

ИССЛЕДОВАНИЕ РНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ НАТИВНОЙ И МУТАНТНОЙ ФОРМ БЕЛКА SmAP ИЗ АРХЕИ *SULFOLOBUS ACIDOCALDARIUS*

Леконцева Н.В.¹, Михайлина А.О.¹, Балобанов В.А.¹, Никулин А.Д.¹

¹ФГБУН Институт белка РАН, Пушкино, Россия

natalja-lekontseva@rambler.ru

Sm и Sm-подобные (Lsm) белки представляют собой большое семейство белков, участвующих в метаболизме РНК. Представители данного семейства были обнаружены во всех трех доменах жизни: бактериях, археях и эукариотах. Принадлежность к данному семейству определяется наличием Sm-фолда, состоящего из N-концевой α -спирали и пяти β -тяжей.

Бактериальный Lsm белок Hfq связывает РНК в трех сайтах на поверхности образуемых ими гексамеров: основной и дополнительный (боковой) уридин-связывающие сайты (узнают У-богатые последовательности регуляторных РНК и мРНК), а также аденин-связывающий сайт, который взаимодействует с поли(А) участками мРНК. Архейные SmAP белки сохраняют способность связывать олиго(У) в аналоге основного уридин-связывающего сайта. Анализируя их пространственные структуры, мы показали, что аденин-связывающий сайт в SmAP прикрыт длинной петлей L4, что должно мешать взаимодействию белка с поли(А) РНК. Для проверки нашего предположения был выбран белок SmAP из археи *Sulfolobus acidocaldarius*, который является типичным представителем этого класса архейных белков с протяженной петлей L4 и формирующий гептамеры в растворе.

Нами получены генетические конструкции, кодирующие гены нативного белка Sac SmAP и его мутантной формы с удаленной петлей L4. Белки выделены с чистотой, пригодной для кристаллизации. Проведен анализ распределения размеров частиц белка в растворе методом динамического рассеяния света. Получены кристаллы белков и определена их структура, что позволило проанализировать их возможные РНК-связывающие свойства.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-14-00496).

НОВЫЙ ЭФФЕКТИВНЫЙ И ЭКОНОМИЧНЫЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ МИКРОРНК ИЗ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Летова И.А.¹, Шах М.Р.¹

¹ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

letovaira1995@mail.ru

МикроРНК – класс некодирующих 5' – фосфорилированных РНК. МикроРНК посттранскрипционно регулируют экспрессию генов путем специфического связывания мРНК – мишени. Изменения концентрации микроРНК отражают индивидуальную адаптацию организма к конкретным условиям окружающей среды. Целью нашей работы явилось установление ускоренного и экономичного метода выделения микроРНК из клеток человека и животных без примесей других классов РНК.

В ходе исследования были использованы эукариотические клетки: эпителиальные клетки почки собаки и эпителиальные клетки легких человека. Тотальная РНК клеток выделена с помощью коммерческого реагента TRIzol Reagent (Thermo Fisher, США) по рекомендации производителя. При выделении микроРНК из тотальной РНК использовались несколько методов: i) с добавлением 1,8 объема магнитных частиц Agencourt AMPure (Beckman Coulter, США) от образца РНК и очищение от примесей с помощью коммерческого набора mirVana (Thermo Fisher, США); ii) с добавлением магнитных частиц Agencourt AMPure (Beckman Coulter, США), составляющих 0,5 объема РНК, и последовательное очищение от примесей с помощью 100% изопропанола и 75% этанола; iii) второй вариант модифицирован, то есть перед добавлением магнитных частиц образец РНК инкубирован при 70° С в течении 2 мин; iv) удаление рРНК из образцов тотальной РНК было проведено с использованием коммерческого набора RiboMinus (Invitrogen, США) по инструкции производителя. Изменения концентрации РНК в каждом образце контролировались при помощи флюорометра Qubit 2.0 (Thermo Fisher, США). Качественный анализ выделенных РНК был проведен с помощью реагентов “Agilent RNA 6000 Pico Kit” и “Agilent Small RNA Kit” (Agilent Technologies, США) на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США).

При исследовании концентрации в образцах (i) и (ii) РНК не была обнаружена. Концентрация РНК в образце (iii) составляла 2 нг/мкл, концентрация исходных РНК составляла 56 нг/мкл. В образце (iv) концентрация РНК составляла 268 нг/мкл. При анализе размера РНК из выделенных образцов установлено, что в образце (iv) были обнаружены РНК размером более 4000 оснований, также найдены значительные количества рРНК. В образце (iii) РНК размером более 500 оснований не обнаружено. Таким образом, установлено, что метод обработки образцов с тотальной РНК, термически инкубированными в течении двух минут и

последовательно очищенными магнитными частицами, составляющими 0,5 от объема РНК, изопропанолом и этанолом, является наиболее экономичным и эффективным для выделения микроРНК эукариотических клеток.

ЗАМЕНА АМИНОКИСЛОТ БЕЛКА SUP35 В ПОЛОЖЕНИИ 46-47 ВЕДЕТ К ИЗМЕНЕНИЮ МОРФОЛОГИИ АМИЛОИДНЫХ АГРЕГАТОВ

Лихолетова Д.В.¹, Бондарев С.А.¹, Журавлева Г.А.¹

¹ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
dary.spb@gmail.com

Прион [PSI⁺] – амилоидная форма фактора терминации трансляции Sup35 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Агрегация этого белка приводит к снижению эффективности терминации трансляции и, как следствие, к нонсенс-супрессорному фенотипу [PSI⁺] клеток. Белок Sup35 состоит из трех доменов: аминотерминального домена, обуславливающего поддержание приона; карбокситерминального домена, необходимого для терминации трансляции; а также среднего домена. В составе агрегатов белок Sup35 образует параллельную супер-складчатую β-структуру.

Ранее мы продемонстрировали влияние замен полярных аминокислот на заряженные в N-домене Sup35 на свойства фактора [PSI⁺]: в частности, замены Q46K и Q47K (Sup35-M1) приводили к потере приона, в то же время Q70K и Q71K (Sup35-M3) не оказывали подобного эффекта. В представленной работе мы проследили за изменением морфологии агрегатов Sup35 *in vivo* при сверхпродукции прионного домена Sup35 с упомянутыми заменами. Для этого были получены плазмиды, содержащие конструкцию *SUP35NM-GFP* с мутациями под контролем индуцибельного промотора гена *CUP1*. Кратковременная сверхпродукция Sup35NM-M1-GFP приводила к изменению количества и формы агрегатов Sup35, детектируемых с помощью флуоресцентной микроскопии, а именно, мы наблюдали образование одного относительно крупного агрегата. Конструкция с прионным доменом «дикого типа», либо с заменами Q70K и Q71K не обладали подобным эффектом, в клетках наблюдалось по несколько мелких агрегатов.

Работы выполнены при поддержке грантов СПбГУ (1.37.291.2015 и 15.61.2218.2013), грантов РФФИ (16-04-00202, 16-34-00582), а также ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

АНАЛИЗ АССОЦИИРОВАННЫХ С GAGA-ФАКТОРОМ БЕЛКОВ D. MELANOGASTER

**Ломаев Д.В.¹, Михайлова А.В.¹, Ерохин М.М.¹, Шапошников А.В.¹, Шидловский Ю.В.¹,
Георгиев П.Г.¹, Шедл П.^{1,2}, Четверина Д.А.¹**

¹ФГБУН Институт биологии гена РАН, Москва, Россия; ²Department of Molecular Biology Princeton University, Princeton, USA
lomaevdv@gmail.com

GAGA-фактор (GAF) – фактор транскрипции *D. melanogaster*, вовлечённый в широкий ряд клеточных процессов. Первоначально в экспериментах *in vitro* GAF был идентифицирован как активатор транскрипции генов *Ultrabithorax (Ubx)* и *engrailed (en)*. Кроме того, GAF участвует в формировании свободных от нуклеосом областей хроматина и в привлечении на хроматин ремоделирующих комплексов. В то же время установлена роль фактора GAF в Polysomb-зависимом сайленсинге генов, в конденсации и сегрегации хромосом во время митоза и в инсуляции. На данный момент остаётся непонятным за счёт чего достигается такое разнообразие противоположных функций фактора GAF. Одним из возможных объяснений является способность GAF взаимодействовать напрямую или через посредников с партнёрами, входящими в различные белковые комплексы.

В данной работе с помощью методов иммунопреципитации и масс-спектрометрии были идентифицированы белки, ассоциированные с фактором GAF в ядерном экстракте *D. melanogaster*. В результате был выявлен ряд белков, среди которых компоненты комплексов АТФ-зависимых ремоделеров хроматина; факторы групп Polysomb/Trithorax; факторы, ассоциированные с инсуляторами; субъединицы комплексов Когезин и Конденсин. С помощью двугибридной дрожжевой системы найдены новые прямые партнёры GAF; выявлены домены GAF, необходимые для взаимодействия.

В результате работы показано, что GAF взаимодействует с большим числом партнёров, входящих в различные белковые комплексы, что может служить объяснением участия фактора GAF в разных процессах.