

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ НАУКИ МОЛОДІ ТА СПОРТУ УКРАЇНИ

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Біологічний факультет

Кафедра біохімії

14. 01. 32 Медична біохімія

Буряченко С. В.

**“ЗАСІБ ЛІКУВАННЯ ФЕНІЛКЕТОНУРІЇ БЕЗМАТРІЧНОЮ
ПОЛІМЕРІЗАЦІЄЮ ДЕФЕКТНОГО ГЕНА PAH R408W ”**

Харків 2013

ЗАСІБ ЛІКУВАННЯ ФЕНІЛКЕТОНУРІЇ БЕЗМАТРІЧНОЮ ПОЛІМЕРІЗАЦІЄЮ ДЕФЕКТНОГО ГЕНА PANK408W

С. В. Буряченко

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, біологічний факультет, кафедра біохімії, м. Харків, пл. Свободи 4, 61077, тел. 0950072469,

e-mail: semenb837@gmail.com

Анотація. У роботі вперше представлені експериментальні дані засобу для лікування фенілкетонурії безматрічною полімеризацією дефектного гена PANK408W, що відноситься до засобів і матеріалів лікування станів та порушень метаболічного обміну фенілаланіну. Представлені результати дослідження позитивного ефекту кристалічних нанокolonій монтморилоніту на швидкість та процес полімеризації ДНК в еукаріотичних клітинах печінки білих мишей 1-тижневого, 3- и 24 – місячного віку у різні строки розвитку захворювання та введення кристалів монтморилоніту. Вивчені відновлювальні та біохімічні функції під впливом кристалів монтморилоніту на дефектні гени. Показані основні властивості кристалів монтморилоніту що взаємодіють на рівні геному на дефектний ген та як каталізатор в реакції ПЛР. Встановлено, що відновлювання дефектного гену PANK408W відповідаючого за розвиток фенілкетонурії відновлюється на протязі 3 місяців та найбільш швидко відновлюється при введенні тваринам з 1-тижневого віку.

Ключові слова: лікування фенілкетонурії, фенілкетонурія, ген PANK408W, безматрічна полімеризація ДНК, дефектні гени, кристали монтморилоніту, фенілаланін, метод полімеразної ланцюгової реакції, капілярний електрофорез.

ЗМІСТ

Ген ФАГ картован на довогому плечі хромосоми 12 в області q22-q24. Кодуючая білок послідовність (кДНК) включає близько 90 кб та є у складі 13 екзонів. Інтрони розділяють кодуєчий білок ФАГ ділянки гену на екзони довжиною від 57 до 892 п.о., середня довжина яких складає 114 ± 43 п.о. Всі інтрони гену ФАГ починаються і закінчуються кінцевими GT та AG дінуклеотидами, відповідно. Кінцеві 17 нуклеотидів 3 конца кожного інтрону мають у складі тільки один AG динуклеотид і багаті піримідінами. 6-13 екзони компактно вкладені у фрагмент гена розміром 20 кб, у той час як 1-5 екзони розділені більшими інтронами, розміри яких коливаються від 3 до 23 кб.

Більшість змін в гені ФАГ, визиваючих захворювання, є одноосновними (однонуклеотидними) замінами, включаючи місенс (64%), сплайсинг (13%) та нонсенс (6 %) мутацій та нейтральних поліморфізмів (6%). Почти 20 місенс-мутацій затрагують високомутагенні CpG дінуклеотиди. Інші мутації виникають у результаті делецій або інсерцій різних типів. Найбільше частими є делеції цілого екзону, виникаючі внаслідок пропуску екзону із-за сплайсингу (Marvit et al., 1987) або інших мутацій поблизу меж інтрон-екзон (13%). Так, у йеменських євреїв з ФКУ виявлені великі делеції, визиваючі втрату приблизно 7 кб екзона 3 та регіону, фланкіруючого інтрон (Avigad et al., 1990). У хворих ФКУ із Шотландії знайдено поділення регіону, включаючого 1 та 2 екзони (Sullivan et al., 1985). Третій тип великої делеції, затрагуючих 5 та 6 екзони гену ФАГ, виявлена у декількох ФКУ пацієнтів з Японії (Okano et al., 1994). Більш дрібні делеції включають делецію 22 п.о. в 6 екзоні, делецію 15 п.о. внутрішньо рамки считування в 11 екзоні (Jaruzelska et al., 1993), делецію 11 п.о. в 7 екзоні, визиваючу зрушення рамки зчитування, що призводить до попереднього стоп-сигналу у 278 кодоні (Dworniczak et al., 1992), 3 однокодонові делеції (Svensson et al., 1990; Guldborg et al., 1993), 4 двухнуклеотидні делеції (Guldborg et al., 1993; Benit et al., 1994) та 10 однонуклеотидних делецій (Guldborg et al., 1993; Benit et al., 1994). У гені ФАГ було виявлено тільки три інсерції. Дві виникають внаслідок

утворення нових сайтів сплайсингу, визваних місенс-мутаціями внутрішньо нітронів (Dworniczak et al., 1991), а третій тип інсерцій виникає у результаті інсерції 4 п.о. в 10 екзоні.

У сучасний час у світі виявлено більше 328 мутацій гену ФАГ, розподілення яких значно різняться у різних країнах.

Вступ. Вивчення молекулярних основ моногенних спадкові хвороб людини та їх поширення у різних регіонах є однією із актуальних проблем медичної генетики та генетики людини. На даний час описано більше 1000 спадкових хвороб людини, обумовлених генними мутаціями. Класичним прикладом захворювання, яке відноситься до класу порушень амінокислотного обміну є фенілкетонурія (ФКУ). Причиною даного аутосомно-рецесивного захворювання є ураження гену фенілаланінгідроксилази (ФАГ), що призводить до інактивації ферменту фенілаланінгідроксилази та блокуванню гідроксілювання фенілаланіну (ФА), так або інакше перетворення його у тирозин. При ФКУ вражається, головним чином, центральна нервова система дітей, що незворотно призводить до їх тяжкої розумової відсталості. Ген ФАГ картован на давгому плечі хромосоми 12 в області q22-q24. Кодуюча білок послідовність (кДНК) включає приблизно 90 кб та в 13 екзонах. Інтрони розділяють кодуючі білок ФАГ ділянки гену на екзони довжиною від 57 до 892 п.о., середня довжина яких складає 114 ± 43 п.о. Всі інтрони гену ФАГ починаються та закінчуються канонічними GT та AG дінуклеотидами, відповідно. Кінцеві 17 нуклеотидів 3 кінця кожного інтрону мають тільки один AG дінуклеотид та багаті піримідінами. 6-13 екзони компактно вкладені у фрагмент гену розміром 20 кб, у той час як 1-5 екзони розділені більшими нітронами, розміри яких коливаються від 3 до 23 кб.

Більшість змін у гені ФАГ, що викликає захворювання, є одноосновними (однонуклеотидними) замінами, включаючи місенс (64%), сплайсинг (13%) та

нонсенс (6 %) мутацій та нейтральних поліморфізмів (6%). Майже 20 місенс-мутацій затрагують високомутагенные CpG динуклеотиды. Остальные мутации возникают в результате делеций или инсерций различных типов. Наиболее частыми являются делеций целого экзона, возникающие вследствие пропуска экзона из-за сплайсинга (Marvit et al., 1987) или других мутаций вблизи границ интрон-экзон (13%). Так, у йеменских евреев с ФКУ выявлены крупные делеций, вызывающие потерю примерно 7 кб экзона 3 и региона, фланкирующего интрон (Avigad et al., 1990). У больных ФКУ из Шотландии обнаружена делеция региона, включающего 1 и 2 экзона (Sullivan et al., 1985). Третий тип крупной делеций, затрагивающей 5 и 6 экзона гена ФАГ, выявлена у нескольких ФКУ пациентов из Японии (Okano et al., 1994). Более маленькие делеций включают делецию 22 п.о. в 6 экзоне, делецию 15 п.о. внутри рамки считывания в 11 экзоне (Jaruzelska et al., 1993), делецию 11 п.о. в 7 экзоне, вызывающую сдвиг рамки считывания, что приводит к преждевременному стоп-сигналу в 278 кодоне (Dworniczak et al., 1992), 3 однокодонные делеции (Svensson et al., 1990; Guldborg et al., 1993), 4 двухнуклеотидные делеции (Guldborg et al., 1993; Benit et al., 1994) и 10 однонуклеотидных делеции (Guldborg et al., 1993; Benit et al., 1994). В гене ФАГ было выявлено только три инсерции. Две возникают вследствие образования новых сайтов сплайсинга, вызванных миссенс-мутациями внутри интронов (Dworniczak et al., 1991), а третий тип инсерции происходит в результате инсерции 4 п.о. в 10 экзоне.

В настоящее время в мире выявлено свыше 328 мутаций гена ФАГ, распределение которых значительно различается в разных странах.

Фенілкетонурія (PKU) є гіпераміноацидемією фенілаланіна (Phe), пов'язана з природженим порушенням метаболізму фенілаланіна - мутацією гена, що кодує фенілаланін-4-гідроксилазу (PAH), яка перетворює фенілаланін на тирозин. В деяких випадках відбувається додатковий метаболічний дефект в синтетичному каскаді або дігідроптерідіну, або тетрагідробіоптерину (Bh4), кофакторів

фенілаланін-4-гідроксилази, що далі сприяє гіперфенілаланінемії (НРА). Тоді як нормальний рівень фенілаланіну в плазмі складає приблизно 0,05 мМ (1), пацієнти з "класичною" РКУ без лікування мають рівні фенілаланіна в плазмі вище 1 мМ, наприклад, рівні фенілаланіна від приблизно 1 мМ до приблизно 2,5 мМ або більш, і, хоча лікування дієтою з низьким вмістом фенілаланіна має мету зниження рівня фенілаланіна в плазмі до менш ніж 0,3 мМ, цього важко досягти унаслідок проблем з дотриманням режиму харчування. У США 1 на 10000 дітей народжується з ФКУ. Надлишкові рівні фенілаланіна в плазмі, спостережувані при РКУ, у поєднанні з відносно високою афінністю фенілаланіна до ділянок скріплення на білку-переноснику системи транспорту нейтральних амінокислот в гематоенцефалічному бар'єрі (ВВВ) приводить до (i) накопичення фенілаланіна Phe і його нейротоксичних метаболітів, наприклад, фенілпірувата, фенілацетата, феніллактата, в головному мозку (ii) зниженню рівнів нейтральних амінокислот, що не є фенілаланіном, проникаючих в головний мозок (ii) зниженню рівнів нейтральних амінокислот, що не є фенілаланіном, проникаючих в головний мозок, що призводить до порушеного розвитку і функціонування головного мозку, оскільки ключові каскади метаболізму, наприклад, синтез нейротрансмітерів, вимагають амінокислот-попередників, таких як тирозин. Це зниження виражене для тирозину, постачання яким за допомогою плазми є низьким унаслідок метаболічного порушення ферменту, відповідального за перетворення фенілаланіна на тирозин. В даний час вважають, що неврологічні дефіцити РКУ, головним чином, є наслідком зниження рівнів Phe нейтральних амінокислот, проникаючих в головний мозок, що немає (2). Хоча дієта з низьким вмістом фенілаланіна може понизити рівні фенілаланіна в плазмі при "класичній" РКУ нижче 0,3 мМ і пом'якшити затримку психічного розвитку, пов'язану з РКУ без лікування, дотримання дієти може бути проблематичним і воно може стати особливо проблематичним, коли пацієнти з РКУ досягають підліткового віку, що призводить до підвищення рівнів фенілаланіна в плазмі і як до зниження розумових здібностей, так і до змін білої речовини в головному мозку. На додаток до необхідного дотримання пацієнтом дієти, способи лікування на основі

обмеження живлення також вимагають, щоб пацієнт знав рівень фенілаланіна, наявного в їжі. Більш того, також в результаті дієт з обмеженням по фенілаланіну може виникнути дефіцит живильних речовин.

Таким чином, розроблені альтернативні способи лікування. Наприклад, для подолання очікуваного виснаження нейротрансмітерів дофаміна і серотоніна, пацієнтів з РКУ лікували попередниками нейротрансмітерів тирозином і триптофаном (3). Для зниження вхідного потоку фенілаланіна в головний мозок, літнім пацієнтам з РКУ вводили добавку з нейтральних амінокислот з розгалуженим ланцюгом, що містять валін, ізолейцин і лейцин (4) для яких було описано значне поліпшення відносно розладів поведінки. Було зроблено припущення, що додавання попередників нейротрансмітерів, тирозину і триптофану (2) в добавку Bergu (4), повинне привести до подальшого поліпшення. Проте ефективність цих засобів лікування з добавкою в дієту амінокислот є суперечною. Зважаючи на вказане вище, існує визнана необхідність в засобах і композиціях для лікування фенілкетонурії і інших станів і порушень, пов'язаних з метаболізмом фенілаланіну. Конкретно, в попередньому рівні техніки відсутні засоби лікування фенілкетонурії введенням фенілаланін-4-гідроксилази окремо або у поєднанні з одним або декількома іншими ферментами, які підвищують її активність відносно метаболізму фенілаланіна. Справжній винахід задовольняє цій давно існуючій потребі і бажанню в даній області.

Мета. Метою даної роботи є експериментальне розроблення фармакогенетичного засобу та методу повного лікування та відновлення дефектного гену PАН R408W відповідаючого за розвиток фенілкетонурії. Зрозуміти у ході експерименту як відбувається відновлення дефектного гену PАН R408W на молекулярному рівні, енергетичну та хімічну природу дефіциту, що спонукає на порушення структури гену, створення анти мутагенної вакцини корелююча ДНК еукаріотичних клітин.

Задача роботи. Задачею експерименту є відтворення дефектного гену PАН R408W в гепатоцитах печінки мишей на стадії ембріону та проведення лікування даючи розчин з монтморилоніту, апірогенної спеціально замороженої води та

ферментів меду (в пропорції 3 : 2 : 1) вагітній самці лабораторної миші у кількості 0, 500 мкл на протязі 3 тижнів вагітності. Отримання народжених мишенят з дефектом гену PАН R408W у клітинах печінки, з розвинутою фенілкетонурією. Підтвердження результатів дослідження аналізами біохімічного визначення вмісту фенілаланіну у крові мишенят на всіх стадіях розвитку тварин. Проведення секвенування генів, проведення реакції ПЛР. Розробка лікувального періоду для настання при якому настає лікувальний ефект та розрахунок оптимальної лікувальної дози розчину для повного відновлення дефектного гену та фізіологічної норми фенілаланіну у крові.

Методи дослідження. Як біологічний матеріал використовували ДНК, виділену з лейкоцитів периферичної крові методом фенол-хлороформної екстракції. Секвенування проводили з використанням методів полімеразної ланцюгової реакції і автоматичного капілярного електрофорезу. Для ампліфікації 7-го екзону реакційна суміш з кінцевим об'ємом 20 мкл містила 100 нг ДНК геному, 1 x ПЛР буфер, 1.5 mM MgCl₂, 200 мкМ кожного дезоксинуклеотидтрифосфата, по 5 пМ олігопраймерів і 0,75 одиниць активності кристали монтморилоніту. ПЛР виконували за наступних температурно-тимчасових умов: початкова денатурація при 95°C -5 хв, потім 35 циклів ампліфікації: 94°C – 45 сек., 58°C – 45 сек., 72°C – 45 сек. На завершуючій стадії синтезу пробірки витримували 7 хвилин при 72°C. Реакцію секвенування виконували з використанням набору реагентів BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Ампліфикационная суміш (20 мкл) для реакції містила 4 мкл суміші для секвенування, 2 мкл буфера, 2 пмоль зворотного праймера, 4 мкл ПЛР-продукту. Секвенуюча реакція включала 25 циклів ампліфікації за наступних температурно-тимчасових умов: 10 сек. денатурації при 96°C, 5 сек. відпалу при 50°C і 4 хвилини синтезу при 60°C. Розділення синтезованих фрагментів проводили методом автоматичного капілярного електрофорезу в генетичному аналізаторі ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Аналіз виконували при наступних параметрах: час ін'єкції зразка в капіляр 30 секунд, час розділення 25 хвилин, напруга 11 кВ, довжина капіляра 36 див. Для розділення використовували 4%

розчин полімеру Pop-4™ (AppliedBiosystems). Отримані результати обробляли за допомогою програмного забезпечення SequencingAnalysis 5.1, як референсної використовували послідовність гена ФАГ, розміщену на сайті <http:pahdb.mcgill.ca>.

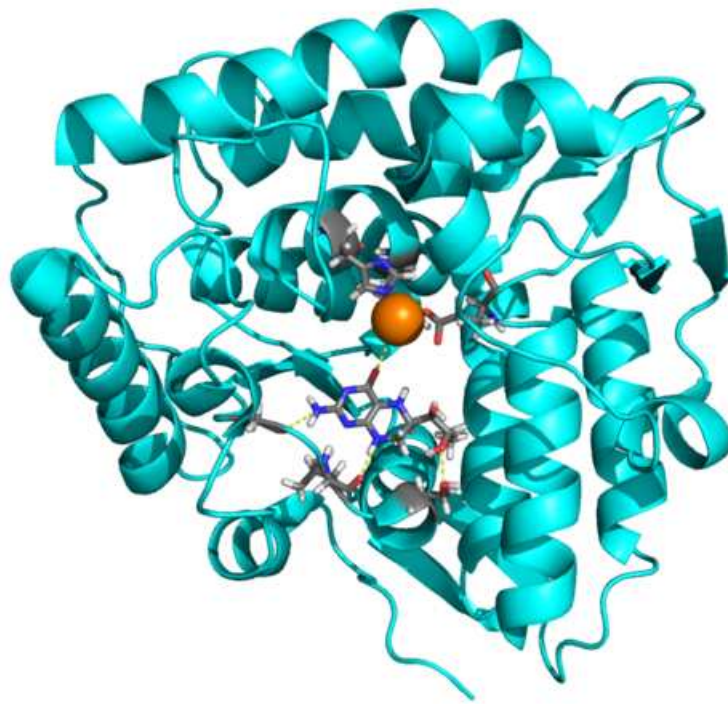
Отриманні результати. Аналіз мутації R408W в ФКУ. Самим точним методом молекулярної діагностики являється виявлення порушень в нуклеотидній послідовності ДНК. Любые типи мутацій можуть быть виявлені путем секвенирования ДНК, но секвенирование всего гена заболевания, особенно в случае его больших размеров, весьма трудоемко и дорого. Поэтому в последнее время для идентификации мутаций стал широко использоваться менее трудоемкий и менее дорогостоящий метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), в основе которого в то же время лежит информация, полученная при секвенировании гена. Суть ПЦР заключается в направленной высокоспецифической амплификации небольшого фрагмента ДНК, включающего интересующий участок гена, и последующей идентификации наличия (или отсутствия) мутаций при помощи рестрикции специфичной рестриктазой (ПДРФ-анализ, если это необходимо) и электрофореза в полиакриламидном или агарозном геле. Количество ДНК, необходимое для анализа методом ПЦР, минимально, что возможно использовать для пренатальной диагностики плода из ворсинки хориона. Результатами дослідження було показано, що молекулярні нанокolonії монтморилоніту ведуть себе як SSB – білки, вони здатні концентрувати з оточуючого водного середовища ліпіди, цукри, мікроелементи та стабілізувати активовані рибонуклеотиди, каталізувати полімеризацію рибонуклеотидів, забезпечувати відносну хіральну однорідність синтезованих полірібо-нуклеотидів (РНК), іммобілізувати РНК — як матриці, так і їх копії, не давати їм уходити у оточуючий розчин, більш міцніше зв'язувати одנותяжні РНК, чим двутяжні, що стабілізує здатні до реплікації стани, компартменталізувати РНК в відсутності ліпідних мембран (формувані колонії РНК), втримувати поряд різні види РНК, які могли б створювати змішану колонію, та забезпечувати їх суцільне наслідування, формувати ліпосоми довкола колоній РНК. Кристали нанокolonій монтморилоніту гідрофільні, мають у своєму складі необхідного

розміру пори, мають властивості концентрувати на собі субстрати для синтезу РНК, ДНК та генів, нести на собі нуклеотиди РНК та ДНК. Кристали представляють собою модель двумірного гену.

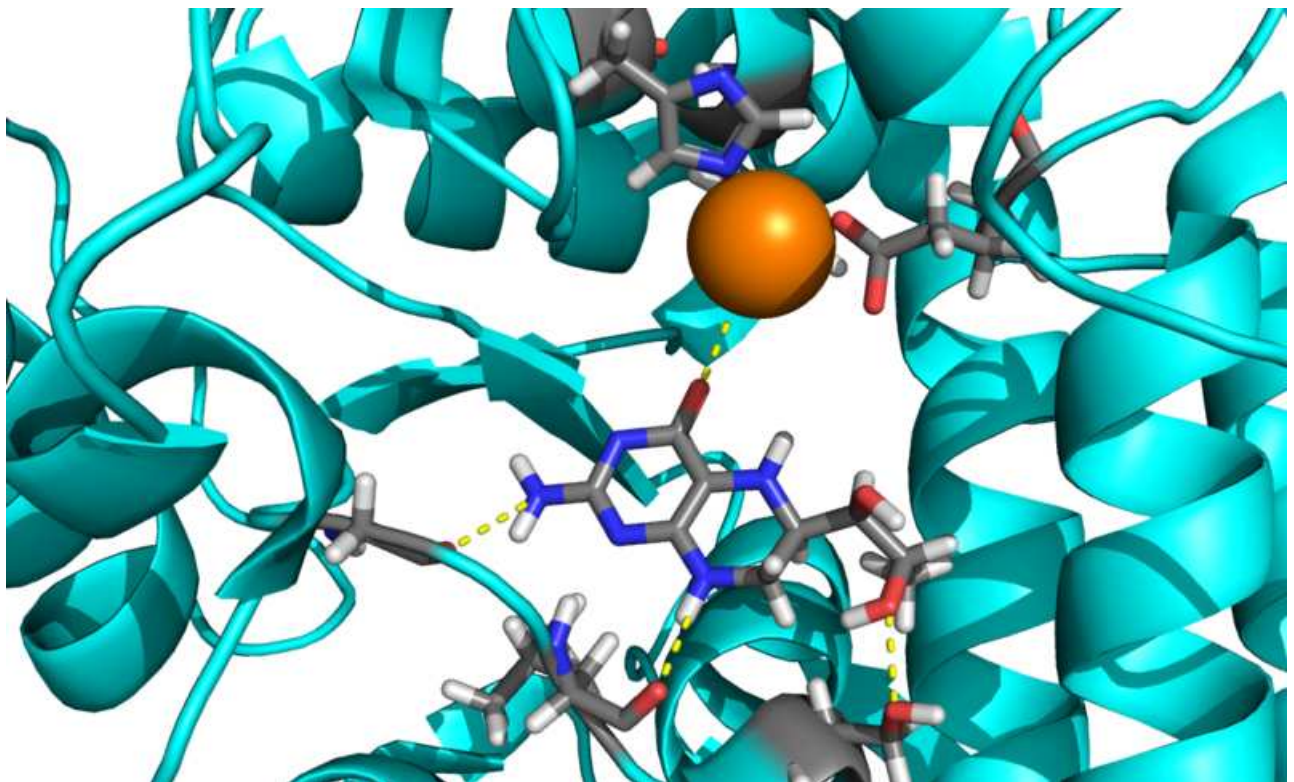
Висновок.

Використана література:

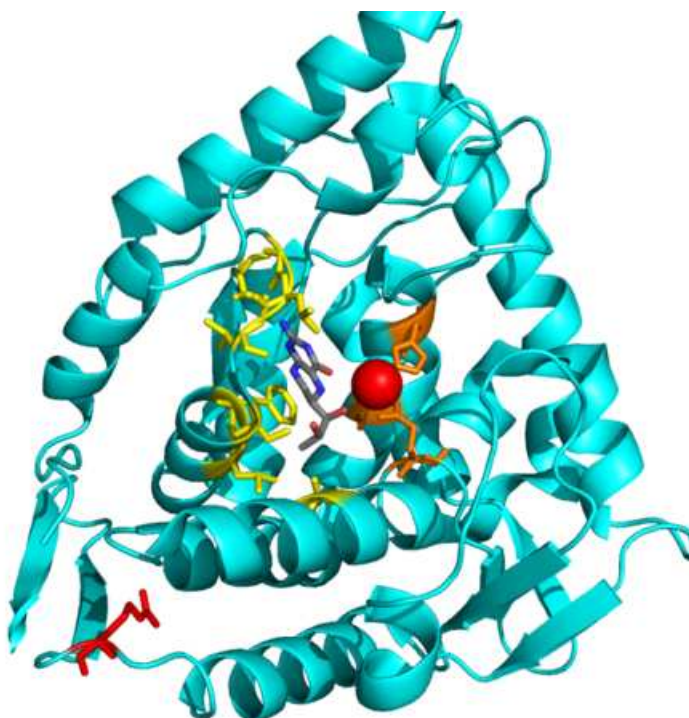
ДОДАТКИ



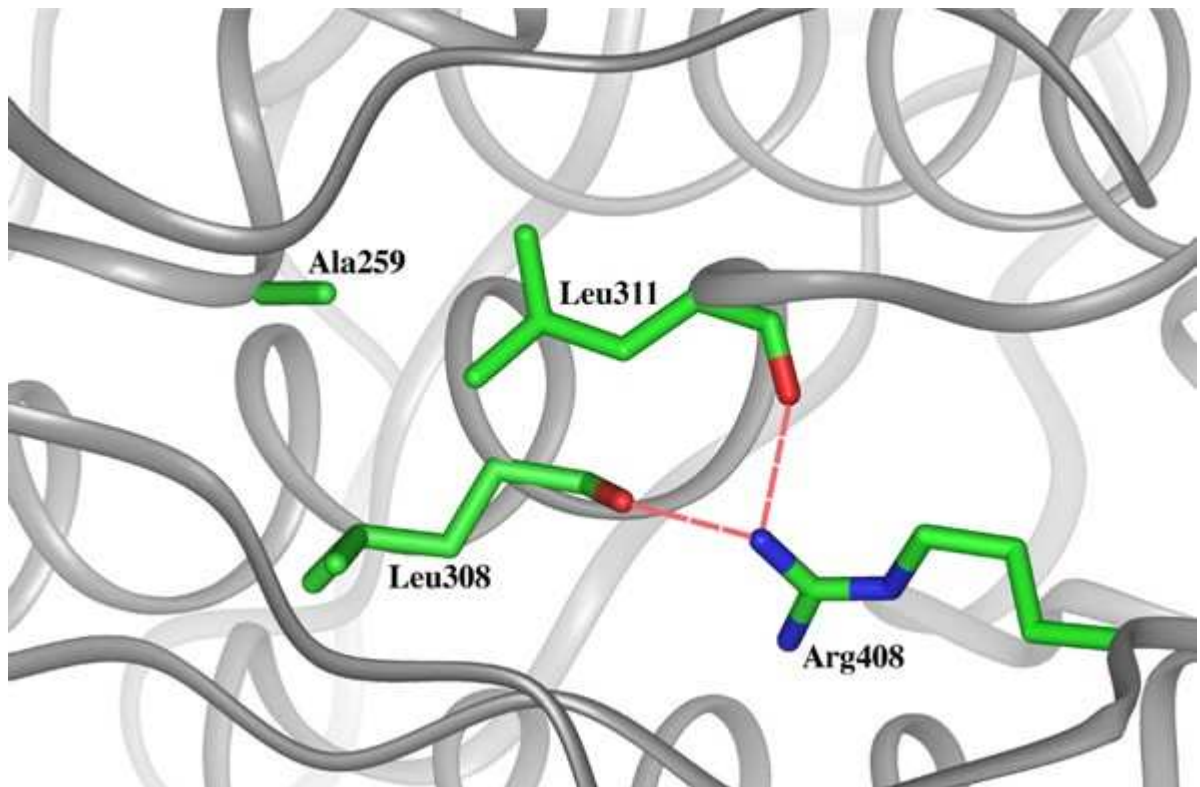
Мал. 1: Представлена повна структура 1J8U використана PyMol. Білок забарвлений у блакитний в цілому, тоді як Fe-атом забарвлений у червоний, і важливі залишки показують як прями і розфарбовують основи на елементі мода. Закріплення показують жовтими лініями, якщо відстань більше, ніж 1.5 \AA



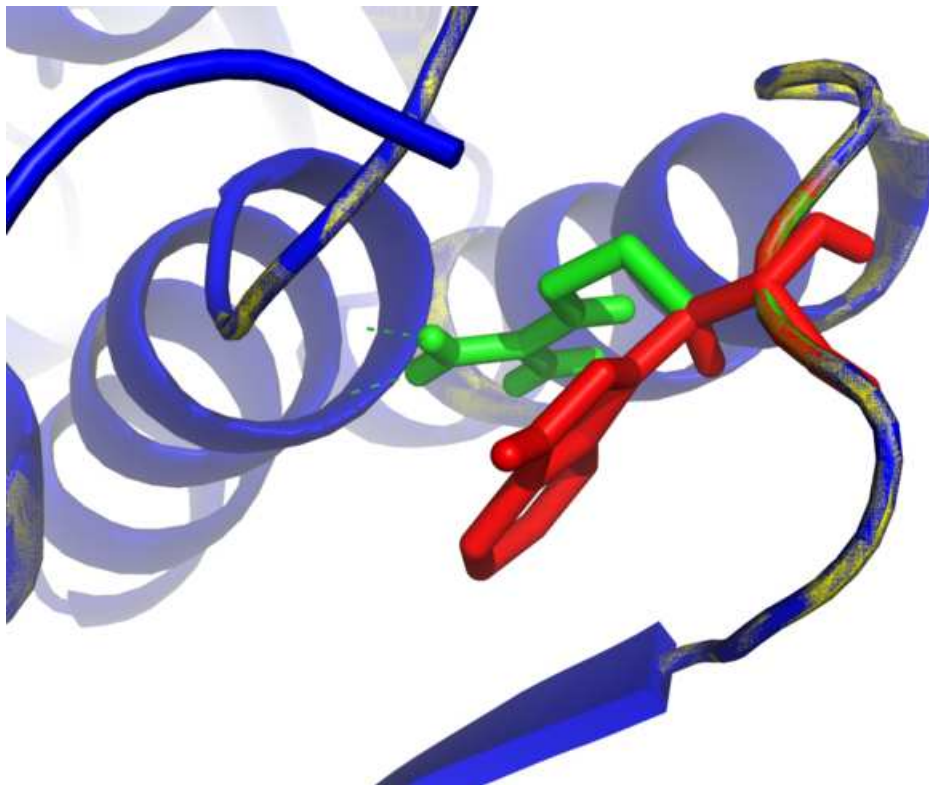
Мал. 2: Представлена повна структура 1J8U використана PyMol. Білок забарвлений у блакитний в цілому, тоді як Fe-атом забарвлений у червоний, і важливі залишки показують як прями і розфарбовують основи на елементі мода. Закріплення показують жовтими лініями, якщо відстань більше, ніж 1.5 Å



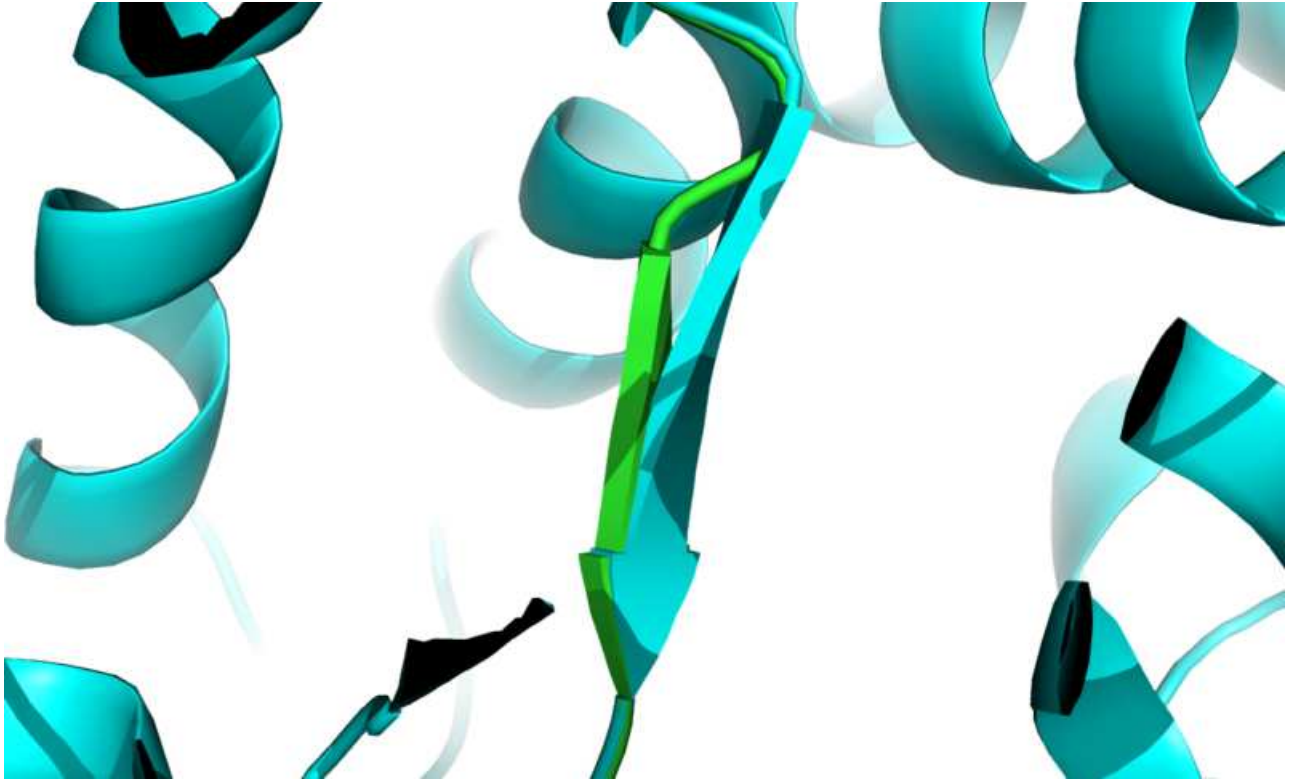
Мал. 4: Зв'язуючі ділянки забарвлені відповідно отриманого вище виду мутації (ARG408W), розфарбований червоним, та додатки для цього останку, а також для обов'язкових останків також вказані.



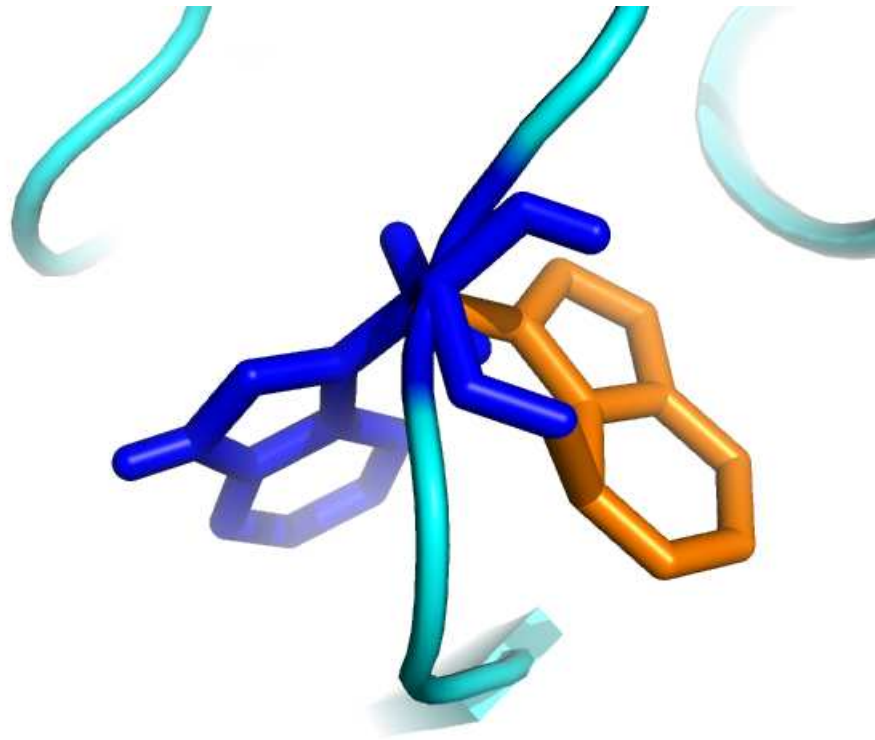
Мал. 5. Локалізація мутації гену Arg408W на молекулі фенілгідроксилази.



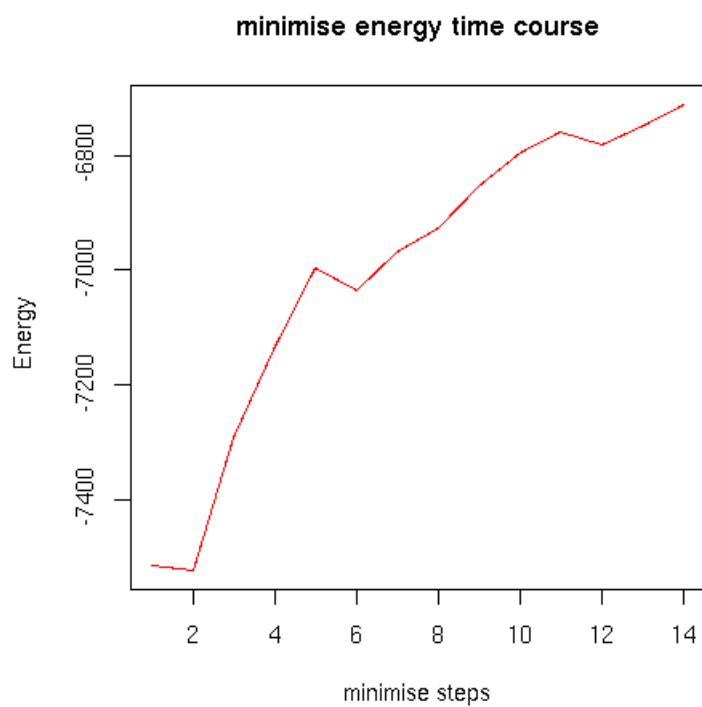
Мал. 6. Мутація ARG408TRP: С зміною амінокислот всі зв'язки, які були утворені до цього, не можуть утворитися більше.



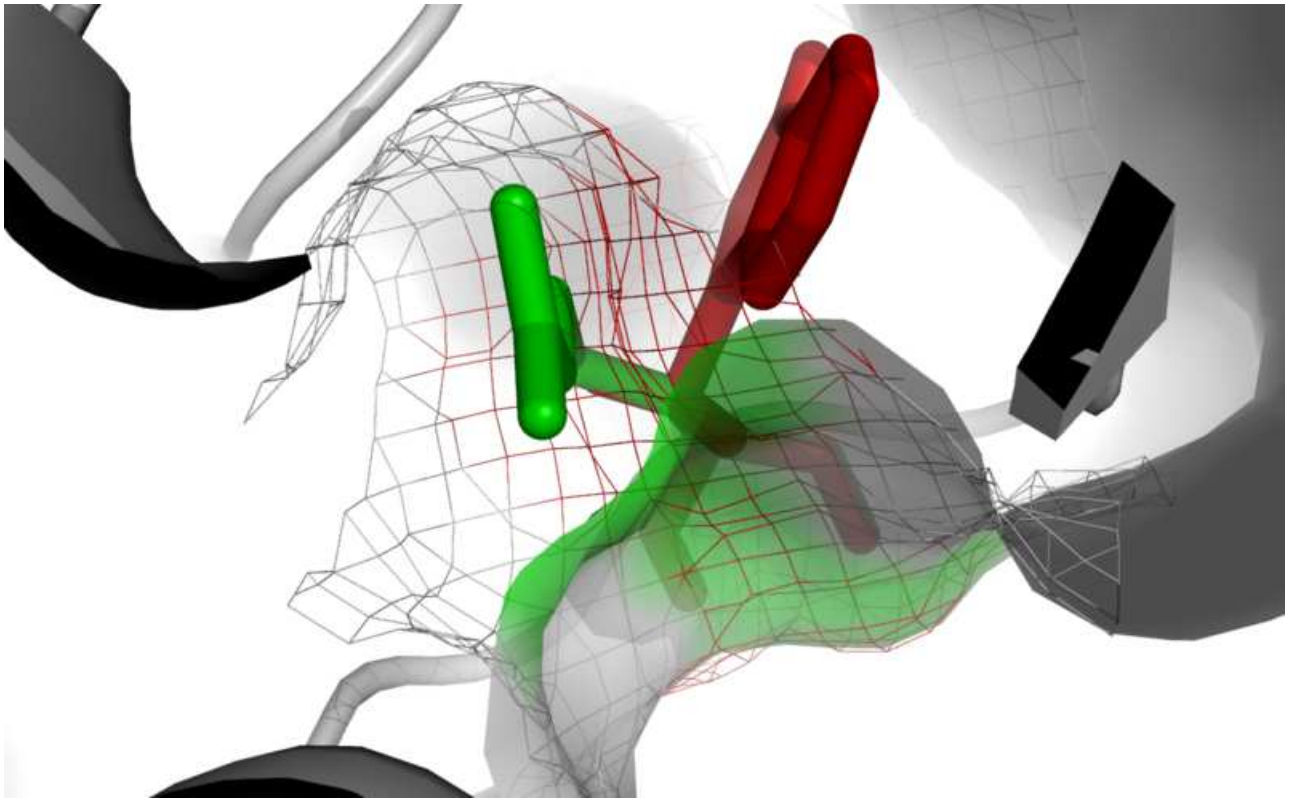
Мал. 7: На цій ілюстрації ми показуємо р в структурах, которые мы получили от обоих методов, где scwrl раскрашен синий, и foldX раскрашен голубой. Это - единственное изменение, и мы ожидаем, что он будет иметь очень низкий эффект на деятельность белка, потому что никакие остатки, которые известны их важностью, не найдены в этом регионе



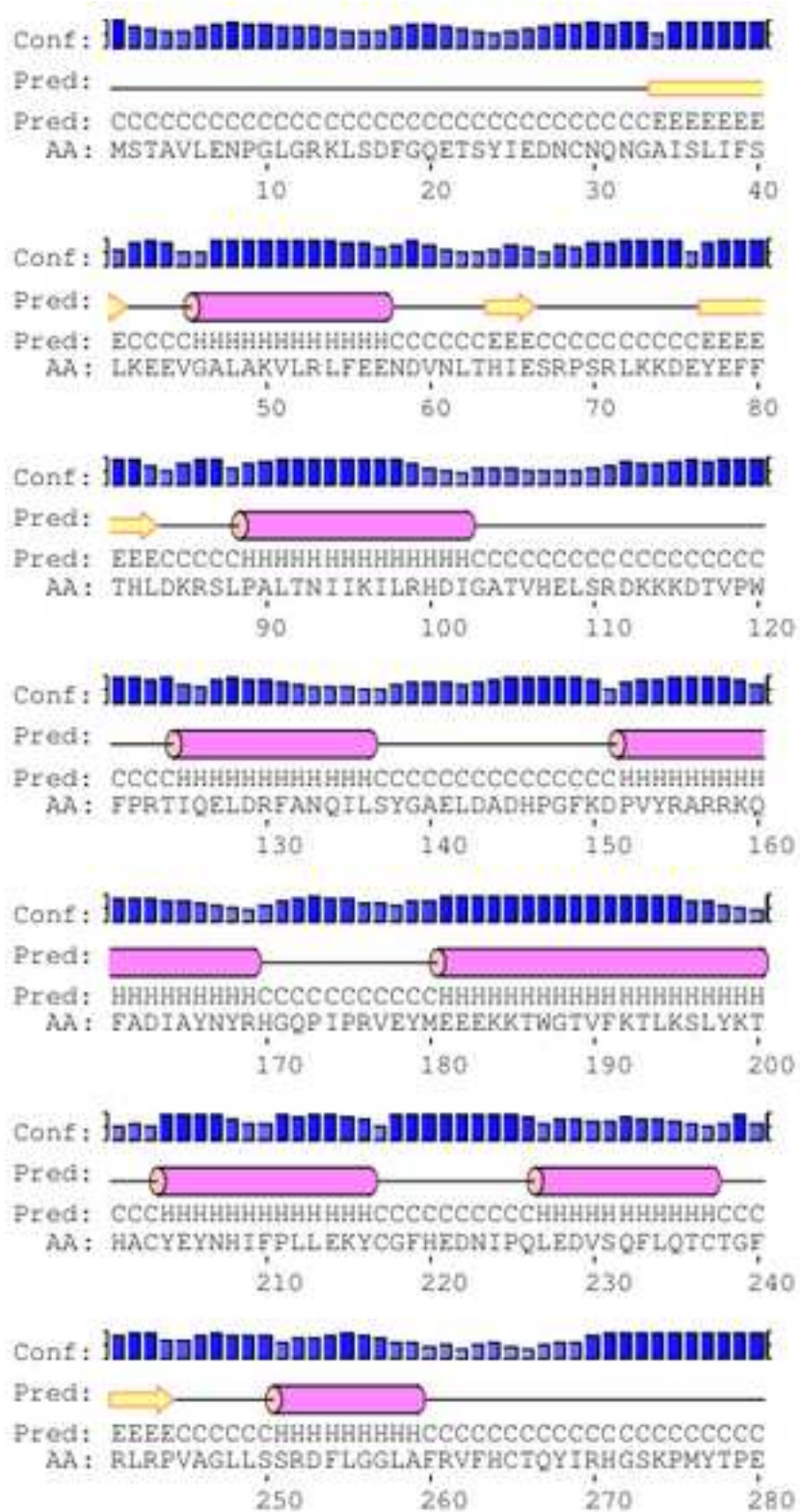
Мал. 8. Мутація ARG408TRP: Це - єдина мутація, в якій ці дві молекули підтримують компактизацію різних структур, які не приводять ні до яких зіткнень або зв'язкам, які можливі в тому а не в іншому.



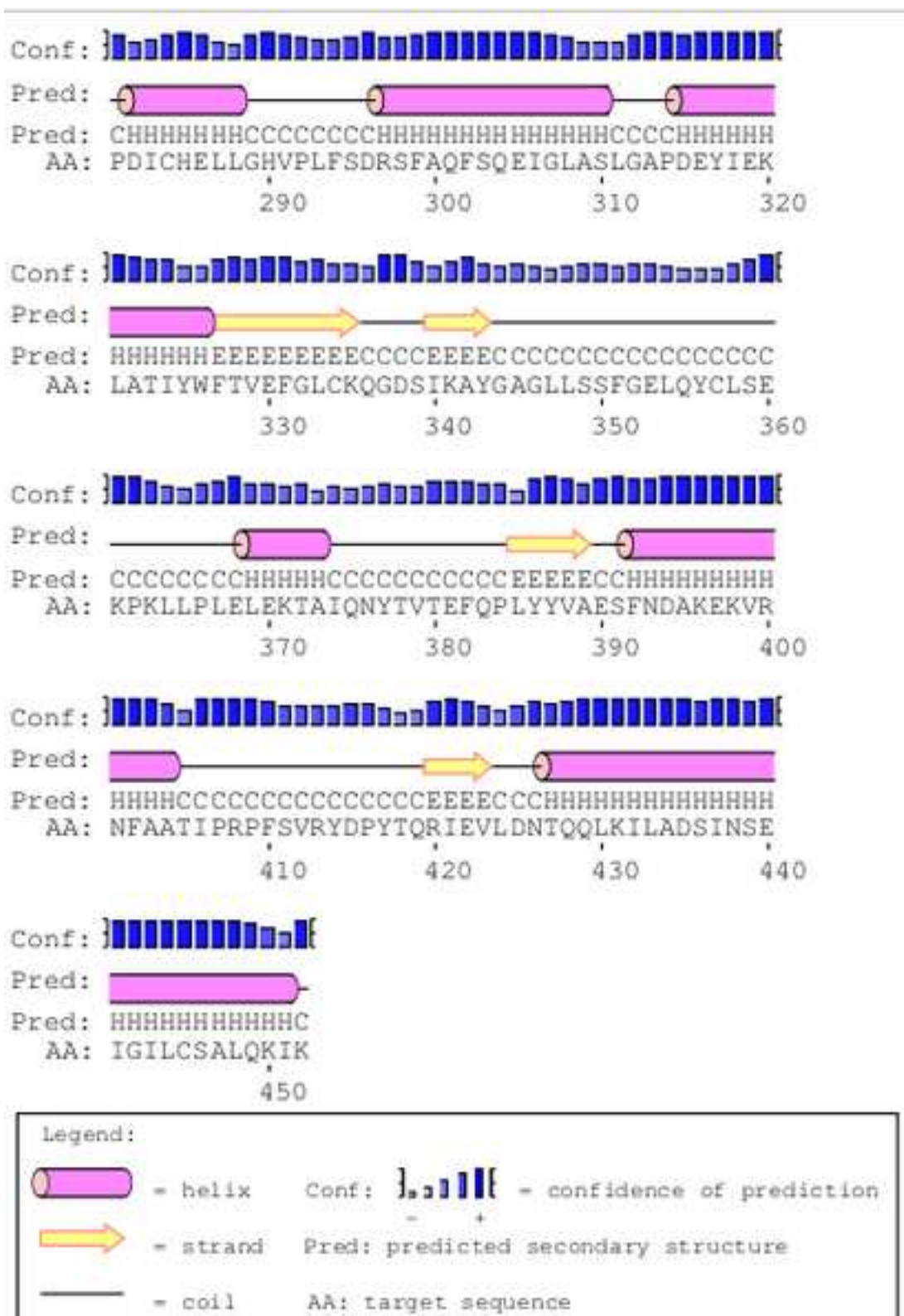
Мал. 9: Ця картинка показує, що курс часу енергії, отриманий з, мінімумом для 14 кроків для 1J8U-структури, яку ми отримали від pdb та виключили розчинник.



Мал. 10. Мутація ARG408TRP: хоча довжина амінокислоти між аргініном та триптофаном - в значній мірі така ж сама, їх ширина відрізняється. Із-за цього факту, нове відчуження у білку відкривається і повна структура цієї зміненої частини, як кожний баче з більшою петлею навколо червоного залишку мутанта.



Мал. 11: Візуальна продукція PsiPred для PheOH, включаючи рівні для всіх положень (частина 1)



Мал. 12: Візуальна продукція PsiPred для PheOH, включаючи рівні для всіх положень (частина 2)

UniProt: -----

DSSP: -----

PSIPRED:CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEEEEECCHHHHHHH
HHHHHHCCC

REPROFSEQ:LLLEEEELLLLLLEELLLLLLHHHHLLLLLLLLLEEEEEELHHHHHHHHHH
HHHHHLLLLL

AA:MSTAVLENPGLGRKLSDFGQETSYIEDNCNQNGAISLIFSLKEEVGALAKVLRRLFEN
DV

10 20 30 40 50 60

UniProt: -----

DSSP: -----LLL

PSIPRED:CCCEEECCCCCCCCCEEEEEEECCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCC
CCCCCCCC

REPROFSEQ:LEEEELLLLLLLLLLHHHHHLLLLLLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLHHH
HLLLLLLLLL

AA:NLTHIESRPSRLKKDEYEFFTHLDKRSLPALTNIKILRHDIGATVHELSDRDKKDTVP
W

70 80 90 100 110 120

UniProt: ---HHHHHHHHH-----HHH---TTTT-HHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----

DSSP:

LLSBGGGGGGGGGGSBSSLGGGSTTSTTTTLHHHHHHHHHHHHHHHHHTLLTSLLLLLL
LL

PSIPRED:

CCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCC
CCCC

REPROFSEQ:

LLHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLLLLLLLLLLLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLLLLLLL
EEL

AA:

FPRTIQELDRFANQILSYGAELDADHPGFKDPVYRARRKQFADIAYNYRHGQPIPRVEYM

130 140 150 160 170 180

UniProt: HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH--HHHH--HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----
HHHHHHHHHHHHHHHH--

DSSP:
HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHBLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLBTBLLHHHHHHHHHH
HHHHSL

PSIPRED:
HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCHHHHHHHHH
HHHCCC

REPROFSEQ:
LHLHLLHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
HLLL

AA:
EEEKKTWGTVFKTLKSLYKTHACYEYNHIFPLLEKYCGFHEDNIPQLEDVSQFLQTCTG
F

190 200 210 220 230 240

UniProt: EEEE-----HHHHHHHHHTTTEEEE-----HHHHHHH-HHHH--HHHH

DSSP:
EEEELLSBLLHHHHHHHHHTTTEEEELLLLLTTSTLLSLLHHHHHHHHHTHHHHTSHHH
H

PSIPRED:
EEEECCCCCHHH
HHHH

REPROFSEQ:
LLLLLLLLLLLLLHLLHHHEEEEEEEEEELLLLLLLLLLLLLHHHHHHHHHHLLLLLLLLLLH
H

AA:
RLRPVAGLLSSRDFLGGLAFRVFHCTQYIRHGSKPMYTPEDICHELLGHVPLFSDRSFA

250 260 270 280 290 300

UniProt: HHHHHHHHHHH--HHHHHHHHHHHHHHHHHTTTT-EEEE--EEEE--HHHH--
HHHHHHH-HH

DSSP:
HHHHHHHHHHHTTLLHHHHHHHHHHHHHHHHHTTTTLEEEETTEEEELHHHHHTLHHHHHH
TTSS

PSIPRED:
HHHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHEEEEEEEEECCCCCEEECCCCCCCCCCCC
CCCC

REPROFSEQ:
 HHHHLLLLLLLLHHHHHHHHHHHEEEEEEELELLLLLHHHHHHHHHLHHHHHH
 HLL

AA:

QFSQEIGLASLGAPDEYIEKLATYWFVVEFLCKQGDSIKAYGAGLLSSFGELQYCLSE
 310 320 330 340 350 360

UniProt: HHHHHH--HHHH-----EEE--EEEEEE-HHHHHHHHHHHHH---
 EEEEEETTTE

DSSP:

SSEEEELHHHTTLLLLSSSLSEEEESLHHHHHHHHHHHHTSLLSSLEEEETTTE

PSIPRED:

CCCCCCCHHHHHCCCCCCCCCCEEEEECCHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCC
 CCCE

REPROFSEQ:

LLLLLLLLLLELLLLLELLLLLEEHHLHHHHHHHHHHHHHHLLLLLLEEEELLLE
 E

AA:

KPKLLPLELEKTAIQNYTVTEFQPLYVAESFNDAKEKVRNFAATIPRPFSVRYDPYTQR
 370 380 390 400 410 420

UniProt: EEEHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---

DSSP: EEEL-----

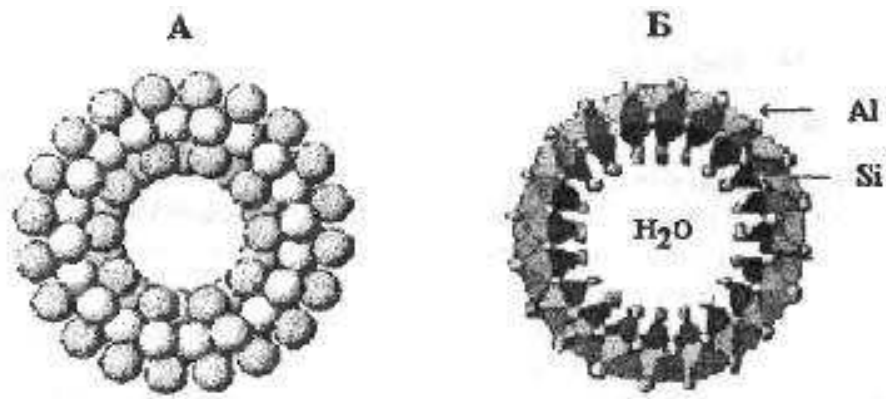
PSIPRED: EECCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHC

REPROFSEQ: EEELLLHHHHHHHHHHHLHHHHHHHHHHHHHHHHLL

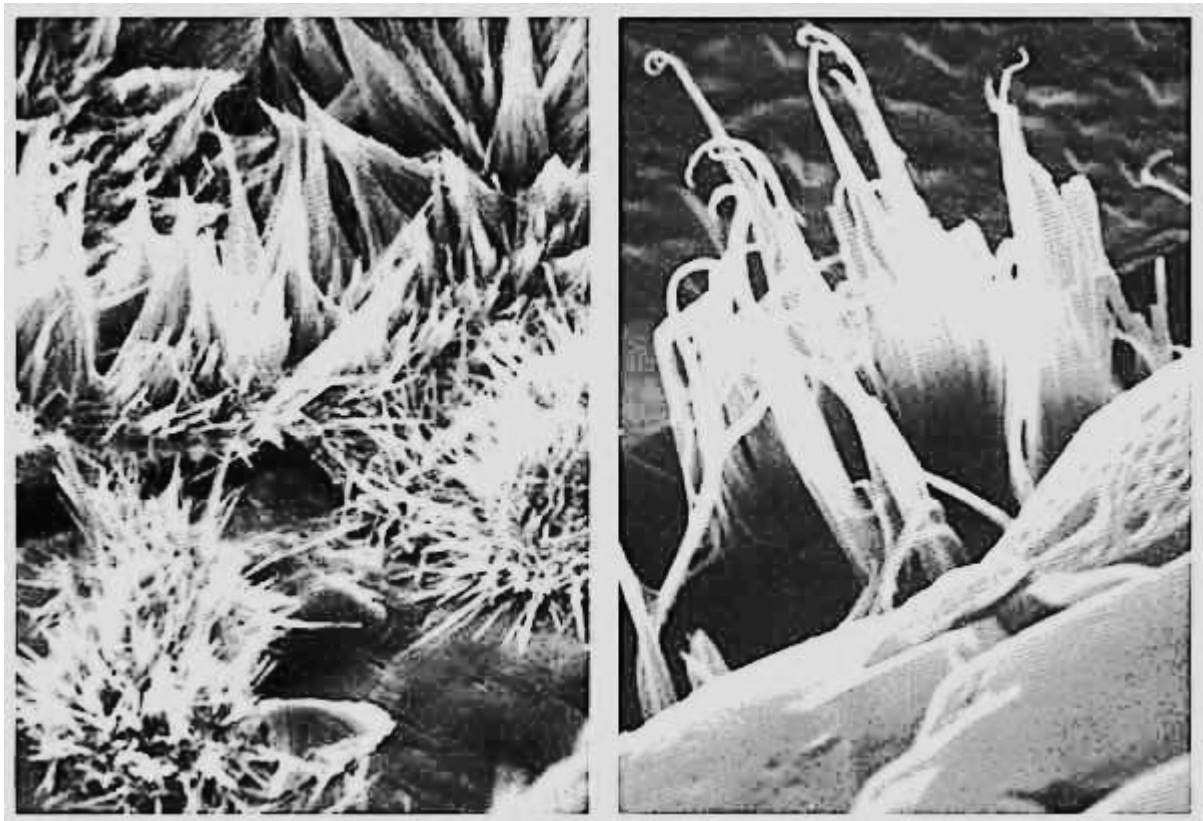
AA: IEVLDNTQQLKILADSINSEIGILCSALQKIK

430 440 450 460

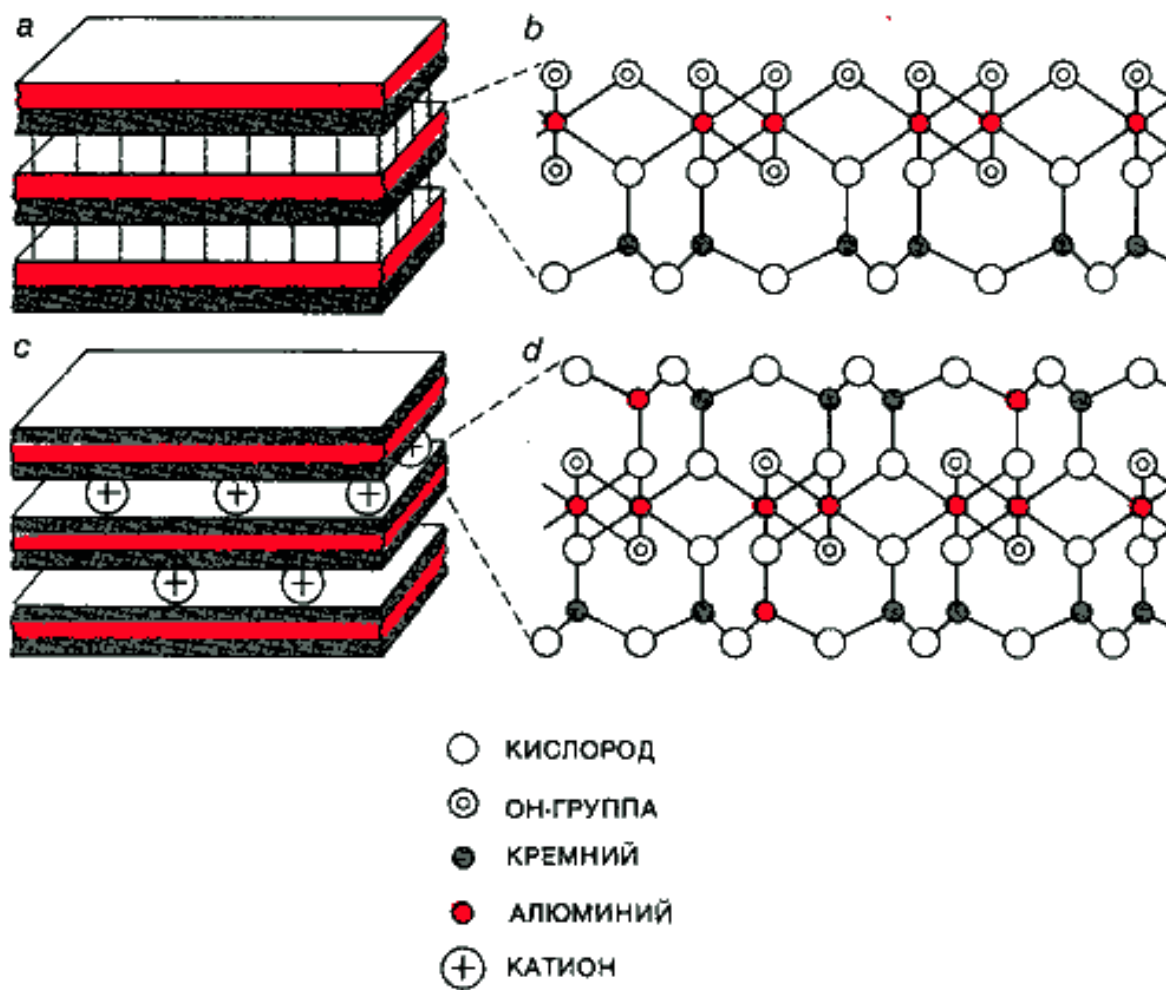
Таблиця. 1. Q-и SOV-данні для PsiPred по відношенню із структурою DSSP.



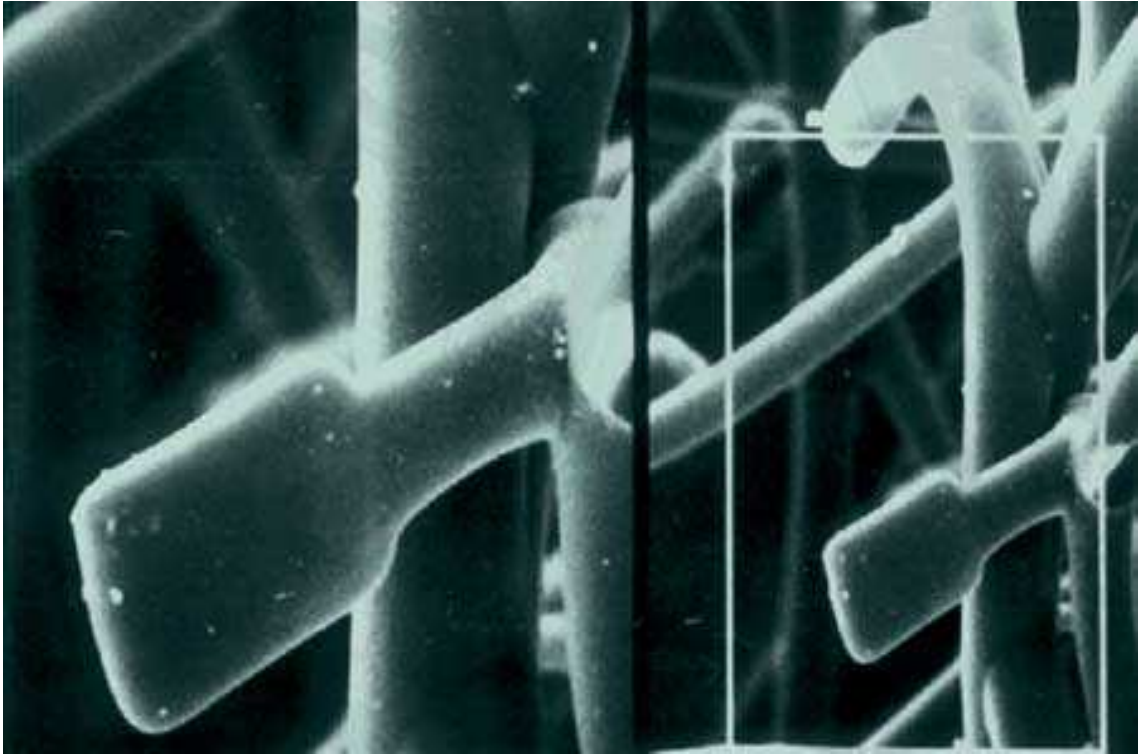
Мал. 1. Хімічна будова трубчатої частини монтморілоніту на зрізі. Зображення у вигляді співвідношення сфер (А) і у вигляді поліедрів (Б).



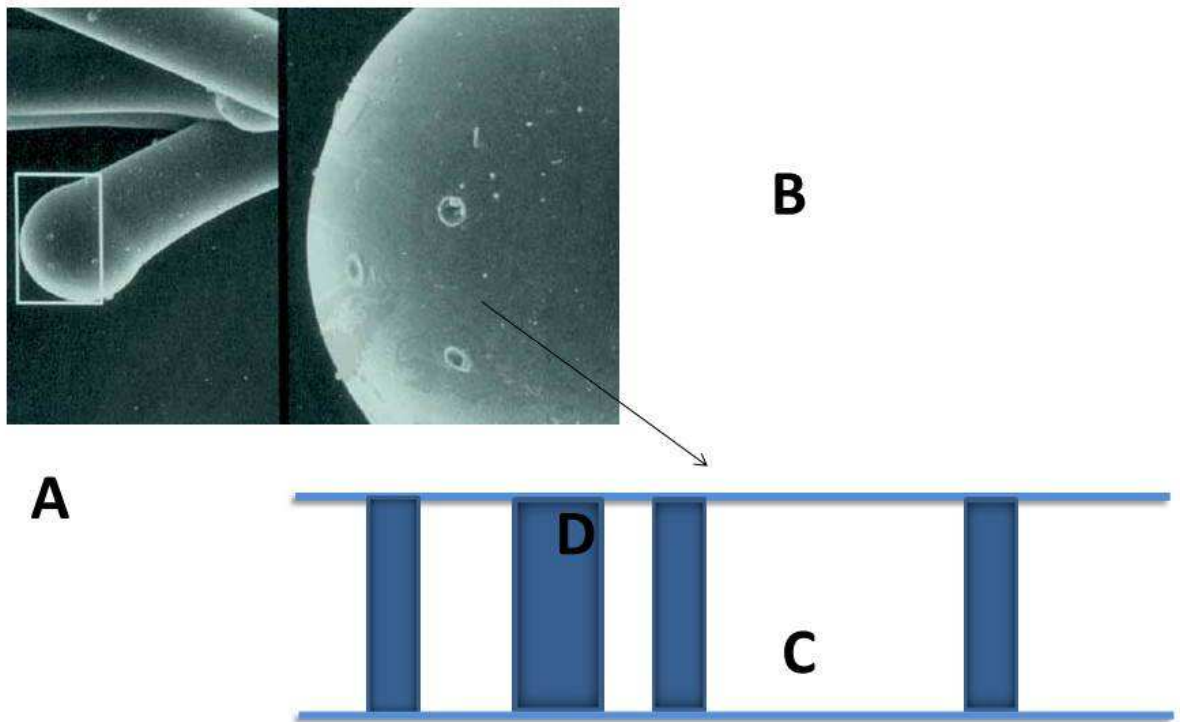
Мал. 2. Кристали наноколоній монтморілонту (електронна мікрофотографія: збільшення 32 000 та у 16 000 разів).



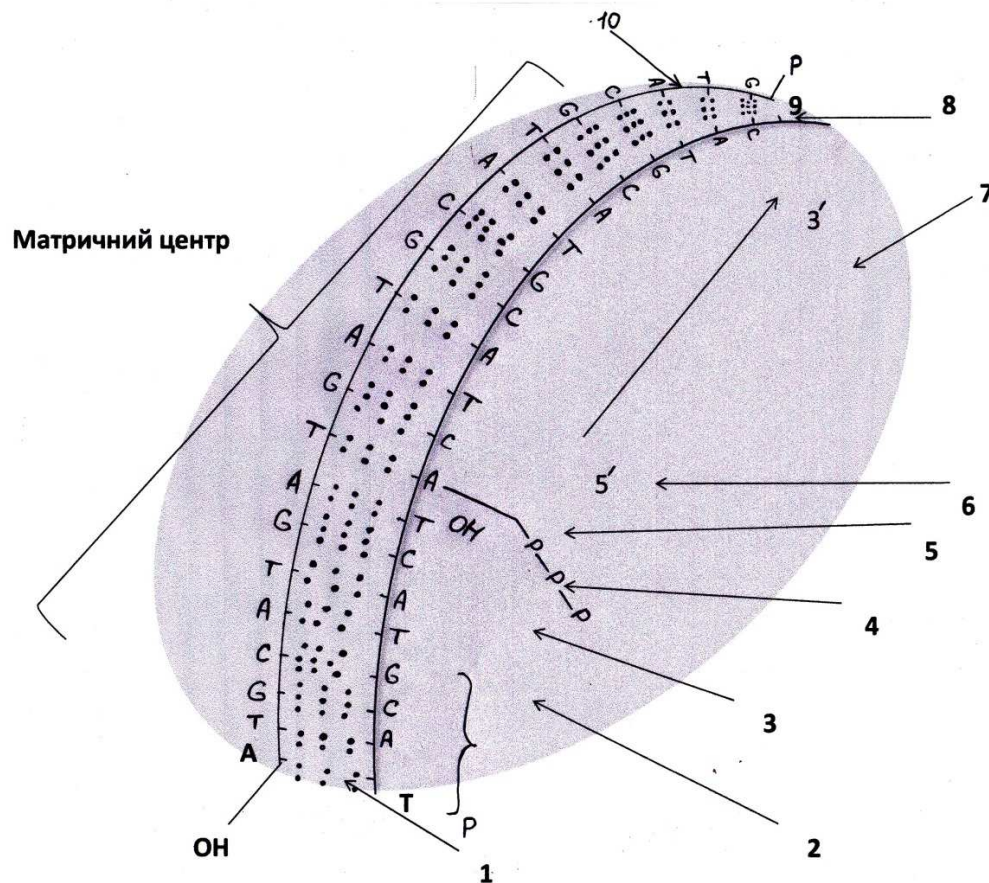
Мал. 3. Структура кристалу монтморилоніту.



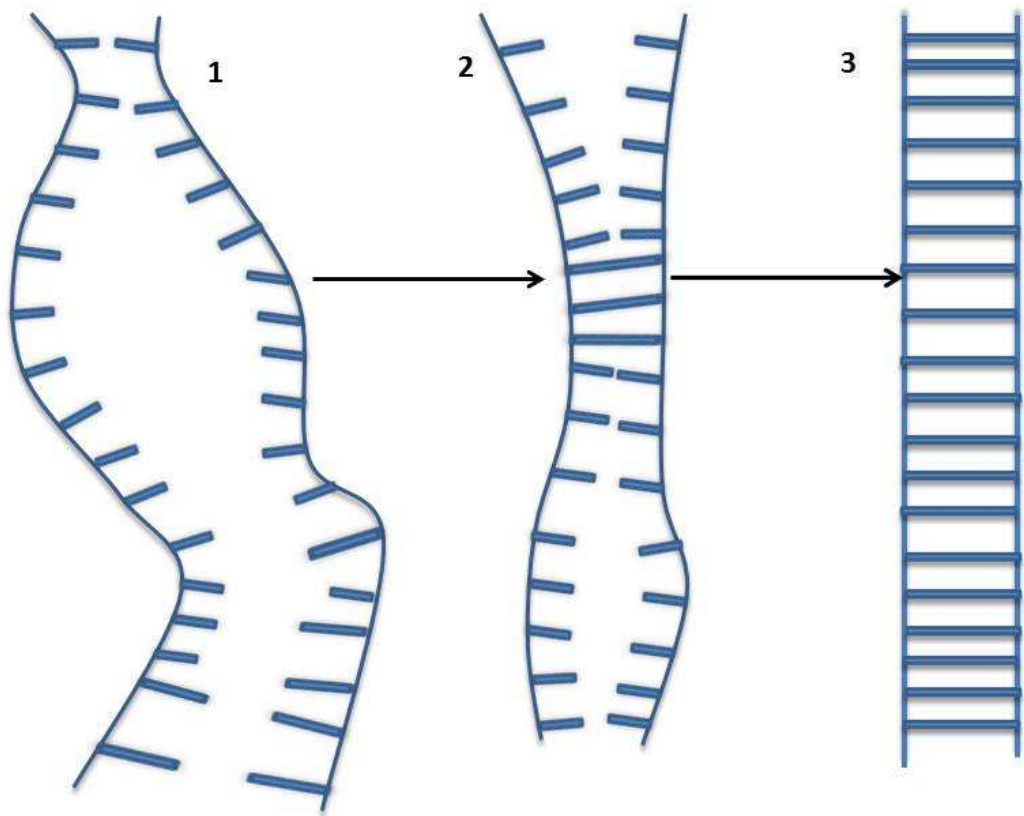
Мал. 4. Кристали монтморилоніту та пори для субстрату.



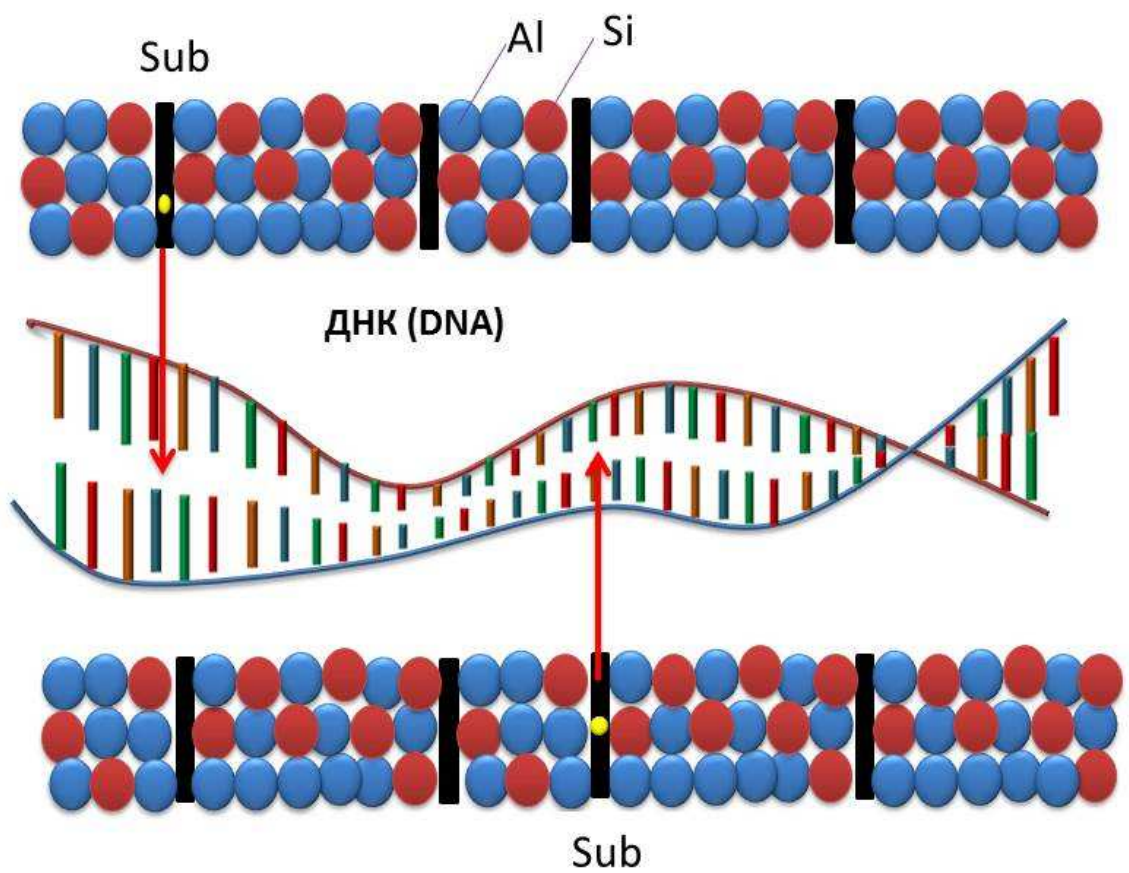
Мал. 5. Електронномікроскопічна фотографія (А) збільшення у 16 000 разів, (В) 32 000 разів, (С)тіло кристалу та (D) пори.



Мал. 6. Модель кристалу нанокolonій монтморілоніту яка показує розташування функціональних центрів пор з субстратом по відношенню до матричного і затравного ланцюга ДНК: 1 – затравний ланцюг, затравний центр, 3 – 3' - 5' - ендонуклеазний (корегуючий центр), 4 – центр кінцевої ділянки затравки, 5 – три фосфатний центр, 6 - 5' - 3' - ендонуклеазний центр, 7 – кристал нанокolonій монтморілоніту, 8 - ДНК – ланцюг, 9 – нуклеотидні послідовності, 10 – матричний ланцюг.



Мал. 7. Послідовні етапи ренатурації фрагментів ДНК при відновленні структури ДНК. Ренатурація під дією кристалів монтморилоніту потребує проходженню двох окремих реакцій: (1) енуклеації – утворення водневих зв'язків між двома ланцюговими фрагментами; це бімолекулярна реакція, т. ін.. реакція другого порядку; (2) застібання, при якій водневі зв'язки утворюються між всіма основами комплементарних ниток.



Мал.8. Реакція добудови розірваного дефектного фрагменту ДНК субстратом, що міститься у порах кристалу.