

УДК 577.152.321

К. Н.Соловьев (5 курс, каф. ЭФ), Л. М.Фирсов, к.х.н, с.н.с. ОМРБ ПИЯФ РАН

IN VIVO ВКЛЮЧЕНИЕ НЕПРИРОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В БЕЛКИ

Данная работа направлена на решение фундаментальной проблемы молекулярной биологии, а именно, включение неприродных аминокислот в белки и изучение физико-химических свойств вновь образованных необычных белков и, в частности, ферментов, а в дальнейшем, возможно, и организмов.

Методика включения неприродных аминокислот *in vivo* в общем виде выглядит следующим образом. В соответствующем месте ДНК гена изучаемого белка сайт-специфическим мутагенезом вводится nonsense стоп-кодон TAG. Создается супрессорная тРНК, несущая антикодон CUA, которая химически аминоацилируется выбранной неприродной аминокислотой. Далее мутантная ДНК и супрессорная аминоацил-тРНК переносятся в транскрипционно-трансляционную систему в которой происходит биосинтез белка [1 - 4].

Этот метод дает возможность целенаправленно изучать в составе белка функционально важные аминокислоты физическими методами на фоне десятков немодифицированных аминокислот. Сама модификация аминокислот может быть как минимальной (замена изотопа ^{12}C на изотоп ^{13}C в соответствующей группировке, например в карбоксиле), так и существенной - включение радикалов с заданными характеристиками. Очевидно, что характер модификации будет определять использование соответствующих методов регистрации (^{13}C - ЯМР в первом случае, разнообразные физические, в том числе спектральные методы, в других случаях).

Одним из объектов исследования данного проекта является молекулярная структура пресинаптического комплекса белка ResA с односторонней ДНК, играющего важнейшую роль в процессе гомологической рекомбинации. Идея эксперимента состоит в том, что, включив по приведенной выше схеме неприродную аминокислоту в определенные сайты белка ResA и получив натуральный пресинаптический комплекс, мы далее, облучая комплекс светом, разрываем полипептидную цепь у этой аминокислоты (мы выбираем светочувствительную аминокислоту) и изучаем свойства релаксированного комплекса. Предполагается, что в результате разрыва полипептидной цепи в каждом мономере фрагменты белка не будут диссоциировать с ДНК (из-за множественности контактов между мономерами и с ДНК), а единственным результатом будет снятие напряжения в полипептидных цепях мономеров из-за разности параметров спиралей ДНК и полимерного ResA. Представляют большой интерес свойства такого релаксированного комплекса (АТФазная активность, взаимодействие с белком SSB, реакция с двунитевой ДНК).

В качестве транскрипционно-трансляционной системы были выбраны ооциты *Xenopus*. А для получения супрессорной тРНК была использована тРНК-Gln (CUA) из *Tetrahymena thermophila*, в которой был мутирован U73 на G для устранения узнавания ооцитарной эндогенной глутаминацилтрансферазой.

В ходе работы плаزمиды, несущая ген супрессорной тРНК, была трансформирована в штамм DH5 α *E. coli*, и получена в больших количествах. Затем мы провели рестрикцию по FokI сайту, для получения 74-нуклеотидной формы супрессорной тРНК. Потом была проведена *in vitro* транскрипция.

Далее предполагалось осуществить лигирование 74-нуклеотидной формы супрессорной тРНК с синтезированным динуклеотидом dpCrA, к которому химически приштампирована неприродная светочувствительная аминокислота – орто - нитрофенилглицин. Но по некоторым причинам эта реакция шла с малым выходом конечного продукта. Возможные объяснения этой проблемы: присутствие грязи в препаратах супрессорной тРНК, ингибирующее T4 РНК лигазу; возможная конформация супрессорной тРНК, которая не

позволяет молекуле попасть в активный центр фермента; деградация или не полная трансляция супрессорной тРНК, в результате которых один или несколько 3' оснований отсутствуют, и конец акцепторного стебля нашей тРНК представляет собой, так называемый, тупой конец, который имеет маленькое сродство к ферменту, или же 5' конец выступает относительно 3' конца, не позволяя ферменту осуществить катализ.

Выводы. В ходе работы были получены супрессорная тРНК и динуклеотид dpCpA с пришитой к нему неприродной аминокислотой. Для дальнейшей работы требуется более детальное изучение условий реакции лигирования, для получения количества продукта, достаточного для дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into protein. CJ Noren, PG Schultz. Science. 1989. 244:182-188.
2. A biosynthetic approach for the incorporation of unnatural amino acids into proteins. Thorson JS, Cornish VW, Barrett JE, Cload ST, Yano T, Schultz PG. Methods Mol Biol. 1998. 77:43-73.
3. In vivo incorporation of unnatural amino acids into ion channels in *Xenopus* oocyte expression system. Nowak MW, Gallivan JP, Silverman SK, Labarca CG, Dougherty DA, Lester HA. Methods Enzymol. 1998. 293:504-29.
4. Engineering a tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase for the site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins in vivo. Liu DR, Magliery TJ, Pastrnak M, Schultz PG. Proc Natl Acad Sci U S A 1997 Sep 16;94(19):10092-7.