент, сотрудник, к. х. н.*

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

*E-mail: [anna.sycheva@gmail.com](mailto:anna.sycheva@gmail.com)*

Интеграция ДНК вируса иммунодефицита человека в геном клетки является ключевой стадией жизненного цикла вируса, поэтому представляет интерес разработка препаратов, подавляющих активность вирусного фермента интегразы. К настоящему моменту найден ряд эффективных ингибиторов интегразы, действующих на активный центр фермента, однако быстро развивающаяся устойчивость вируса к этим препаратам делает актуальной разработку новых ингибиторов интегразы.

Ранее нами было показано, что конъюгаты 11-звенных одноцепочечных олигонуклеотидов с гидрофобными молекулами, такими как эозин, флуоресцеин и олеиновая кислота, эффективно подавляют активность интегразы *in vitro*, связываясь с комплексом интегразы-вирусная ДНК и разрушая его. Для определения участка связывания конъюгата было проведено ковалентное присоединение конъюгата олигонуклеотида с флуоресцином к ферменту и протеолитическое расщепление продукта присоединения. Масс-спектрометрический анализ образовавшихся нуклеотидопептидов позволил установить, что ингибитор взаимодействует с интегразой вблизи Lys236 в С-концевом домене фермента. Для подтверждения сайта связывания конъюгата мы провели замену Lys236 в составе интегразы на Ala. Такая аминокислотная замена резко снижала как способность фермента связывать вирусную ДНК, так и его каталитическую активность.

Основываясь на полученных данных, мы высказали предположение о механизме действия конъюгатов. Согласно нашим представлениям, отрицательно заряженная олигонуклеотидная часть конъюгата связывается с С-концевым доменом интегразы, содержащим большое количество положительно заряженных аминокислот, за счет электростатических взаимодействий, в то время как гидрофобная часть проникает в гидрофобный кор домена. Такие взаимодействия между олигонуклеотидным конъюгатом и комплексом интегразы с вирусной ДНК вызывают конформационные изменения в ферменте, приводящие к диссоциации комплекса. Мы полагаем, что при замене Lys236 на гидрофобный остаток Ala структура С-концевого домена аналогичным образом меняется, что приводит к снижению каталитической активности фермента и его способности связывать вирусную ДНК. Таким образом, мы показали, что олигонуклеотидные конъюгаты являются высокоэффективными ингибиторами интегразы ВИЧ-1, которые, в отличие от большинства существующих ингибиторов, связываются вне активного центра фермента и подавляют активность интегразы по новому механизму.

**Пространственная организации домена  $\alpha$ -глобиновых генов кур****Филоненко Е.С., Борунова В.В., Яровая О.В.***аспирант**Институт биологии гена РАН, Москва, Россия**E-mail: [Dr.Elena.S@gmail.com](mailto:Dr.Elena.S@gmail.com)*

В хромосомах эукариот ДНК организована в большие петли, фиксированные основаниями на ядерном матриксе. В задачи нашей работы входило проанализировать пространственную организацию домена  $\alpha$ -глобиновых генов кур в лимфоидных клетках линии DT40, пролиферирующих эритроидных клетках HD3 и терминально дифференцированных эритроидных клетках - эмбриональных эритроцитах. Нами было продемонстрировано, что в лимфоидных, не экспрессирующих глобины клетках, домен альфа-глобиновых генов организован в несколько петель, фиксированных основанием на элементах ядерного скелета. В делящихся эритроидных клетках пространственная организация резко отличается от лимфоидных клеток: большая часть домена коллапсирована и на препаратах развёрнутого хроматина (гало) наблюдается в виде точечного сигнала. Картирование участков прикрепления ДНК к ядерному матриксу подтверждает сделанное наблюдение. При равном уровне экспрессии глобиновых генов в делящихся и терминально дифференцированных эритроидных клетках пространственная организация домена отличается принципиальным образом. Подавляющее большинство сигналов имеет вытянутую форму, домен не организован в петли и не коллапсирован. Эксперименты по иммуноокрашиванию антителами к РНК-полимеразе II демонстрируют, что терминальная дифференцировка ведёт к перераспределению РНК-полимеразы II в ядре клетки. В терминально дифференцированных клетках РНК-полимеразы II вытесняется из хроматина в межхроматиновое пространство. В нашей работе мы показали, что пространственная организация домена  $\alpha$ -глобиновых генов зависит как от транскрипционного, так и от пролиферативного статуса клеток. Терминальная дифференцировка ведёт к утрате участков прикрепления и вытеснению РНК-полимеразы II из хроматина в межхроматиновое пространство.