

## Секция «Биоинженерия и биоинформатика»

### Исследование образования амилоидоподобных фибрилл рекомбинантной $\sigma 70$ -субъединицей РНК-полимеразы

*Трофимов Денис Владимирович*

*Студент*

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия*

*E-mail: asilay777@gmail.com*

Амилоидные фибриллы – чрезвычайно прочные линейные нерастворимые агрегаты, формируемые белками с нарушенным фолдингом – характеризуются высокоупорядоченной структурой, в основе которой стопки бета-листов, расположенных перпендикулярно центральной оси. Они не поддаются деагрегации под действием различных низкомолекулярных агентов. Формируемые амилоидными фибриллами «бляшки» являются причиной многих тяжелых, в большинстве своем неизлечимых заболеваний человека, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, диабет, прионные болезни и другие. Недавно в нашей лаборатории было обнаружено, что один из ключевых факторов транскрипции в *E.coli*,  $\sigma 70$ -субъединица РНК-полимеразы ( $\sigma 70$ ), обладает способностью в определенных условиях формировать амилоидоподобные агрегаты [1]. Это дает основание высказать предположение о возможной роли этого процесса в регуляции транскрипции. Для детального изучения механизмов агрегации  $\sigma 70$  необходимо располагать системой для получения высокочистых препаратов как природного белка, так и его мутантных вариантов.

В настоящей работе с использованием IMPACT-технологии был получен препарат белка  $\sigma 70$  природной структуры. При этом использовали экспрессионный вектор, сконструированный на основе коммерческого низкокопийного вектора pCUB4, который содержит ген  $\sigma 70$  и участки, кодирующие модифицированный интеин и хитинсвязывающий домен (CBD). Кроме того, для повышения выхода целевого рекомбинантного белка ( $\sigma 70$ ) и расширения возможностей его аффинной очистки на основе «минимальной» (ориджин репликации + оперон  $\beta$ -лактамазы) плазмиды был сконструирован экспрессионный вектор, содержащий ген составного белка  $\sigma 70$ - интеин-CBD-His6 под контролем сильного tac промотора. Применение нового вектора позволило многократно увеличить выход целевого белка и, используя дополнительную стадию аффинной очистки на Ni-NTA-агарозе, существенно повысить чистоту получаемого препарата  $\sigma 70$ .

Методом атомно-силовой микроскопии показано образование различных амилоидоподобных структур в полученных препаратах белка  $\sigma 70$  и изучена динамика формирования фибрилл.

### Литература

1. Dubrovin E.V., Koroleva O.N., Khodak Y.A., Kuzmina N.V., Yaminsky I.V., Drutsa V.L. AFM study of Escherichia coli RNA polymerase sigma(70) subunit aggregation // Nanomed.-Nanotechnol. Biol. Med. 2012. 8 (1): 54-62.

### Слова благодарности

*Конференция «Ломоносов 2014»*

Автор выражает благодарность Друце В.Л. и Королевой О.Н. за огромную поддержку и полезные наставления