

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ ИМ. В. А. ЭНГЕЛЬГАРДА

На правах рукописи

ИВАНОВ АЛЕКСАНДР ВЛАДИМИРОВИЧ

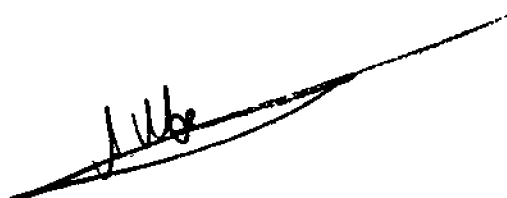
**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ БЕЛКОВ NS5B И NS5A ВИРУСА ГЕПАТИТА С,
ИНГИБИТОРНЫЙ АНАЛИЗ И БЕЛОК-БЕЛКОВОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ**

Специальность 03.00.03 - молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук



Москва

2006

Работа выполнена в Лаборатории химического и биологического анализа биополимеров и клеток и в Лаборатории энзимологии транскрипции Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Научный руководитель:

доктор биологических наук М.К. Куханова

Научный консультант:

доктор химических наук, проф., чл.-корр. РАН С.Н. Кочетков

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор М.Б. Готтих

(НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова)

доктор биологических наук, профессор П.М. Рубцов

(Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН)

Ведущая организация:

НИИ экспериментальной кардиологии ВКНЦ РАМН

Защита диссертации состоится 9 ноября 2006 года в 12 час. на заседании
Диссертационного совета Д 002.235.01 при Институте молекулярной биологии им. В.А.
Энгельгардта РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Автореферат разослан 9 октября 2006 года.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
Кандидат химических наук



А.М. Крицын

Общая характеристика работы.

Актуальность проблемы. Гепатит С, вызываемый вирусом гепатита С (ВГС) относится к наиболее широко распространенным и опасным заболеваниям человека. По оценке ВОЗ в настоящее время ВГС инфицировано более 170 млн. человек по всему миру. Терапия гепатита С, основанная на интерфероне α или его комбинации с нуклеозидным аналогом рибавирином, малоэффективна. Так, вирусологический ответ на нее вырабатывается всего у 40% пациентов, инфицированных наиболее распространенным в России вирусом генотипа 1b. Изучение молекулярно-биологических аспектов функционирования ВГС и поиск новых ингибиторов репликации был затруднен ввиду отсутствия до 2005 года клеточной вирус-реплицирующей культуры. Единственной клеточной культурой, моделирующей некоторые стадии жизненного цикла вируса, является искусственная система, называемая репликоном ВГС. Особый интерес представляет получение и исследование физико-химических и биологических свойств индивидуальных белков ВГС.

Геном ВГС представляет собой (+)-цепь РНК длиной около 9600 нуклеотидов, содержащую одну открытую рамку считывания, кодирующую полипротеин длиной 3011 аминокислотных остатков. Его процессинг под действием клеточных и вирусных протеиназ приводит к образованию четырех структурных и шести неструктурных белков. К первым относят белок нуклеокапсида (С-белок), гликопротеины вирусной оболочки (Е1 и Е2) и полипептид р7. Три неструктурных белка обладают ферментативной активностью: автопротеиназа NS2, функционирующая в составе NS2-3 полипротеина-предшественника, NS3 - сериновая протеиназа/хеликаза/НТРаза и РНК-зависимая РНК-полимераза (Р-РНКП) NS5В. Последняя способна инициировать репликацию генома ВГС без участия праймера (*de novo*). Три других неструктурных белка являются регуляторными. Так, NS4А является кофактором NS3 протеиназы, NS4В и NS5А оказывают влияние на различные клеточные пути передачи сигнала. Последний также определяет вирусный ответ к интерферону и является ингибитором Р-РНКП ВГС. Все неструктурные белки, за исключением NS2, входят в состав репликазы ВГС.

С момента открытия ВГС в 1989 г. было опубликовано большое число работ, посвященных клонированию и экспрессии генов всех белков ВГС в *E.coli* и ряде эукариотических клеточных линий. Однако в большинстве литературных данных отсутствуют подробные характеристики этих систем и их эффективности, что в ряде случаев затрудняет воспроизводимость результатов. Данное замечание относится и к биохимическим характеристикам рекомбинантных вирусных белков, в частности Р-РНКП ВГС.

Первые ингибиторы РНК-полимеразной активности белка NS5В были предложены в 1999 г. К настоящему времени известно всего несколько типов низкомолекулярных ингибиторов. Так, среди аналогов НТР описано лишь пять оригинальных модификаций,

позволяющих им выступать в качестве терминаторных или мутагенных субстратов Р-РНКП и ингибировать репликацию вируса. Учитывая слабую развитость терапии гепатита С (см. выше), поиск новых потенциальных анти-ВГС агентов является весьма актуальным.

Открытым также остается вопрос о статусе и роли регуляторного вирусного белка NS5A. Помимо его роли в ответе на лечение интерфероном, его функции во многом остаются неясными. Так, в 2002 году было показано, что экспрессированный и выделенный из *E.coli* NS5A способен ингибировать Р-РНКП вируса. При этом в эукариотических клетках он присутствует в фосфорилированном состоянии, однако влияние данной посттрансляционной модификации на ингибирующие свойства исследовано не было. Не показано, какие ферменты осуществляют его фосфорилирование NS5A в клетке, Неизвестно также общее количество фосфатных остатков в составе белка и их точная локализация. В то же время, учитывая основополагающую роль фосфорилирования в регуляции клеточной активности, такая информация является совершенной необходимой.

Цели и задачи исследования.

1. Экспрессировать гены неструктурных белков вируса NS5A и NS5B в *E.coli* с высоким выходом и оптимизировать условия их выделения.
2. Оптимизировать условия определения ферментативной активности белка NS5B в праймер-зависимых и праймер-независимых системах.
3. Исследовать влияние ряда соединений на Р-РНКП активность белка NS5B.
4. Идентифицировать протеинкиназы, способные фосфорилировать белок NS5A *in vitro* и картировать области фосфорилирования в его структуре.
5. Оценить влияние степени фосфорилирования неструктурного белка NS5A на ингибирование последним РНК-полимеразной активности белка NS5B.

Научная новизна и практическое значение работы. Сконструирована система экспрессии генов неструктурных белков NS5A и NS5B ВГС в *E.coli*, позволяющая выделять их с высоким выходом (5 мг/л клеточной культуры). Показано, что повышение уровня экспрессии данных белков в этой системе по сравнению с описанной в литературе обусловлено усилением инициации трансляции мРНК и практически не сопровождается интенсификацией транскрипции. Показана возможность применения данной системы для получения ряда мутантных форм Р-РНКП ВГС генотипа 1b, не экспрессирующихся в описанных ранее системах. Представлена подробная методика выделения белков NS5A и NS5B. Доказано, что выделение белка NS5A в денатурирующих условиях с последующей ренатурацией позволяет получить препарат с описанными в литературе биологическими свойствами.

Продемонстрировано, что Р-РНКП ВГС проявляет наибольшую активность при 30°C в присутствии ионов магния или марганца, причем в случае Mn^{2+} активность примерно в 3,5

раза выше, чем в присутствии ионов Mg^{2+} . Показано, что для повышения эффективности ферментативной реакции при применении полиА-олигоU праймер-матричного комплекса необходима достаточно длительная преинкубация фермента с РНК. Напротив, максимальная активность мутантной формы полимеразы NS5B-BL48 в системе праймер-матричного комплекса достигается без или при достаточно короткой преинкубации. Оптимизированы условия определения РНК-полимеразной активности *de novo*.

Впервые показано, что пирогаллол и его производные могут являться обратимыми неконкурентными по отношению к NTP субстрату ингибиторами Р-РНКП ВГС. Их действие проявляется на стадии элонгации праймера и не затрагивает образование тройного комплекса фермент-праймер-матрица. Максимальной активностью обладают соединения, содержащие электроноакцепторный заместитель в α -положении или электронодонорный заместитель в β -положении по отношению к полифенольной системе. При этом, в первом случае гидроксильная группа, находящаяся в пара-положении по отношению к заместителю не играет роли в активности вещества и может быть замещена на водород.

Продемонстрировано, что белок NS5A фосфорилируется *in vitro* казеинкиназами I и II человека, причем в последнем случае фосфорилирование происходит в С-концевой области белка с включением четырех остатков фосфорной кислоты. Показано, что в фосфорилировании NS5A в присутствии лизата гепатоцитов человека или частично очищенного гомогената печени кролика участвует помимо казеинкиназ по крайней мере еще одна протеинкиназа. Фосфорилирование NS5A сопровождается снижением его активности как ингибитора Р-РНКП ВГС.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на международной конференции Московского центра медицинских исследований университета Осло «Advances in Molecular Cell Biology» (Москва, 2004), на Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по молекулярной биологии и генетике (Киев, 2003), международной конференции «Химические и биологические проблемы протеомики» (Новосибирск, 2004), на международной конференции «Nucleic Acid Enzymes» (Таос, США, 2006) и Московской международной конференции «Биотехнология и медицина» (Москва, 2006).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 5 статей в научных журналах и 5 тезисов докладов в материалах конференций.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на ____ страницах, содержит __ рисунков и __ таблиц, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы, включающего _____ источников.

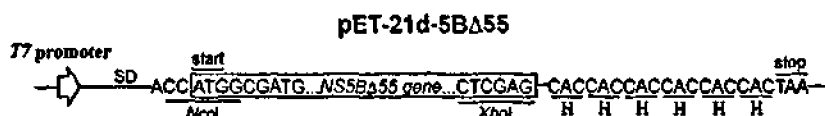
Результаты и обсуждение

Работа состоит из трех разделов. Первый посвящен созданию системы эффективной экспрессии в *E.coli* генов неструктурных белков NS5A и NS5B ВГС и отработки методик их выделения. Второй посвящен изучению физико-химических свойств белка NS5B, оптимизации условий его праймер-зависимой и праймер-независимой РНК-полимеразной активности и изучению производных пирогаллола как ингибиторов данного фермента. Третий раздел посвящен идентификации протеинкиназ, осуществляющих фосфорилирование белка NS5A *in vitro*, и оценке влияния степени фосфорилирования белка на его способность ингибировать Р-РНКП ВГС.

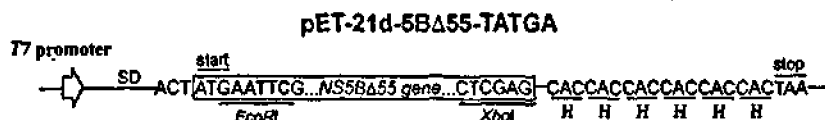
Раздел I. Конструирование системы для эффективной экспрессии белков NS5A и NS5B.

Экспрессия Р-РНКП ВГС при использовании коммерчески доступного вектора pET-21d. Основным объектом данной работы являлась Р-РНКП ВГС, представляющая собой белок с молекулярной массой 68 кДа. По литературным данным экспрессия полноразмерного белка в *E.coli* приводит к образованию телец включения, из которых невозможно выделить полимеразу с сохранением ее ферментативной активности. Экспрессия при температуре $\leq 30^{\circ}\text{C}$ укороченной формы NS5B Δ 21 белка с удаленным С-концевым гидрофобным домом (21 аминокислотный остаток), напротив, позволяет получить растворимый активный белок. Клонирование гена белка NS5B Δ 21 в векторе pET-21d под контролем промотора РНК-полимеразы бактериофага Т7 *E.coli* (Рис. 1А) и экспрессия в *E.coli* BL-21(DE3) при индукции изопропил- β -D-тиогалактопиранозидом (ИПТГ) позволили получить целевой белок с крайне низким выходом ($<0,1$ мг/л клеточной культуры). Для повышения выхода, исходя из наличия

А



В



С

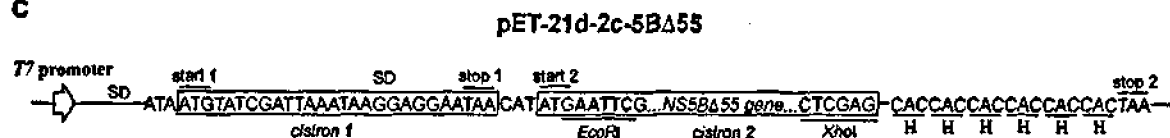


Рис. 1. Схема векторов, экспрессирующих неструктурный белок NS5B. (А) – pET-21d-5B, (В) – pET-21d-5B-TATGA, (С) – pET-21d-2c-5B.

в гене Р-РНКП большого числа так называемых «редких кодонов», в качестве штамма хозяина нами были выбраны штаммы BL-21-CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene) и Rosetta(DE3) (Novagen), содержащие дополнительные копии генов некоторых редких тРНК. Кроме того, индукцию проводили при 22-25°C с использованием заменителя ИПТГ – лактозы. Целевой NS5BA21 белок был получен с выходом 0,6-0,8 мг/л клеточной культуры при ее культивировании в течение 18 часов. Наличие на С-конце полипептидной цепи белка шести остатков гистидина, кодированных вектором рЕТ-21d, дает возможность выделять белок аффинной хроматографией на колонке с Ni-NTA агарозой. Следует отметить, что для полного извлечения белка из лизата клеток при выделении в соответствующем буфере необходимо присутствие не менее 0,5% (v/v) детергента (например, Triton X-100). Кроме того, существенное уменьшение неспецифической сорбции белков *E.coli* на колонке с Ni-NTA агарозой достигается при наличии 0,5 М NaCl в буферах при лизисе клеток и хроматографии. Наконец, важным является поддержание в буфере во время выделения таких ингибиторов протеиназ как PMSF и лейпептин. Роль последнего заключается в предотвращении ограниченного протеолиза целевого белка, происходящего в его N-концевой области с образованием неактивных укороченных форм полимераза с молекулярной массой около 50-62 кДа.

Таблица 1. Экспрессия рекомбинантных белков, полученных в работе.

Белок	Плазмида	Выход (мг/л)	Описание плазмиды	K_m/k_{cat}
Белки ВГС				
NS5BA55-His	pET-21d-5BA55	0,12	исходная	458
	pET-21d-5BA55-TATGA	1	шесть мутаций	512
	pET-21d-2c-5BA55	3,5	двущиственная	583
	pTTQ18-5BA55	<0,04	<i>lac</i> -промотор	
	pLac-2c-5BA55	<0,04	<i>lac</i> -промотор	
NS5A-His	pET-21d-2c-5A	4	двущиственная	
His-NS5A	pET-15-5A	30	однощиственная	
	pET-21d-2c-His-5A	30	двущиственная	
GST-NS5A	pGEX-5X-1-5A	30	однощиственная	
Другие белки				
His-CKI	pET-21d-2c-His-CKI	28	двущиственная	
His-CKII	pET-21d-2c-His-CKII	23	двущиственная	

Другая укороченная форма белка NS5BA55 (с удаленными 55 аминокислотными остатками с С-конца полипептидной цепи) была получена в данной системе аналогично описанной выше с более низким выходом, чем NS5BA21 (0,3 мг/л). Индукция этого белка

при использовании ИПТГ в течение четырех часов позволяла выделить всего 0,12 мг/л культуры (Табл. 1). Более того, метод оказался неприменим для получения другой мутантной формы белка, а именно NS5B-BLΔ8, отличающегося отсутствием в его структуре одной из β-петель (8 аминокислотных остатков), расположенной вблизи активного центра. Так, выход NS5B-BLΔ8 белка не превышал 0,04 мкг/л культуры, причем данная форма полимеразы обладала высокой протеолитической лабильностью. Таким образом, необходимой задачей стала разработка новой системы экспрессии Р-РНКП ВГС, позволяющей получать различные мутантные формы с высоким выходом.

Конструирование высокоэффективной системы экспрессии Р-РНКП ВГС. Одной из возможных причин низкой эффективности экспрессии гена белка NS5B с плазмиды могла являться низкая эффективность инициации трансляции соответствующей мРНК, в большинстве случаев обусловленная устойчивой вторичной структурой в районе сайта связывания рибосом и 5'-концевой области гена (Makrides S.C., 1996). Компьютерное моделирование вторичной структуры мРНК показало, что последовательность Шайн-Дальгарна лежит в одноцепочечном участке, а другой элемент сайта связывания рибосом – инициаторный AUG кодон и последующие несколько нуклеотидов, напротив, образуют дуплексы с комплементарными участками 5'-концевой области гена (Рис. 2А).

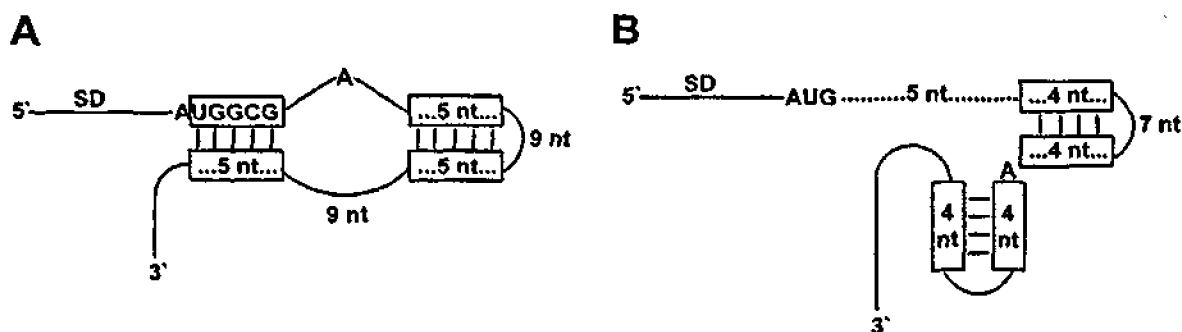


Рис. 2. Компьютерная модель вторичной структуры мРНК в районе сайта связывания рибосом и 5'-концевой области гена NS5B белка (моделирование проводили с применением программы "Genebee"). мРНК соответствуют плазмидам рЕТ-21d-5BΔ55 (А), рЕТ-21d-5BΔ55-TATGA и рЕТ-21d-2c-5BΔ55 (В).

Такая структура может быть частично разрушена при замене одного нуклеотида, предшествующего AUG старт-кодону, и пяти следующих за ним на U и AAUUC, соответственно. Следует отметить, что по литературным данным нуклеотиды U и A, фланкирующие старт-кодон, усиливают взаимодействие с формилметионин-тРНК. По данным моделирования подобные замены приводят к тому, что в соответствующей мРНК весь сайт связывания рибосом находится в одноцепочечном участке и, может быть более доступен для связывания рибосом (Рис. 2В). Кроме того, дуплексы в данной мРНК состоят из четырех нуклеотидов каждый и менее стабильны, чем дуплексы длиной пять нуклеотидов исходной мРНК.

Замена данных шести нуклеотидов в плазмиде pET-21d-5BΔ55 (Рис. 1А) с образованием новой плазмиды pET-21d-5BΔ55-TATGA (Рис. 1В) приводила к изменению двух аминокислотных остатков N-концевой области белка, но не отражалась на его ферментативной активности. Эта модификация позволила повысить выход Р-РНКП в восемь раз (с 0,12 мг/л до 1 мг/л, Табл. 1) при индукции ИПТГ в течение четырех часов в штамме Rosetta(DE3) *E.coli* (Рис. 3А). При этом по данным эксперимента по сравнению уровней соответствующих мРНК методом Northern blot-гибридизации модификация плазмиды слабо отразилась на уровне транскрипции гена Р-РНКП (уровень возрос в 1,3 раза) (Рис. 3В). Таким образом, увеличение экспрессии целевого белка коррелировало с изменением вторичной структуры мРНК и, по-видимому, объяснялось повышением эффективности инициации трансляции.

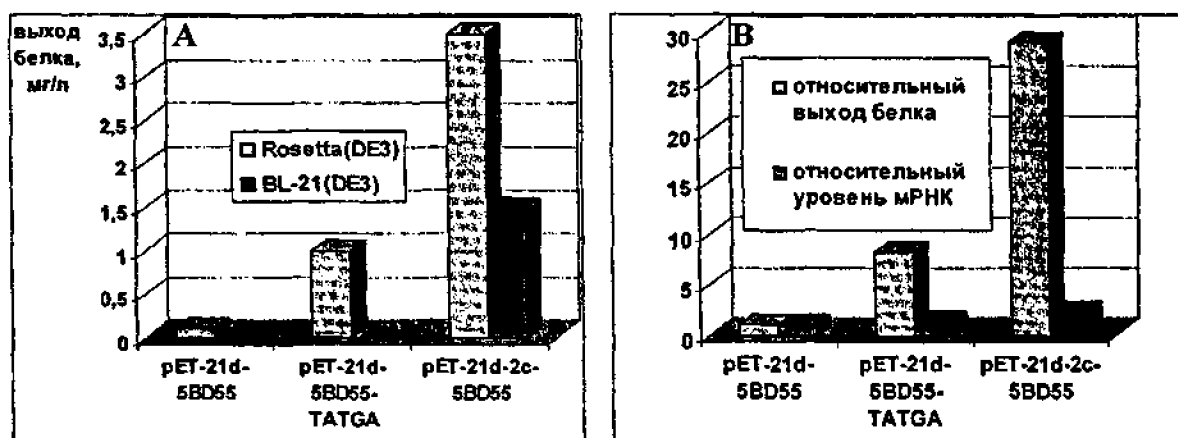


Рис. 3. (А) Сравнение выхода белка NS5BΔ55 при его экспрессии в штаммах Rosetta(DE3) и BL-21 (DE3) *E.coli*. (В) Сравнение уровней экспрессии NS5BΔ55 белка и транскрипции его гена в штамме Rosetta(DE3) *E.coli* относительно исходного продуцента [плазмида pET-21d-5BΔ55, штамм Rosetta(DE3)].

Дополнительное увеличение выхода белка до 3,5 мг/л было достигнуто введением второй короткой АТ-богатой открытой рамки считывания (цистрона), расположенной на три нуклеотида выше целевого гена и содержащей дополнительную последовательность Шайн-Дальгарна, находящуюся на оптимальном расстоянии от старт-кодона другой рамки считывания для обеспечения реинициации трансляции (рис. 1С). Изменение достаточно протяженного участка мРНК, предшествующего гену белка NS5B, не привела к нарушению ее вторичной структуры (Рис. 2В). Увеличение выхода Р-РНКП может объясняться природным эффектом трансляционного сопряжения, увеличивающего эффективность инициации трансляции дистального цистрона и имеющего место, например, в случае *lac*-оперона *E.coli*. Кроме того, частичный вклад может вносить и 1,9-кратное повышение уровня соответствующей мРНК (Рис. 3В).

Исследование кинетики накопления белка показало, что максимальный выход достигается спустя 6,5-8,5 часов после его индукции ИПТГ и составляет 5 мг/л клеточной культуры. С помощью данной системы с близким выходом была экспрессирована другая мутантная форма Р-РНКП ВГС - NS5B-BLΔ8.

В работе была продемонстрирована необходимость использования при высокоэффективной экспрессии NS5BΔ55 белка штаммов *E.coli*, содержащих дополнительные копии редких тРНК. Так, замена штамма Rosetta(DE3) на BL-21 (DE3) приводила к понижению выхода NS5BΔ55 белка в 2,3 раза (Рис. 3А). Таким образом, элонгация трансляции также определяет уровень экспрессии белка.

Обсуждаемый выше максимальный уровень экспрессии NS5BΔ55 составлял около 2% от общего количества белков *E.coli*. В то же время по литературным данным двуцистронная система позволяет повышать уровень экспрессии рекомбинантных белков до 30-40%. Одной из возможных причин столь сильного различия между уровнями экспрессии различных белков может быть нарушение природного сопряжения транскрипции (40 нуклеотидов в секунду) и трансляции (около 15 аминокислотных остатков в секунду). U.K. Mukhohfdhyau (2002) высказал предположение, согласно которому для максимального выхода белка необходимо помещать цистроны под контроль промоторов РНК полимеразы *E.coli*. Замена последних на промотор РНК-полимеразы бактериофага Т7 приводит к дисбалансу между трансляцией и транскрипцией и, как следствие, повышенной доступности образующейся мРНК для нуклеаз. Мы заменили Т7 промотор на более слабый *lac* промотор, однако данная модификация привела к резкому понижению выхода Р-РНКП ВГС (Табл. 1).

Экспрессия неструктурного белка ВГС – NS5A. Описанная выше двуцистронная система экспрессии позволила выделить другой неструктурный белок ВГС – NS5A с последовательностью из шести гистидинов на С-конце полипептидной цепи (NS5A-His₆) из плазмиды на основе вектора рЕТ-21-2с-5А с выходом 4 мг/л клеточной культуры (Табл. 1). Его аналог с гексагистидиновой последовательностью на N-конце цепи (His₆-NS5A) был получен из плазмиды рЕТ-21-N-2с-5А с выходом около 30 мг/л. Следует отметить, что аналогичным уровнем экспрессии обладали продуценты His₆-NS5A и GST-NS5A, созданные на основе одноцистронных векторов рЕТ-15b и рGEX-5X-1. Исходя из этих данных, можно предположить, что двуцистронная система экспрессии эффективна для получения высокого выхода белков, гены которых слабо экспрессируются в одноцистронных векторах, и белков, N-концевую область которых нельзя изменять без потери их биологических свойств.

Белок NS5A выделяли методом аффинной хроматографии на колонке с Ni-NTA-агарозой в денатурирующих условиях с последующей ренатурацией. Показано, что данный

белок не имеет сродства к таким слабым ионообменникам как ДЭАЭ-целлюлоза и карбоксиметилцеллюлоза.

Раздел II. Изучение физико-химических свойств белка NS5B, оптимизация условий определения РНК-полимеразной активности и изучение ингибиторных свойств производных пирогаллола.

Праймер-зависимая РНК-полимеразная активность NS5B белка. Следующим этапом работы было изучение функциональных свойств трех форм Р-РНКП ВГС: NS5BΔ21, NS5BΔ55 и NS5B-BLΔ8. Эти формы отличаются от белка дикого типа отсутствием в их структуре 21 (NS5BΔ21) или 55 (S5BΔ55) аминокислотных остатков на С-конце полипептидной цепи, а также взаимодействующей с ними одной из β-петель (NS5B-BLΔ8). У Р-РНКП дикого типа контакт этих элементов, расположенных вблизи активного центра, препятствует связыванию РНК-дуплекса с ферментом и в природе обеспечивает селективность фермента в пользу беспраймерной (*de novo*) инициации репликации вирусного генома. Как следствие, природная форма белка NS5B и ее производное NS5BΔ21 обладают гораздо более низкой (по сравнению с другими ДНК-и РНК-полимеразами) способностью утилизировать комплексы матрицы с праймером, содержащим более трех нуклеотидов (Zhong W. et al, 2000), что делает единственно возможным контроль за прохождением реакции на основе множественного включения $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NMP}$. Примерами таких систем являются поли(А)-олиго(У) и поли(С)-олиго(Г) праймер-матричные комплексы. Литературные данные о физико-химических характеристиках фермента (оптимальная концентрация ионов металлов, температура реакции, необходимость преинкубации для образования тройного комплекса)

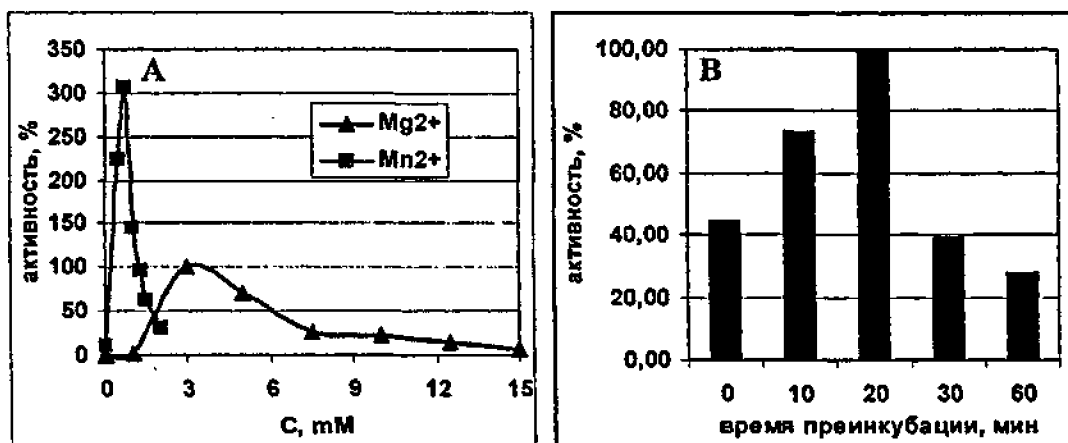


Рис. 4. (А) Зависимость активности NS5BΔ21 от концентрации Mg^{2+} () и Mn^{2+} (■). За 100% принимали максимальную активность фермента в присутствии ионов Mg^{2+} . (В) Зависимость активности фермента от времени преинкубации с полиА-матрицей и олигоУ-праймером в присутствии ионов Mg^{2+} .

существенно различаются. Мы показали, что представленные формы Р-РНКП ВГС проявляют наибольшую активность при 30°C в присутствии 3-5 мМ $MgCl_2$ или 0,75 мМ $MnCl_2$, причем в присутствии ионов Mn^{2+} она была примерно в 3,5 раза выше, чем в присутствии ионов Mg^{2+} (Рис. 4А). При определении активности с применением как поли(А)-олиго(У)-, так и поли(С)-олиго(Г) праймер-матричного комплекса наибольший уровень включения соответствующего NMP наблюдался после 20 минутной преинкубации фермента с РНК (Рис.4В).

В данных условиях линейное накопление продукта реакции наблюдалось в течение первых 30-40 мин (Рис.5). При добавлении глицерина до концентрации 10% (v/v) протяженность линейного участка увеличивалась, но скорость реакции при этом снижалась вдвое. Напротив, детергенты (напр. Твин-20) и бычий сывороточный альбумин не влияли на активность Р-РНКП.

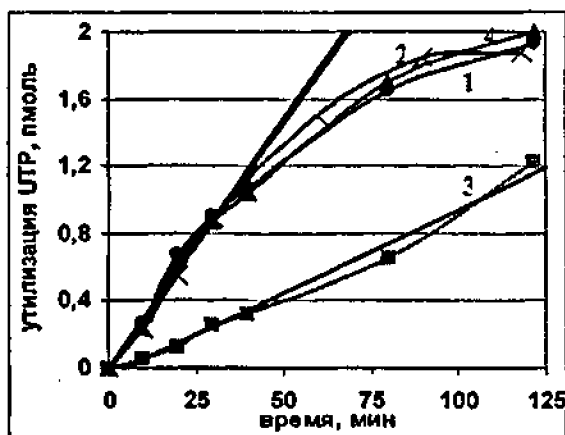


Рис. 5. Кинетические кривые накопления продукта реакции элонгации праймера, катализируемой NS5BΔ21 в отсутствие (1) или в присутствии (2) бычьего сывороточного альбумина (БСА), глицерина (3) или детергента Твин-20 (4).

Описанные выше условия определения ферментативной активности были оптимальными для всех трех мутантных форм Р-РНКП (NS5BΔ21, NS5BΔ55 и NS5B-BLΔ8), однако активность двух последних примерно в 50 раз превышала таковую белка NS5BΔ21, что по литературным данным может объясняться повышенной доступностью активного центра для праймер-матричного РНК дуплекса. Эффективность элонгации длинных (больше 3 нуклеотидов) праймеров в составе дуплексов была косвенно подтверждена на примере «беспетельной» формы NS5B-BLΔ8. Так, данный белок при 30°C в результате инкубации с самокомплементарным праймером (5'-GCAUGGGCCC) и соответствующими NTP включал нужное число звеньев. Следует отметить, что активность NS5B-BLΔ8 в этой системе, в отличие от NS5BΔ21 в системе поли(А)-олиго(У) праймер-матричного комплекса, уменьшалась при длительной преинкубации белка с праймером. Данная система оказалась оптимальной для изучения субстратных свойств модифицированных dNTP. Так, из Рис. 6В можно видеть, что

субстратом фермента может являться 4'-азидоуридин, но не бициклический трифосфат 3-(β-D-рибофуранозил)-6-гексил-2,3-дигидрофуо[2,3-d]пиримидин-2-она.

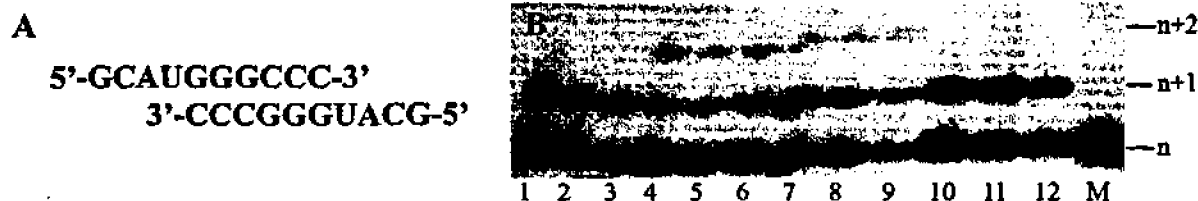


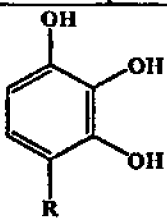
Рис. 6. (А) Структура самокомплементарного праймера SSU. (В) Элонгация праймера SSU в присутствии АТФ (1-3), АТФ и УТФ (4-6), АТФ и 4'-N3-УТФ (7-9), АТФ и аналога NTP (10-12). Концентрация субстратов составляла 20 (1,4,7,10), 50 (2,5,8,11) и 100 (3,6,9,12) мкМ, за исключением концентрации АТФ в экспериментах 4-12 равной 100 мкМ. М – исходный олигонуклеотид.

Производные пирогаллола – эффективные ингибиторы Р-РНКП ВГС. В нашей работе было впервые показано, что пирогаллол (1,2,3-тригидроксибензол) и ряд его производных одинаково эффективно ингибировали реакцию, катализируемую NS5BΔ21 и NS5BΔ55 формами Р-РНКП ВГС. Наивысшую активность проявили соединения, содержащие электроноакцепторный заместитель в α-положении (Ib,k-u) или электронодонорный – в β-положении (II-f-j) по отношению к полифенольной системе (Табл. 2). При этом роль заместителя, по-видимому, сводится к созданию определенного электронного распределения в ароматической системе и, тем самым, нужных зарядов гидроксильных групп. Так, столь сильные отличия соединений с электроно-донорными (II-f-j) и электроноакцепторными (Ib,k-u) заместителями можно объяснить их влиянием на рK_a гидроксильных групп по (+)- и (-)-мезомерному механизму, соответственно. В последнем случае (-)-мезомерный эффект приводит к уменьшению значений рK_a ряда гидроксильных групп в 2-м и 4-м положениях относительно заместителя.

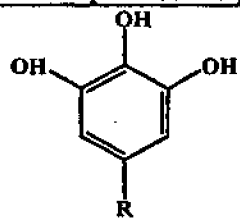
В то же время сам заместитель, скорее всего, не участвует во взаимодействии ингибитора с ферментом. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что одинаковую активность проявляли соединения, в 4-положении кольца которых находился заряженный (IIh,i) или незаряженный (IIg) атом азота, объемная бензильная (III) или маленькая метильная (IIh) группы, или атом кислорода (IIf). Отдельно следует упомянуть симметричные гидразоны (I-IIj). Их активность примерно в два раза превышала таковую для монозамещенных соединений (I,II-f-i), что может объясняться дублированием ароматической компоненты. Среди производных пирогаллола, содержащих электроноакцепторные заместители, сходным было действие 2,3,4-тригидроксибензальдегида (Ib) и его аддуктов с гидроксиламинами (Ik,l) или с анилином (Ip) и его производными (Iq-t). Все это косвенным образом свидетельствует об отсутствии контактов белка с заместителем при полифенольной системе. Наконец,

Таблица 2. Производные три- и дигидроксибензолов – ингибиторы Р-РНКП ВГС

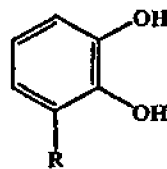
Таблица 2. Гидроксибензотриены для гидроксибензотриеновых ингибиторов I-III и IV-V



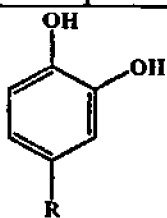
I



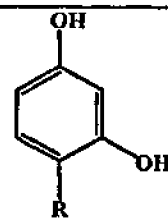
II



III



IV



V

R =	X =	IC ₅₀ , μM				
		I	II	III	IV	V
a: R = -H (пирогаллол)		8-10		.*	-	-
b: R = -CHO		2-3	1000	2,5-3	>1000	HA**
c: R = -COOH		-	200	100-200	-	-
d: R = -COOCH ₃		-	-	>1000	-	-
e: R = -C(O)CH ₃		30	-	-	-	-
R = -CH=N- N<C ₄ H ₈ >X****	f: X = O	30-40	10	-	>400	-
	g: X = NCH ₃					
	h: X = N ⁺ (CH ₃) ₂					
	i: X = N ⁺ (CH ₃)(CH ₂ C ₆ H ₅)					
j: R = -CH=N-N<C ₄ H ₈ >N-N=CH-		10-20	5	-	100-200	-
k: R = -CH=N-OH		2	-	-	-	-
l: R = -CH=N-OCH ₃		5	12	-	-	-
m: R = -CH=N-NH-C(O)CH ₃		11	90	-	-	-
n: R = -CH=N-NH-C(O)C ₆ H ₃ (NO ₂) ₂		3	-	-	-	-
o: R = -CH=N-NH-SO ₂ C ₁₀ H ₆ N(CH ₃) ₂		30	90	-	-	-
R = -CH=N-C ₆ H ₄ -X	p: X = H	2	500	1,5-2,5	HA	HA
	q: X = o,m,p-NO ₂	2	-	-	-	-
	r: X = o,m,p-COOH	2-3	-	-	-	-
	s: X = o-Cl	1,4	-	-	-	-
	t: X = o-Br	2	-	-	-	-
u: R = -C(CH ₃)=N-C ₆ H ₅		3	-	-	-	-

* - не определялось

** - неактивно

***N<C₄H₈>X - 1,4- пиперидин (X = N) или морфолин (X = O)

группы соединений (Ib,k-u) только гидроксилы в положениях 2 и 3 являются функциональными, что подтверждается отсутствием значимой активности их аналогов (IVb,p) и (Vb,p), синтезированных на основе 3,4- и 2,4-дигидроксibenзальдегида, и столь же высокой эффективностью производных (IIIb,p). Отдельное место в ряду ингибиторов занимает сам пироллол. С одной стороны, его можно рассматривать как соединение ряда (I), содержащее электронодонорный атом водорода в β -положении к полифенольной системе. С другой стороны, любую из боковых гидроксильных групп можно считать электроноакцептором заместителем, что позволяет расположить вещество и в ряду (III). Действительно, значение IC_{50} для него близко к таковым для серии ингибиторов (IIf-j), и слегка уступало IC_{50} для 2,3-дигидроксibenзальдегида (IIIb), что может объясняться меньшей силой (-)-мезомерного эффекта, создаваемого гидроксильной группой, по сравнению с эффектом формильной группы.

Эффект ингибирования соединениями (I-III) полимеразной реакции объясняется их взаимодействием с ферментом, а не с РНК. В пользу этого свидетельствует их сходная активность в системах поли(А)-олиго(У) и поли(С)-олиго(Г) праймер-матричных комплексов. В обсуждаемых экспериментах ингибиторы вносились в реакционную смесь после преенкубации фермента с РНК, т.е. после образования тройного комплекса фермент-матрица-праймер. При этом регистрируется влияние ингибитора как непосредственно на элонгацию полинуклеотидной цепи, так и на повторную реинициацию синтеза. Для установления стадии ферментативной реакции, на которую действует ингибитор, нами был использован гепарин, добавление которого в реакционную смесь после преенкубации, как известно, приводит к связыванию не вошедшего в тройной комплекс фермента и препятствует реинициации синтеза, что позволяет изучать исключительно стадию элонгации праймера. Из рис. 7А следует, что добавление гепарина до конечной концентрации >10 нг/мкл действительно

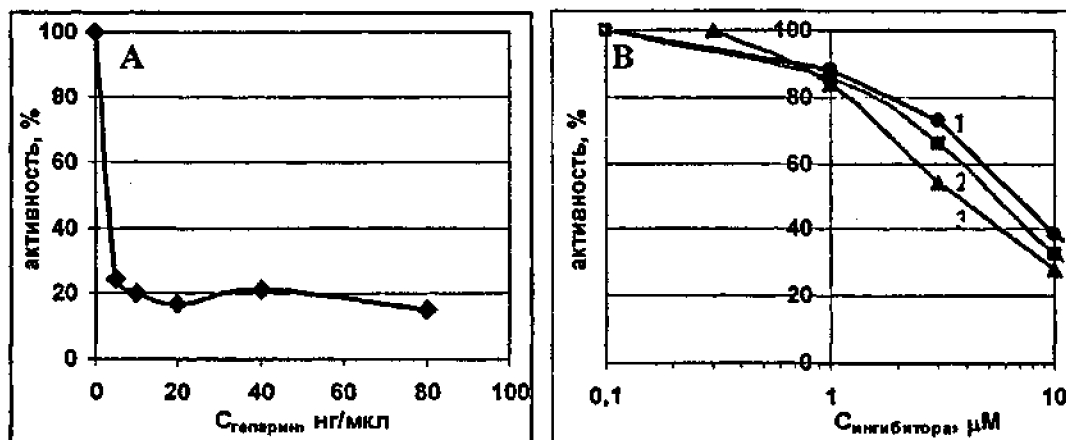


Рис. 7. Зависимость активности Р-РНКП ВГС от концентрации гепарина (А) и ингибитора (IIj) (В). Ингибитор добавлялся в реакционную смесь вместе с гепарином после преенкубации белка с праймер-матричным комплексом (1) или до нее (2), или без гепарина до преенкубации (3).

приводило к подобному эффекту. В этих условиях активность фермента была в 5–6 раз ниже, чем активность фермента в отсутствие гепарина. На примере симметричного гидразона (II) было установлено, что соединения практически одинаково ингибируют полимеразную реакцию как в присутствии, так и в отсутствие гепарина (рис. 7В). Таким образом, производные пирогаллола активны на стадии элонгации праймера. Возможность действия ингибиторов на процесс образования комплексов фермент–матрица–праймер была проверена следующим образом. В двух сериях экспериментов гидразон (II) добавляли в реакционную смесь до или после преинкубации Р-РНКП с поли(А) и (Up)₃U. На рис. 7В видно, что эффективность ингибитора не меняется при его введении одновременно с матрицей и праймером. Следовательно, ингибирующее действие соединения (II) имеет место исключительно на стадии элонгации.

Действие соединений не является конкурентным по отношению к нуклеозид-5'-трифосфатам (Рис. 8А), иными словами связывание ингибитора возможно как с комплексом фермента с УТР, так и с ферментом без УТР, кроме того, связавшийся ингибитор не блокирует связывание нуклеозидтрифосфата.

Наконец, действие ингибиторов на Р-РНКП ВГС является обратимым, что было показано в следующем эксперименте. Водорастворимый гидразон (IIh) инкубировали в течение 10 мин с ферментом в концентрации близкой к IC₅₀ (10 μМ), затем проводили преинкубацию с праймер-матричным комплексом с последующей элонгацией (1, Рис.8В). После разбавления смеси в 10 раз происходило восстановление активности фермента с 52% (1) до 85% (2). Как видно из сравнения 2 и 3, (Рис. 8В), активность фермента после разбавления смеси не достигает уровня контроля. Это, по-видимому, связано с высокой термоллабильностью белка.

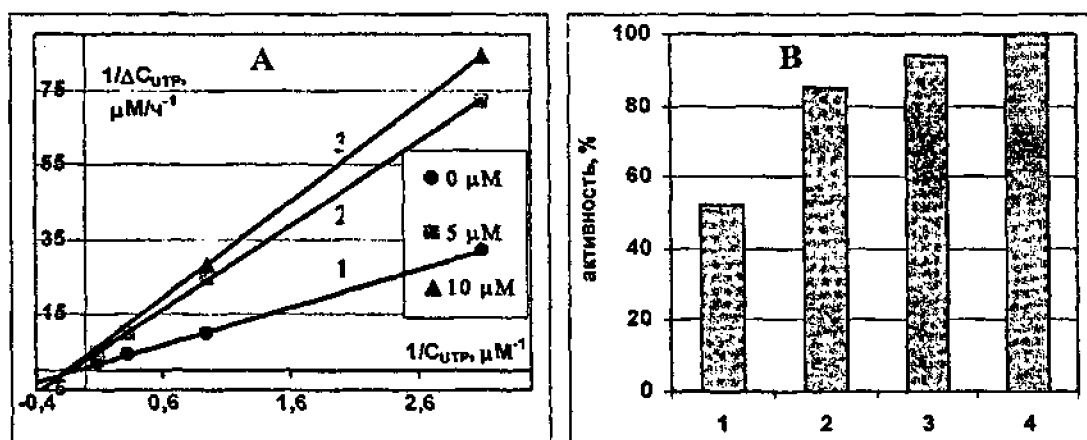


Рис. 8. (А). Зависимость активности Р-РНКП ВГС от концентрации УТР в отсутствие (1) или в присутствии ингибитора (II) в концентрациях 5 (2) или 10 μМ (3). (В) Анализ обратимости связывания ингибитора с ферментом. Фермент инкубировали с соединением (IIh) в концентрации 10 μМ (1), или 10 μМ с последующим разбавлением до 1 μМ (2), в присутствии 1 μМ ингибитора (3), а также без ингибитора (4).

Раздел III. Фосфорилирование белка NS5A *in vitro* и оценка влияния степени фосфорилирования белка на его способность ингибировать Р-РНКП ВГС.

Влияние степени фосфорилирования белка NS5A на его способность ингибировать Р-РНКП. Мы показали, что фосфорилирование *in vitro* белка NS5A в присутствии лизата клеточной культуры гепатоцитов человека (Huh7) лишает его способности подавлять полимеразную реакцию, катализируемую белком NS5B (Рис. 9). Из рисунка следует также, что ингибирование Р-РНКП нефосфорилированным белком NS5A, по-видимому,

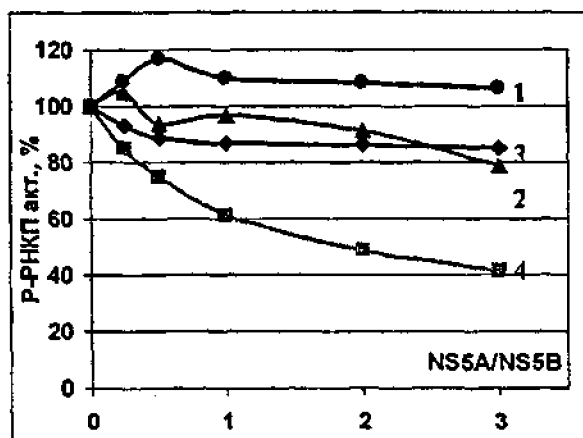


Рис. 9. Влияние фосфорилированной (1,2) и нефосфорилированной (3,4) форм белка NS5A на активность Р-РНКП ВГС при его добавлении к ферменту вместе с праймером и матрицей (2,4) или после преинкубации с ними (1,3).

происходит из-за блокирования инициации полимеразной реакции. Так, белок NS5A оказывает влияние на ферментативную реакцию только при добавлении к Р-РНКП вместе с праймером и матрицей, тогда как при его внесении после преинкубации эффект исчезает (Рис. 9).

Фосфорилирование белка NS5A *in vitro*. В литературе было показано фосфорилирование белка NS5A *in vitro* казеинкиназой 2 (СКII) и протеинкиназой А (РКА), однако отсутствовали данные, касающиеся сайтов фосфорилирования и количества вводимых фосфатных групп в белок. Кроме того, неизвестно, существуют ли другие протеинкиназы, субстратом которых способен выступать NS5A.

В данной работе осуществлено компьютерное моделирование потенциальных сайтов фосфорилирования белка NS5A киназами SKI и SKII. В таблице 3 показаны лишь сайты первичного фосфорилирования, тогда как при введении фосфатных групп могут возникать новые сайты. Это связано со способностью данных киназ эффективно фосфорилировать остатки серина и треонина, в +3 (SKII) или -3 (SKI) положениях к которым находятся фосфосерин или фосфотреонин. Как видно из таблицы 3, оба фермента теоретически способны осуществлять посттрансляционную модификацию вирусного белка. Следует отметить, что разные компьютерные программы указывают разное число возможных сайтов что, по-видимому, объясняется различной вероятностью их фосфорилирования и относи-

Таблица 3. Компьютерное моделирование сайтов возможного фосфорилирования белка NS5A киназами I и II, проведенное с использованием трех различных Интернет серверов. Жирным шрифтом показаны возможные сайты, предсказанные тремя серверами, курсивом представлены сайты, предсказанные другими двумя программами.

Сервер	CKI	CKII
PredPhos	T242, T245, T274, T364, T367, S369, S370, S385, S390, S412, S414, S429, S432, S435	S151, T245, T270, S328, S386, T406, S408, T435
NetPhosK 1.0	T53, S222, S225, S228, S229, S230, S232, S235, S238, S297, T367, S382, S383, S385, S386, S369, S408, S412, S414, S429, S437, S441	S230, S237, S383, S385, S386, S396, S408, S429, S437, S441
GPS	T53, S386, S412, S429, S432	T270, S369, S408, S412, S414, S426, S434, T435, S437, S441

тельно низкой специфичностью данных ферментов, что приводит к неоднозначности определения их теоретических сайтов. Другой факт, который необходимо упомянуть, заключается в том, что при расщеплении белка NS5A трипсином, полученного из культуры эукариотических клеток, модификации подвергаются практически только остатки серина, тогда как треонина – лишь в незначительной степени

Для подтверждения фосфорилирования белка NS5A *in vitro* под действием данных протеинкиназ, необходимо было иметь препараты соответствующих ферментов. С этой целью гены CKI и каталитической α -субъединицы CKII были отклонированы, используя библиотеки кДНК различных тканей человека, и помещены в рЕТ-21-N-2с вектор, обсуждавшийся выше. Образующиеся химерные белки содержали последовательность из шести остатков гистидина, соединенную полилинкером (аналогично вектору рЕТ-15b) с N-концом полипептидной цепи. Экспрессия CKII при 22°C, индуцированная 1 mM ИПТГ, привела к целевому белку с выходом около 15-20 мг/л клеточной культуры. При этом около половины белка находилось в составе телец включения, однако вторая половина была успешно выделена в активном виде в нативных условиях на колонке с Ni-NTA-агарозой с дополнительной очисткой на колонке с гепарин-агарозой. CKI, напротив, количественно находилась в виде нерастворимой фракции, выделение которой в денатурирующих условиях с последующей ренатурацией не позволило получить активную протеинкиназу. Неудачными оказались попытки повысить растворимость образующейся в клетках *E.coli* CKI при ее экспрессии при пониженной температуре (18°C и 6°C), а также при ее индуцировании более низкой концентрацией ИПТГ (0,1-1 mM). Аналогичный результат был получен и для CKI, ген которой был помещен в одноцистронный рЕТ-15b вектор. Поэтому в дальнейшей работе был использован коммерчески доступный препарат CKI из печени крысы.

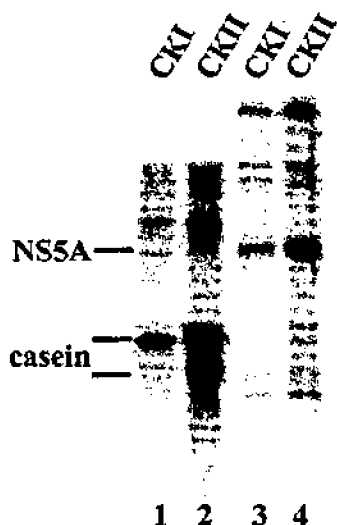


Рис. 10. (А). Фосфорилирование казеина (1,2) и NS5A (3,4) киназой I из печени крысы (1,3) и киназой II человека (2,4)

Проведенные эксперименты продемонстрировали, что белок NS5A может быть фосфорилирован *in vitro* киназами I и II (Рис. 10). Следует отметить, что эффективность фосфорилирования CKII была близка к таковой для одного из ее природных субстратов – казеина.

Свойства белка NS5A, фосфорилированного CKII. Белок NS5A не способен ингибировать Р-РНКП ВГС не только при его фосфорилировании в присутствии лизата культуры эукариотических клеток, но и при фосфорилировании рекомбинантной CKII. Это было продемонстрировано в эксперименте, в котором из реакции фосфорилирования NS5A под действием CKII отбирались аликвоты, которые после термоинактивации киназы вводились в

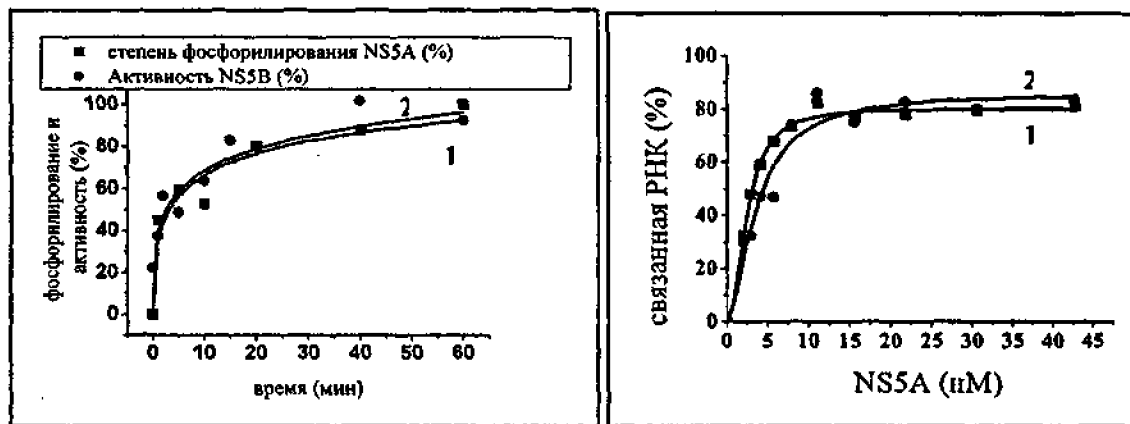


Рис. 11. (А) Кинетика фосфорилирования NS5A белка киназой II (1). Аликвоты реакции были прогеты для инактивации фермента и добавлены в реакцию элонгации, катализируемую NS5B (2). (В) Связывание додекауридилата при различных концентрациях фосфорилированной (1) и нефосфорилированной (2) форм NS5A. Концентрация белка, при которой происходит связывание половины олигонуклеотида, соответствует константе диссоциации образующегося комплекса

полимеразную реакцию (Рис. 11А). Этот результат может быть объяснен понижением или исчезновением сродства NS5A белка или к NS5B, или к РНК. Оценка РНК-связывающей активности была проведена при инкубации белка NS5A с радиоактивно-меченным двенадцатизвенным рибо(У) олигонуклеотидом с последующей фильтрацией реакционной смеси через нитроцеллюлозную и нейлоновую мембраны и визуализацией связавшейся с ними радиоактивности. Эти мембраны имеют сродство к РНК-белковому комплексу и свободной РНК, соответственно. Процент радиоактивности, связавшейся с нитроцеллюлозной мембраной, по отношению к таковой на обеих мембранах представляет собой процент РНК-олигонуклеотида, находящегося в составе РНК-NS5B комплекса. На основании зависимости процента такого комплекса от концентрации фосфорилированной и нефосфорилированной форм NS5A белка можно видеть, что константы диссоциации данных комплексов близки в обоих случаях (1,24 и 1,84 нМ, соответственно, Рис. 11В). Таким образом, фосфорилирование NS5A белка не влияет на его РНК-связывающую активность.

Картирование сайтов фосфорилирования NS5A при катализе СКII. По данным расчета четыре аминокислотных остатка белка NS5A подвергаются фосфорилированию. Для определения фосфорилируемой области NS5A белок инкубировали с СКII и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, разделяли продукты в SDS-ПААГ и без выделения меченого белка проводили ограниченный протеолиз, катализируемый трипсином. После элюции из геля продукты анализировали методом MALDI масс-спектрометрии. Было показано, что один из образовавшихся пептидов соответствующий непосредственно С-концевой области белка, содержал четыре остатка фосфорной кислоты (Рис. 12). Этот факт был также подтвержден в независимом эксперименте. ^{32}P -Меченый NS5A-His₆, содержащий шесть остатков гистидина на С-конце молекулы, подвергали органическому трипсинолизу в растворе и проводили разделение продуктов на колонке с Ni-NTA-агарозой. При этом вся радиоактивная метка содержалась в продукте, имеющем сродство к сорбенту, иными словами в его С-концевой части (Рис. 12).

```

MNSSGSWLRD VNDWICTVL TDFKTL RSKLLSRLPGV PFLSCQ RGYKGVWRGDGITQTTCFCGAQIAGHVKNGP
MRIVGPGTCSNTWHGTFPINAYTTGPCTPSPAPNYSRALWLVA AEYVEITRVODFHYMTGMTTDNVKRPCQVP
APEFFTEVDGVR LHRYAPVCKPLLHEDVTFQVGLNQYL VGSQ L PCEPEPDVAVLTSMLTDP SHITAE TAKRRLA
RGSSPSLASSASQ L SAPSLKATCTTRHDS PDADLIEANLLWRQEMGGNITRVESENKV VILDPFDPLRAEED E
REVSVPAEILRKTRKFPSAMP IWARPDYNP LLESWKDPDYVPPV VHG C L PPTKVPP I P P P P R R K R T V V L T E S T
VSSALAE LATKTF GSSSESSAVDSGTAAASPDQPSDIGDTGSDVESYSSMPPLEGEFGDS D L S D G S W S T V S E A S
EDVVCCLNNNNH

```

Рис. 12. Первичная структура белка NS5A, содержащего шесть остатков гистидина на С-конце цепи. Первые три остатка (жирный курсив) кодированы вектором. С-концевая область белка, которая подвергается фосфорилированию СКII, представлена жирным шрифтом. Подтвержденный сайт фосфорилирования выделен подчеркиванием.

Методом сайт-направленного мутагенеза была предпринята попытка картирования сайтов фосфорилирования СКІ в структуре NS5A белка. Так, замена остатка T435A не привела к снижению эффективности фосфорилирования белка. Напротив, мутагенез S408A подтвердил модификацию данного остатка серина (Рис. 12).

Анализ продуктов протеолиза фосфорилированного СКІ и ІІ NS5A белка методом ВЭЖХ показал наличие одного меченого продукта в каждом случае, причем они имели сходное время удерживания на колонке (Рис. 13). Отсюда можно предположить, что фосфорилирование в присутствии СКІ также происходит в С-концевой области белка.

Для моделирования фосфорилирования NS5A белка в эукариотической клетке, наряду с индивидуальными казеинкиназами были также использованы лизат культуры гепатоцитов человека Huh7 и частично очищенный на сорбенте Affi-gel Blue Gel гомогенат печени кролика. Данная хроматография гомогената позволяла получить препарат, обогащенный АТР-связывающими ферментами (в том числе протеинкиназами) и лишенный, по крайней мере, части протеиназ и фосфатаз.

При переходе от рекомбинантных СКІ и ІІ к лизату гепатоцитов и описанному выше препарату печени кролика в процессе разделения меченых пептидов регистрировалось наличие двух меченых продуктов в случае NS5A-His₆ и трех – в случае His₆-NS5A форм белка (Рис. 13). Таким образом, наряду с казеинкиназами, в эукариотических клетках присутствует, по крайней мере, одна протеинкиназа, субстратом которой является NS5A белок. Кроме того, следует отметить, что третий продукт в случае His₆-NS5A белка, скорее всего, объясняется возникновением дополнительного артефактного сайта фосфорилирования при введении шести остатков гистидина, соединенных с NS5A линкером из 13 аминокислотных остатков, тогда как у NS5A-His₆ формы линкер представляет собой лишь два остатка (Рис. 12).

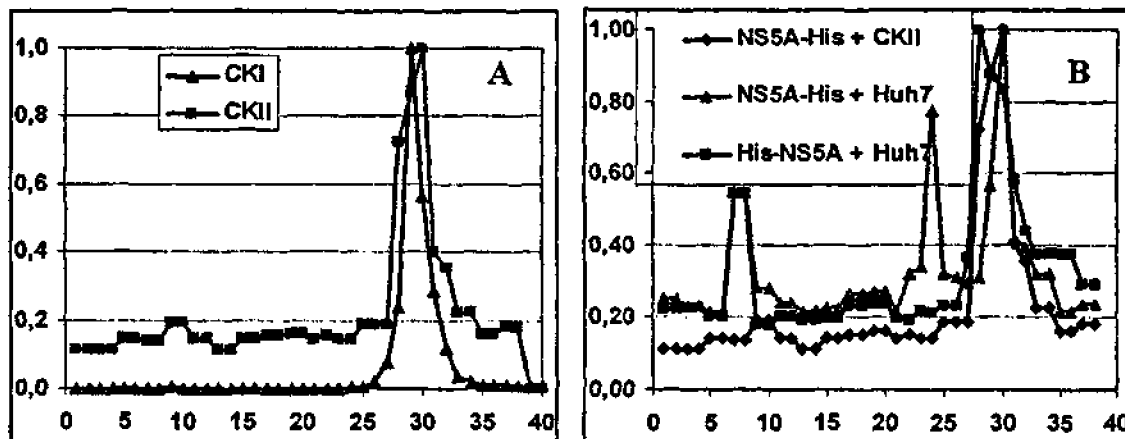


Рис. 13. Профили разделения радиоактивно меченных продуктов протеолиза трипсином белка NS5A, фосфорилированного СКІ, СКІІ и лизатом культуры гепатоцитов Huh7. (А) Белок NS5A, содержащий шесть остатков гистидина на С-конце полипептидной цепи. (В) Белок с шестью остатками гистидина на С- или N-конце.

ВЫВОДЫ

1. Разработана эффективная система экспрессии генов неструктурных белков NS5B и NS5A вируса гепатита С (ВГС). Показана возможность ее использования для получения таких мутантных форм Р-РНКП вируса как NS5BΔ21, NS5BΔ55 и NS5B-BLΔ8 генотипа 1b, не экспрессируемых в стандартной рЕТ-системе. Продemonстрировано, что повышение их выхода обуславливалось усилением инициации трансляции соответствующих мРНК и не сопровождалось изменением уровня последних.
2. Оптимизированы условия определения полимеразной активности белка NS5B в различных системах. Показана возможность использования данных систем для изучения ненуклеозидных ингибиторов, а также модифицированных нуклеозид-5'-трифосфатов как аналогов субстратов фермента.
3. Впервые обнаружено, что пирогаллол и ряд его производных являются обратимыми неконкурентными ингибиторами Р-РНКП ВГС. Данные соединения подавляют элонгацию РНК-праймера, но не влияют на связывание фермента с праймер-матричным комплексом. Максимальной активностью обладают вещества, содержащие электроноакцепторный заместитель в α-положении или электронодонорный заместитель в β-положении по отношению к полифенольной системе.
4. Белок NS5A фосфорилируется *in vitro* под действием казеинкиназ I и II, а также лизата гепатоцитов. В случае казеинкиназы II модификации подвергаются четыре аминокислотных остатка, расположенные в С-концевой области белка, в том числе S408. При этом фосфорилирование не влияет на РНК-связывающую активность NS5A белка, но сопровождается снижением его ингибирующей активности по отношению к Р-РНКП ВГС.

Список печатных работ, опубликованных по теме диссертации.

Статьи

1. Иванов А.В., Козлов М.В., Кузякин А.О., Костюк Д.А., Туницкая В.Л., Кочетков С.Н. Новые ненуклеозидные ингибиторы РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса гепатита С.// *Биохимия*, 2004, Т. 69, № 7, С. 782-788.
2. Кочетков С.Н., Андреева О.И., Иванов А.В., Козлов М.В., Михайлов С.Н., Туницкая В.Л. Новые блокаторы вирусов иммунодефицита человека и гепатита С.// *Молекулярная медицина*, 2004, Т. 3, С. 41-48.
3. Ivanov A.V., Korovina A.N., Tunitskaya V.L., Kostyuk D.A., Rechinsky V.O., Kukhanova M.K., Kochetkov S.N. Development of the system ensuring a high-level expression of hepatitis C virus nonstructural NS5B and NS5A proteins.// *Prot. Exp. Purif.*, 2006, V. 48, № 1, P. 14-23.
4. Козлов М.В., Поляков К.М., Иванов А.В., Филиппова С.Е., Кузякин А.О., Туницкая В.Л., Кочетков С.Н. РНК-зависимая РНК-полимераза вируса гепатита С: исследование механизма ингибирования производными пирогаллола.// *Биохимия*, 2006, Т. 71, С. 1253-1259.
5. Иванов А.В., Кузякин А.О., Кочетков С.Н. Молекулярная биология вируса гепатита С.// *Успехи биологической химии*, 2005, Т. 45, С. 37-86.

Тезисы

6. Ivanov A., Golubeva A., Kostyuk D., Tunitskaya V., Kukhanova M., Kochetkov S. "Cloning and expression of HCV RNA-dependent RNA polymerase", Conference for Students, PhD students and young scientists on molecular biology and genetics, Kiev, Ukraine, September 25-27, 2003, Abstract, p. 153.
7. Ivanov A.V., Kozlov M.V., Kuzyakin A.O., Kostyuk D.A., Tunitskaya V.L., Kochetkov S.N. New inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA-polymerase *Adv. in Mol. Cell Biol. (Proc. of conf. 10 ann. of Center for Med. Studies, Moscow, June 17-18, 2004)* p.25-34.
8. Ivanov A., Kozlov M., Kuzyakin A., Tunitskaya V., Kostyuk D., Kukhanova M., Kochetkov S. "New non-nucleoside inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase", Chemical & biological problems of proteomics, Novosibirsk, Russia, July 5-9, 2004, p.43.
9. Ivanov A., Tunitskaya V., Kozlov M., Polyakov K., Kuzyakin A., Prassolov V., Kukhanova M., Kochetkov S. "The HCV nonstructural proteins: high-level expression and functional studies", Keystone Symposia "Nucleic Acid Enzymes", Taos, New Mexico, USA, Feb 11-16, 2006, p. 57.
10. Иванов А.В., Туницкая В.Л., Куханова М.К., Кочетков С.Н. "Эффективная система экспрессии белков вируса гепатита С", Московская международная конференция "Биотехнология и медицина", Москва, Россия, 14-17 марта 2006, С. 54.

Напечатано с готового оригинал-макета

Издательство ООО "МАКС Пресс"

Лицензия ИД N 00510 от 01.12.99 г.

Подписано к печати 13.09.2006 г.

Формат 60х90 1/16. Усл.печ.л. 1,25. Тираж 100 экз. Заказ 608.

Тел. 939-3890. Тел./Факс 939-3891.

119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова,
2-й учебный корпус, 627 к.