

На правах рукописи

ЧЕРНОРУДСКИЙ АЛЕКСАНДР ЛЕОНИДОВИЧ

**РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БЕЛКОВ
ЗА СЧЕТ САЙТ-СПЕЦИФИЧНОГО УБИКВИТИЛИРОВАНИЯ**

03.00.04 – биохимия

03.00.13 – физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Нижний Новгород
2008

Работа выполнена на базе кафедры физиологии и биохимии человека и животных Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и группы постгеномных технологий Научно-исследовательского института прикладной и фундаментальной медицины Нижегородской государственной медицинской академии.

Научные руководители: доктор биологических наук, доцент
Корягин Александр Сергеевич

кандидат медицинских наук
Гайнуллин Мурат Рушанович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Новиков Виктор Владимирович

кандидат биологических наук
Мошковский Сергей Александрович

Ведущая организация: ФГУ «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины Росздрава»

Защита диссертации состоится «___» _____ 2008 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.15 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ННГУ им. Н.И.Лобачевского

Автореферат разослан «___» _____ 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, доцент



Корягин А.С.

Список сокращений

а.м.е. – абсолютные массовые единицы
 ЭФР – эпидермальный фактор роста
 CaM – кальмодулин
 E1– убиквитин-активирующий фермент
 E2 – убиквитин-конъюгирующий фермент
 E3 – убиквитин-протеин лигаза
 EGFR – рецептор эпидермального фактора роста
 MALDI – матричная лазерная десорбция/ионизация
 ODC – оротидин 5'-фосфат декарбоксилаза
 PCS – пероксисомальная цитрат синтаза
 SDS-PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия
 XIAP – X-связанный ингибитор апоптоза

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Убиквитилирование представляет собой ковалентное присоединение небольшого белка убиквитина к акцепторному лизину, экспонированному на поверхности белка-мишени. Модифицированный таким образом лизин принято называть сайтом убиквитилирования. Молекула убиквитина содержит 7 остатков лизина, которые также могут служить сайтами убиквитилирования. В результате полимеризации нескольких молекул убиквитина формируются так называемые мультиубиквитиновые цепи, структура которых может варьировать. Показана множественность форм модификации белков убиквитином.

Процесс убиквитилирования катализируется иерархическим каскадом из 3-х ферментов: убиквитин-активирующего фермента E1, убиквитин-конъюгирующего фермента E2 и убиквитинлигазы E3. Следует отметить, что убиквитилирование обратимо, так как разнообразные деубиквитилирующие ферменты (DUBs) способны отщеплять убиквитин от субстратов, а также расщеплять мультиубиквитиновые цепи.

Механизмы убиквитин-зависимой регуляции контролируют большинство клеточных процессов эукариот. За счет модификации разнообразных белков-мишеней убиквитилирование участвует в регуляции таких важнейших клеточных процессов, как пролиферация и дифференцировка, репарация ДНК, передача внутриклеточного сигнала, апоптоз и иммунный ответ. Естественно, что любой сбой в системе убиквитина ведет к развитию разного рода патологий, в том числе злокачественных новообразований и нейродегенеративных заболеваний. Регуляторное значение убиквитилирования для физиологии клетки вполне сопоставимо со значением фосфорилирования, а по разнообразию осуществляемых через него функций превосходит все известные посттрансляционные модификации. Все это определяет актуальность исследований в данной области.

При этом далеко не все убиквитин-зависимые механизмы на сегодняшний день полно охарактеризованы. Это связано с тем, что кодируемый

убиквитилированием сигнал гетерогенен и определяется как типом модификации (присоединение одного остатка убиквитина или мультиубиквитиновых цепей различного строения), так и специфичностью сайтов убиквитилирования. Изучение механизмов и молекулярно-физиологических последствий убиквитилирования невозможно без определения специфических сайтов модификации, так как присоединение убиквитина по разным остаткам лизина различным образом влияет на судьбу белка-мишени и может давать старт различным клеточным процессам.

Прямая идентификация сайтов убиквитилирования открывает возможности для анализа пространственного расположения присоединенного остатка убиквитина по отношению к функционально важным участкам поверхности белка-мишени. Это позволяет анализировать и прогнозировать прямые эффекты убиквитилирования, реализующиеся на уровне индивидуального белка-мишени и непосредственно затрагивающие его функциональную активность.

Цели и задачи исследования

Цель работы – идентифицировать сайты убиквитилирования ряда белков и определить функциональное значение данных сайтов в регуляторном контексте. В качестве объектов исследования были выбраны 2 различных клеточных процесса:

- 1) Убиквитин-зависимая внутриклеточная передача сигнала с участием рецептора эпидермального фактора роста;
- 2) Убиквитин-зависимый механизм репарации ДНК у дрожжей, опосредованный ферментативным комплексом Ubc13/Mms2.

В соответствии с целью и выбором объектов исследования были поставлены следующие задачи:

- 1) Проанализировать механизм убиквитилирования рецептора ЭФР и определить сайты модификации в процессе эндоцитоза с помощью методов масс-спектрометрии;
- 2) Идентифицировать сайты модификации в процессе аутоубиквитилирования фермента Ubc13 *in vitro*;
- 3) Проанализировать функциональное значение обнаруженных сайтов модификации с точки зрения молекулярно-физиологических последствий убиквитилирования;
- 4) На основании полученных данных и *in silico* анализа выявить возможный механизм прямого влияния убиквитилирования на функциональные свойства белков-мишеней.

Научная новизна

Впервые с помощью методов масс-спектрометрии идентифицированы сайты убиквитилирования рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) на поздней стадии эндоцитоза. Обнаружено, что молекула EGFR может подвергаться убиквитилированию во внеклеточном лиганд-связывающем домене.

Впервые показано, что дрожжевой убиквитин-конъюгирующий фермент Ubc13 подвергается аутоубиквителированию в области N-конца. Предполагается, что такая модификация может регулировать переключение между различными путями репарации ДНК.

Впервые с помощью методов биоинформатики проанализированы пространственные структуры ряда убиквитин-белковых конъюгатов и предложен механизм прямого действия убиквителирования на функциональную активность белков-мишеней, реализующийся за счет стерических ограничений.

Научно-практическая значимость

Результаты работы имеют большое значение для дальнейшего углубленного изучения убиквитин-зависимых метаболических процессов. В частности, в работе получены новые данные об участии убиквитина в процессах пострепликативной репарации ДНК и внутриклеточной передачи сигнала с участием рецептора эпидермального фактора роста. Ввиду огромного значения этих процессов для жизнедеятельности клетки и участия рассматриваемых систем в патогенезе рака, полученные в работе данные могут служить теоретической основой для разработки терапевтических подходов к лечению злокачественных новообразований. Используемый в данной работе экспериментальный подход, основанный на сочетании методов протеомики и биоинформатики, может в дальнейшем использоваться для анализа разнообразных молекулярно-физиологических процессов. Материалы диссертации могут быть использованы в учебных лекционных курсах по биохимии и биоинформатике.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Убиквителирование белка EGFR в процессе эндоцитоза – крайне динамичный процесс, характеризующийся наличием разнообразных модифицированных форм, отличающихся между собой как сайтами убиквителирования, так и числом присоединенных молекул убиквитина. При этом эффективность убиквителирования EGFR зависит от активности тирозинкиназного домена рецептора и наличия полноразмерного C-конца, который необходим для достижения высокой степени модифицированности.
2. Дрожжевой убиквитин-конъюгирующий фермент Ubc13 при отсутствии адаптерного белка Mms2 способен аутоубиквителироваться по нескольким остаткам лизина. Аутоубиквителирование белка Ubc13 по остатку лизина, находящемуся на N-конце молекулы (Lys14), не ведет к протеасомной деградации Ubc13. Такая модификация может блокировать сборку комплексов Ubc13 с убиквитинлигазами в отсутствие Mms2. Данный механизм предположительно задействован в переключении процессов пострепликативной репарации ДНК с безошибочного на мутагенный путь.
3. Присоединение убиквитина может напрямую влиять на функциональную активность белка-мишени за счет реализации стерических эффектов,

вызванных перекрыванием молекулой убиквитина функционально важных зон на поверхности субстрата. Этот регуляторный феномен имеет сайт-специфичный характер.

Апробация работы

Основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на симпозиумах и конференциях:

- 30th FEBS Congress & 9th IUBMB Conference “Protein World” (Budapest, Hungary, 2005)
- XVIII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2006)
- 5th International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (Novosibirsk, Russia, 2006)
- EMBO Practical Course “Ubiquitin and SUMO” (Split, Croatia, 2006)
- EMBO Practical Course “Bioinformatics for Mass Spectrometry in Proteomics” (Les Diablerets, Switzerland, 2006)
- Annual joint meeting of the Genetics Society and the British Societies for the Cell and Developmental Biology (Edinburgh, UK, 2007)
- 4th International Symposium on Computational Methods in Toxicology and Pharmacology Integrating Internet Resources (Moscow, Russia, 2007)
- EMBO Conference “Ubiquitin and Ubiquitin-like Modifiers in Cellular Regulation” (Riva Del Garda, Italy, 2007)
- II Съезд Общества клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2007)

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на ____ страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, методической части, полученных результатов и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы (____ источник). Работа иллюстрирована ____ рисунками и содержит ____ таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы

Реактивы Все использованные реактивы были аналитического качества или лучше, производства фирм Sigma, Reanal и др. Для приготовления всех использованных в работе растворов использовалась вода высшей степени очистки MilliQ, полученная на установке фирмы Millipore.

Рекомбинантные белки Дрожжевые белки GST-Ubc13, GST-Ubc13 K92R и Mms2, а также убиквитин-активирующие ферменты E1 человека, пшеницы и дрожжей были ранее получены в лаборатории д-ра Ульрих (Cancer Research UK). Также использовали белок E1 млекопитающих производства Boston Biochem. В работе использовался убиквитин дикого типа из эритроцитов коровы (Sigma) и мутантные формы убиквитина с заменой на аргинин лизина 63 (K63R) или всех остальных лизинов убиквитина (K63only)(Boston Biochem).

Антитела В работе были использованы кроличьи поликлональные антитела к следующим антигенам: убиквитин (DAKO), EGFR (Cell Signaling), Ubc13 (Boston Biochem); а также мышинные моноклональные к экстраклеточному домену EGFR (Sigma), белку c-Cbl (Cell Signaling) и фосфотирозину (Sigma). В качестве

вторичных антител при иммуноблоттинге использовали козы антитела, полученные против иммуноглобулинов кролика, сконъюгированные с пероксидазой (GAR-HRP) и козы антитела, полученные против иммуноглобулинов мыши, сконъюгированные с пероксидазой (GAM-HRP) (Sigma).

Реакция убиквитилирования *in vitro*

Реакционная смесь содержала по 5 μ M рекомбинантных белков Ubc13 и Mms2, 70-190 nM E1, по 10 mM АТФ и дитиотреитола, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 25 mM TrisHCl (pH 7,5) и убиквитин в концентрации 0,5 мг/мл. Реакция проводилась при 30°C в течение 1-12 часов, остановка инкубации осуществлялась добавлением эквивалентного объема 2X буфера Лэммли и нагреванием до 65°C в течении 15 минут.

Так как в эксперименте использовались рекомбинантные варианты белка Ubc13, слитые с остатком глутатион-S-трансферазы (GST), перед масс-спектрометрическими исследованиями проводилось отщепление GST тромбином (Novagen) в соответствии с рекомендациями производителя.

Культивирование клеточных линий

Клетки эпидермоидной карциномы человека A431, а также клетки, полученные на основе фибробластов мыши линии NIH 3T3 и экспрессирующие нормальные или мутантные формы рецептора ЭФР человека (HER14, CD165, CD123, CD63 и K721R), были получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН). Клетки культивировались в чашках Петри с использованием среды Игла, модифицированной Дюльбекко (DMEM), содержащей 10% (v/v) эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (РАА). Инкубация проводилась 2-3 суток при 37°C в атмосфере 5%-ного CO₂. Перед проведением опыта клетки переводились на обедненную среду, содержащую около 0,1% сыворотки.

Стимуляция эндоцитоза с предварительным связыванием лиганда

Монослойные культуры клеток инкубировали в рабочей среде DMEM, содержащей 0,1% БСА (Sigma) и 20 mM HEPES (pH 7,4) при 4°C в течение 60 мин в присутствии ЭФР в концентрации от 20 до 100 нг/мл. После отмывки несвязавшегося эпидермального фактора роста эндоцитоз стимулировали переводом клеток в рабочую среду, не содержащую лиганда, при температуре 37°C на определенное время. По окончании инкубационного периода клетки помещали на лед, среду удаляли.

Иммунопреципитация

Клетки лизировали в буфере, содержащем 1% (w/v) Тритона X-100, 0,5% (w/v) NP40, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 1 mM PMSF, 20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 1 mM ортованадата натрия, 1 mM N-этилмалеимида и 1:500 коктейля ингибиторов протеаз (Sigma). Концентрацию белка измеряли по методу Лоури (Lowry et al., 1951). Параллельные пробы уравнивались по концентрации белка. Инкубацию с антителами проводили при 4°C 10-12 часов при перемешивании. Затем добавляли сефарозу, конъюгированную с A/G-белком, по 10 мкл на пробу, и инкубировали еще 4 часа при тех же условиях. После отмывки 3 раза на льду лизисным буфером к сефарозе добавляли 2-кратный раствор буфера Лэммли и кипятили 2 раза по 5 минут, центрифугировали 1 минуту на 12000 об./мин, отобранный буфер в дальнейшем использовали для электрофореза.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии SDS

Электрофорез в геле проводили по методу Лэммли (Laemmli et al., 1970) с использованием камеры Mini Protean (Bio-Rad). При необходимости белки перед

нанесением концентрировали осаждением в 10% растворе ТХУ. Осажденные белки растворяли в буфере для проб (0,0625 М Tris-HCl, pH 6,8, 10% глицерин, 0,001% бромфеноловый синий, 5% β -меркаптоэтанол, 2,3% SDS), pH 6,8. По окончании электрофореза гель использовали для последующего иммуоблоттинга или окрашивали 30-60 мин в растворе, содержащем Coomassie Blue R250, 40% метанола, 10% уксусной кислоты. Несвязанный краситель удаляли отмывкой геля в растворителе (40% метанол, 10% уксусная кислота).

Иммуоблоттинг

Белки переносили из полиакриламидного геля на мембрану методом полусухого или мокрого переноса с помощью блоттеров Bio-Rad. Использовали поливинилиден-дифлюоридную (PVDF) мембрану Problot-Membran (Applied BioSystems) или нитроцеллюлозную мембрану Immobilon-P (Millipore). Визуализация результатов блоттинга проводилась с помощью метода хемилюминисценции, в соответствии с методическими рекомендациями производителя набора для детекции ECL Western Blotting Analysis System (Amersham Biosciences).

Трипсинолиз и экстракция пептидов

Вырезанные из полиакриламидного геля белок-содержащие полосы измельчались скальпелем и многократно промывались смесью ацетонитрила и 50 mM бикарбоната аммония в равных объемных долях для удаления красителя. После добавления к кускам геля рабочего раствора трипсина (50 нг модифицированного свиного трипсина в 10 мкл 50 mM раствора аммония бикарбоната) пробы оставлялись на льду на 20 мин для вхождения трипсина в гель. Затем добавляли 30 мкл 50 mM раствора бикарбоната аммония и инкубировали пробы 4 часа при температуре 37°C. После инкубации пептиды экстрагировали из геля 5% муравьиной кислотой и высушивали на SpeedVac (Thermo Savant).

Масс-спектрометрия с MALDI-ионизацией

Высушенные экстракты пептидов ресуспендировали в растворе 50% (v/v) ацетонитрила и 0,1% (v/v) трифторуксусной кислоты и наносили на мишень MALDI в смеси с эквивалентным количеством раствора матрицы (альфа-циано-4-гидрокси-В-фенилакриловая кислота в концентрации 10 мкг/мкл). Раствор матрицы также содержал 20 фемтомоль ангиотензина I в качестве внутреннего стандарта калибровки и 3,3 наномоля монофосфата аммония для подавления образования побочных продуктов. Нанесенный на мишень раствор высушивали и анализировали на времяпролетном масс-спектрометре ABI 4700 Proteomic Analyser (Applied Biosystems). Сгенерированные спектры калибровали по пикам пептидов, соответствующих ангиотензину I (1296,6853 а.м.е.) и/или продуктам автолиза трипсина (842,5100 а.м.е. и 2211,1046 а.м.е.) с помощью программного пакета ABI Data Explorer (Applied Biosystems). Поиск совпадений масс пептидов проводили по базе данных NCBI с помощью инструмента Protein Prospector MS-FIT (<http://prospector.ucsf.edu/>).

Масс-спектрометрия ионно-циклотронного резонанса

Смесь триптических пептидов в растворе 50% (v/v) ацетонитрила и 0,1% (v/v) трифторуксусной кислоты анализировалась на гибридном масс-спектрометре LTQ-FT (Thermo Electron) с HPLC-хроматографом Agilent 1100 (Agilent Technologies). Пептиды вначале загружали в микрокапиллярную колонку с материалом C18 для обратнофазовой хроматографии. Элюирование пептидов проводили линейным градиентом 5-40% буфера А (97,5% ацетонитрил/0,15% муравьиная кислота) в буфере Б (2,5% ацетонитрил/0,15% муравьиная кислота). Разделенные фракции напрямую поступали в масс-спектрометр. Снятие спектров проходило в режиме автоматического переключения на тандемную масс-спектрометрию в зависимости от

интенсивности сигнала. Полученные спектры анализировались с помощью алгоритма Phenyx (<http://phenyx.vital-it.ch/pwi/>) с использованием баз данных белковых последовательностей NCBI и Swiss-Prot, с обязательной ручной верификацией результатов.

Биоинформатический анализ убиквитилирования белков

Аминокислотные последовательности анализируемых белков были взяты из базы данных Swiss-Prot (<http://www.expasy.org/sprot/>) (Gasteiger et al., 2003), известные 3D структуры – из базы данных Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>) (Berman et al., 2000). В случае отсутствия известных 3D структур проводили сравнительное моделирование пространственной структуры белковой глобулы с помощью сервиса Swiss-Model (Automated Comparative Protein Modelling Server, <http://swissmodel.expasy.org>) (Schwede et al., 2003). Последовательность активного центра выявляли с помощью инструмента ScanProsite (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>) (Gattiker et al., 2002). Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы ClustalW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.htm>) (Thompson et al., 1994). Локальная программа BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.2 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) (Hall, 1999) использовалась для попарного выравнивания последовательностей. Выравнивание трехмерных структур производилось методом комбинаторного растягивания (<http://cl.sdsc.edu/ce.html>) (Shindyalov and Bourne, 1998). Участие аминокислот в межсубъединичных контактах рассчитывалось при помощи Protein-Protein Interaction Server v.1.5 (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/PP/server/>) (Jones and Thornton, 1996). Для визуализации результатов и анализа моделей использовалась программа Swiss-PdbViewer (Guex and Peitsch, 1997).

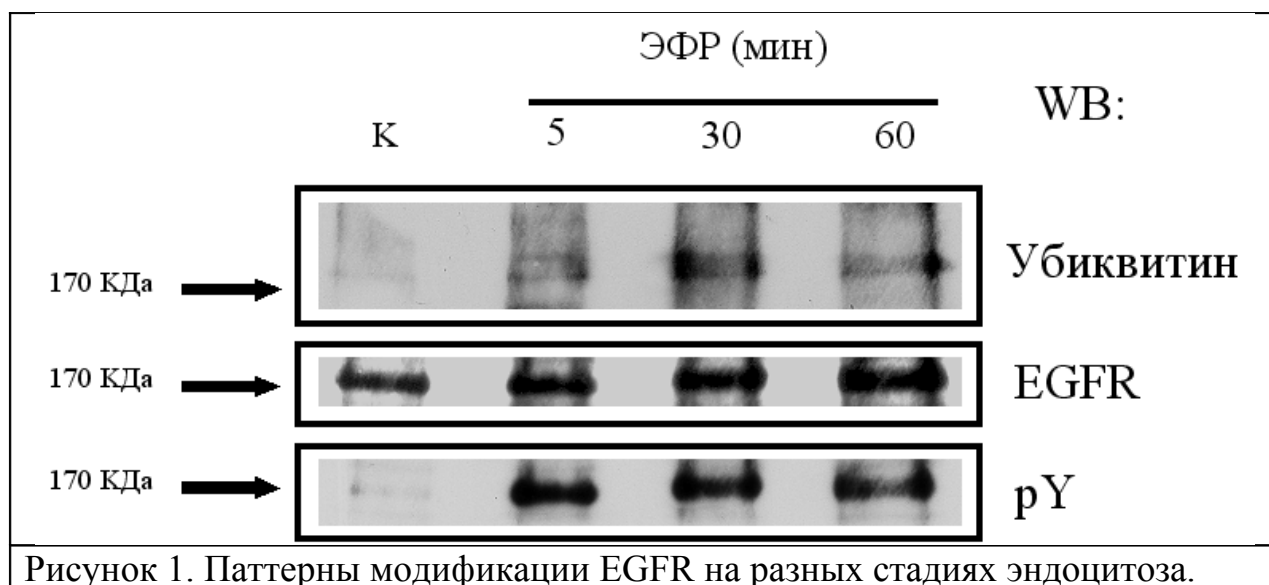
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

In vivo исследование убиквитилирования рецептора эпидермального фактора роста

Данная часть работы выполнялась совместно с Лабораторией динамики внутриклеточных мембран Отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург (зав. лабораторией – проф. Е.С. Корнилова). На данном этапе ставилась задача проанализировать механизмы убиквитилирования рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) в процессе эндоцитоза данного белка и осуществления им сигнальной функции. EGFR – один из ключевых компонентов каскада передачи сигнала в клетках высших эукариот. В ответ на связывание лиганда рецептор димеризуется, в результате активируется его тирозинкиназа, фосфорилирующая тирозины в области С-конца рецептора (Ullrich, Schlessinger, 1990). Активация тирозинкиназы в результате образования лиганд-рецепторного комплекса необходима для стимуляции всех внутриклеточных сигналов, идущих с рецептора ЭФР. Фосфорилированные тирозины затем узнаются белком c-Cbl, который убиквитилирует EGFR.

Нами было установлено, что паттерн убиквитилирования рецептора меняется в зависимости от прогрессии ЭФР-индуцированного эндоцитоза. В клетках эпидермоидной карциномы человека A431 максимум убиквитилирования EGFR приходится на 30 минут после запуска эндоцитоза (рис. 1). На стадии 90 минут уровень убиквитилирования заметно падает,

причем это изменение коррелирует с падением уровня фосфорилирования. Эти наблюдения подтверждаются полученными ранее данными (Melikova et al., 2006).



Нами было проведено выделение модифицированных форм рецептора на разных стадиях эндоцитоза, соответствующих 5, 30 и 60 минутам после запуска ЭФР-стимулированного эндоцитоза, с помощью иммунопреципитации. Далее выделенные модифицированные формы рецептора анализировались масс-спектрометрически. В пробе, соответствующей поздней стадии эндоцитоза (60 минут после добавления ЭФР) было успешно идентифицировано несколько модифицированных пептидов, сводная информация по которым представлена в таблице 1.

Таблица 1.

Обнаруженные в эксперименте модифицированные пептиды EGFR.

Пептид	Модификация	Модифицированный остаток
VLGSGAFGTVYK	Убиквитилование	K704
VKIPVAIK	Убиквитилование	K715
SLKEISDGDVIISGNK	Убиквитилование	K430
ELVEPLTPSGEAPNQALLR	Фосфорилирование	T669
RPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSR	Фосфорилирование	Y1086

Обнаружение фосфорилированного тирозина Y1086 одновременно с убиквитилованными сайтами указывает на тесную взаимосвязь между этими пост-трансляционными модификациями. Данный остаток тирозина в фосфорилированной форме вместе с Y1068 и Y1101 служит сайтом связывания адаптерного белка Grb2, с помощью которого осуществляется не прямое связывание рецептора с убиквитин-протеин лигазой c-Cbl. Известно, что фосфорилирование 3-х остатков тирозина на С-конце EGFR, в том числе и Y1086, необходимо для изменения конформации этого участка (Bishayee et al., 1999). Фосфорилирование даже по минорным сайтам способно сильно влиять на конформацию молекулы рецептора. В свою очередь, изменение

конформации С-конца может быть существенным для ассоциации рецептора с убиквитин-лигазой с-Cbl и последующего убиквителирования. Это подтверждается данными эксперимента по убиквителированию мутантного EGFR с С-концевыми делециями, а также с инактивированным тирозинкиназным доменом рецептора (рис. 2).

В данной части работы было исследовано влияние С-концевого домена на убиквителирование EGFR в процессе ЭФР-индуцированного эндоцитоза. В качестве модели использовалась панель клеточных линий NIH3T3, экспрессирующих человеческий рецептор дикого типа (линия HER14), рецептор, лишенный тирозинкиназной активности (K721R), и укороченные формы рецептора с делециями 63, 123 или 165 С-концевых аминокислот (CD63, CD123 и CD165, соответственно). В таблице 2 представлена подробная характеристика клеточных линий по наличию в экспрессируемом рецепторе функционально значимых аминокислотных остатков.

Таблица 2.

Характеристика использованных в эксперименте клеточных линий.

Клеточная линия	Сайт прямого связывания с-Cbl	Сайты непрямого связывания с-Cbl (через Grb2)			Активный центр тирозинкиназы
	Y1045	Y1068	Y1086	Y1101	
HER14 (WT)	+	+	+	+	+
CD63	+	+	+	+	+
CD123	+	-	-	-	+
CD165	-	-	-	-	+
K721R	+	+	+	+	- (замена К→R)

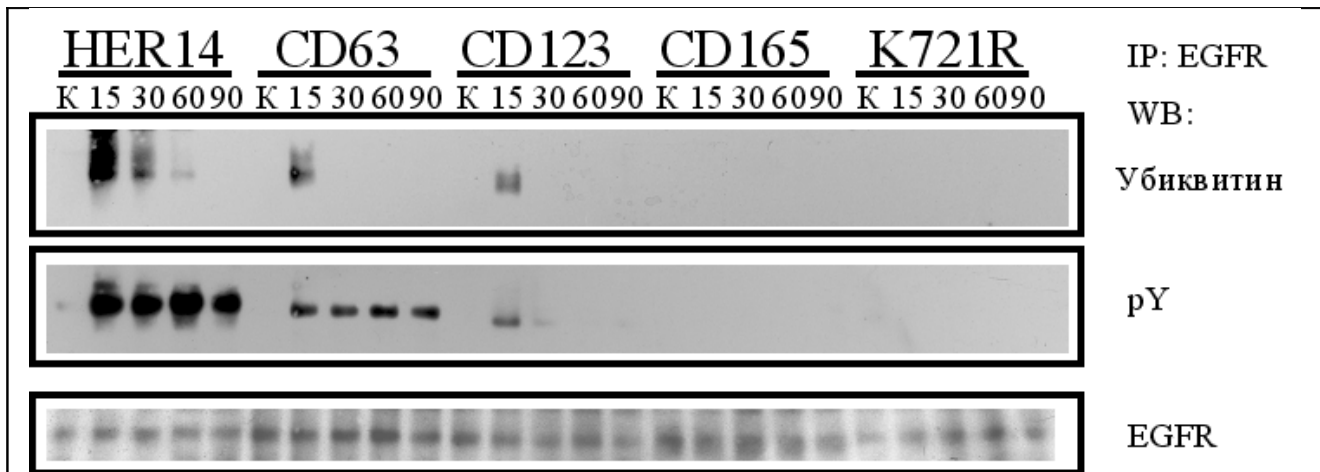


Рисунок 2. Делеции в С-концевом домене EGFR вызывают снижение убиквителирования рецептора.

Таким образом, С-концевой домен длиной в 63 аминокислотных остатка играет важную роль в модуляции степени убиквителирования, несмотря на отсутствие в нем известных сайтов связывания с с-Cbl. При этом сайты непрямого связывания EGFR с убиквитин-лигазой, локализованные несколько дальше от С-конца, необходимы для достижения высокой степени модифицированности рецептора.

Нами были идентифицированы 3 ранее неизвестных сайта убиквитилирования в молекуле EGFR, 2 из которых находятся в тирозинкиназном домене, и 1 – во внеклеточном лиганд-связывающем домене. Ранее в работе проф. Соркина и коллег также было идентифицировано несколько сайтов убиквитилирования в тирозинкиназном домене рецептора (Huang et al., 2006) и показано, что такая модификация регулирует сортировку и деградацию EGFR в лизосомах. Интересно, что обнаруженные нами сайты модификации не совпадают с идентифицированными группой Соркина, хотя также локализованы в тирозинкиназном домене (рис. 3).

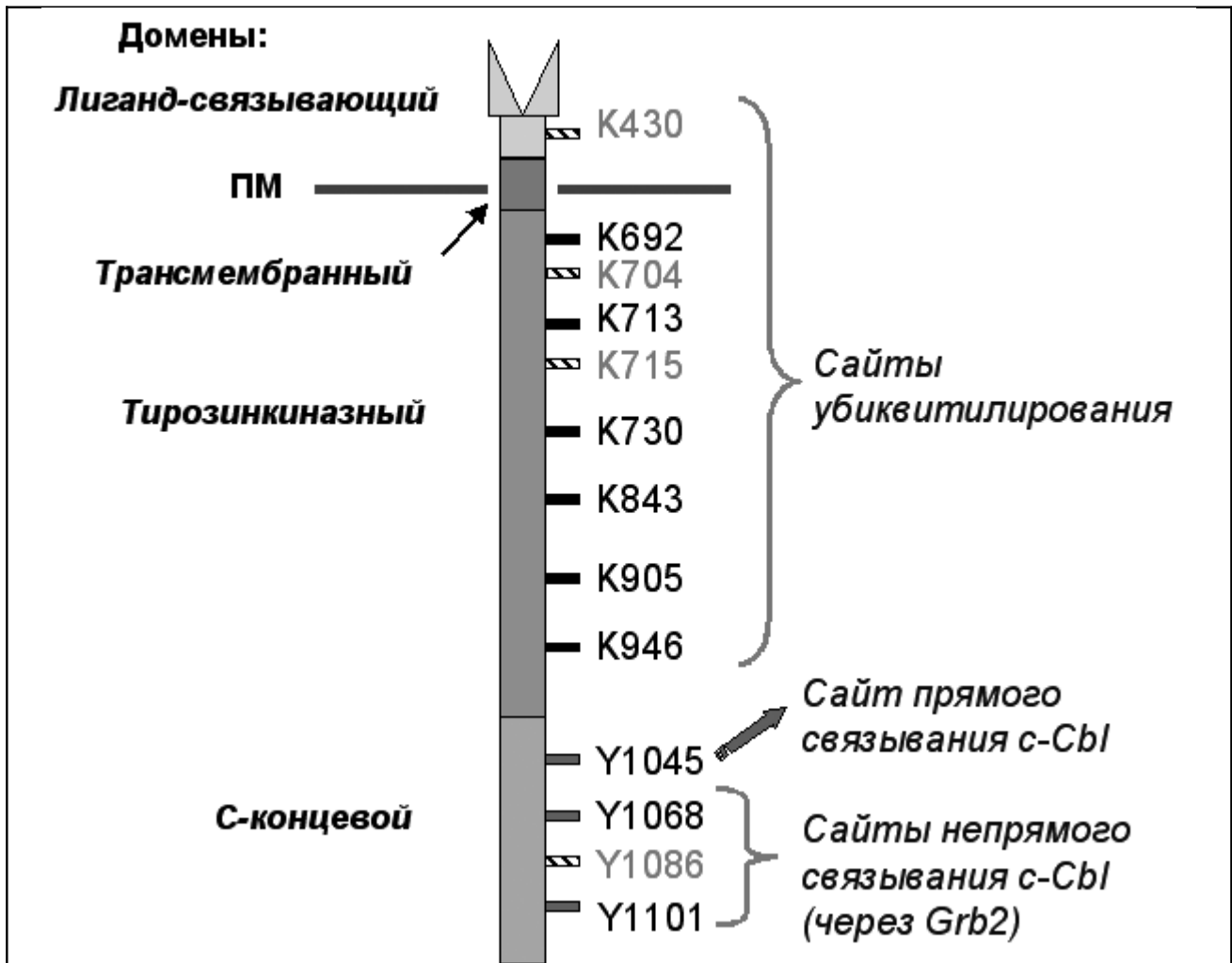


Рисунок 3. Локализация идентифицированных сайтов модификации в различных доменах молекулы EGFR. Черным цветом показаны ранее идентифицированные сайты (Huang et al., 2006); штриховкой – обнаруженные в настоящей работе. ПМ – плазматическая мембрана.

Это может свидетельствовать о специфической роли в процессе распознавания не столько самих точек убиквитилирования, сколько архитектуры мультиубиквитиновых цепей. С другой стороны, в результате деятельности деубиквитирующих ферментов и с-Cbl паттерн модификации может меняться очень быстро. Сотрудники Соркина использовали культуру клеток эпителия аорты свиньи PAE II и наблюдали убиквитилирование после 2 минут протекания эндоцитоза (Huang et al., 2006), в то время как мы изучали

паттерн модификации в клетках A431 на 4-х разных стадиях эндоцитоза, что может объяснять различия в идентифицированных сайтах. Следует отметить, что выбор временной точки в работе Соркина и коллег не совсем релевантен, т.к. в течение 2 минут эндоцитоза может быть эффективно интернализировано не более 10% молекул активированного рецептора (Корнилова и др., 1987), а следовательно, данная точка не отражает картины внутриклеточной сортировки рецепторных комплексов.

Идентифицированные нами сайты убиквитилирования были найдены в пробе, соответствующей 60 минутам после запуска эндоцитоза в клетках. В клетках A431 данная временная точка примерно соответствует поздней стадии внутриклеточной сортировки EGFR, на которой интернализированный рецептор переходит из ранних эндосом в поздние. При этом для прохождения данной стадии необходимо доубиквитилирование рецептора (Melikova et al., 2006). В совокупности эти данные свидетельствуют, что для эффективной сортировки рецептора в поздние эндосомы и последующей деградации в лизосомах могут быть важны не столько определенные сайты убиквитилирования, сколько степень модификации, т.е. большое число присоединенных молекул убиквитина.

Особенно интересен факт обнаружения акцепторного лизина во внеклеточном домене рецептора. Принято считать, что убиквитилирование – процесс исключительно внутриклеточный, соответственно молекула EGFR также конститутивно убиквитилируется внутри клетки. Однако ручной анализ спектров подтвердил достоверность идентификации Lys430 в качестве сайта убиквитилирования. Кроме того, в литературе присутствуют свидетельства о существовании внеклеточной убиквитин-конъюгирующей системы (Sawada et al., 2002; Sakai et al., 2003; Sakai et al., 2004; Baska et al., 2007). Таким образом, модификация внеклеточной части молекулы рецептора представляется вполне вероятной. Если в дальнейшем возможность убиквитилирования молекулы EGFR во внеклеточном домене подтвердится, это может привести к открытию совершенно нового механизма регуляции за счет присоединения убиквитина. Можно предположить, что убиквитилирование во внеклеточном домене будет интерферировать со способностью рецептора связывать лиганд и, таким образом, предотвращать активацию EGFR.

Изучение механизма автоубиквитилирования дрожжевого убиквитин-конъюгирующего фермента Ubc13 *in vitro*

Данная часть работы проводилась совместно с Лабораторией устойчивости к повреждениям ДНК Лондонского исследовательского института Cancer Research UK (руководитель лаборатории – д-р Хелле Ульрих). Объектом для исследования убиквитилирования *in vitro* послужил белок Ubc13 – компонент E2 комплекса убиквитин-протеин лигазы из пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Комплекс Ubc13 с адаптерным белком Mms2 синтезирует длинные мультиубиквитиновые цепи, полимеризованные по лизину-63, и взаимодействует с E3-ферментом Rad5 в так называемом Rad6-пути пострепликативной репарации ДНК (Ulrich, 2000). Интересно, что в случае отсутствия адаптера Mms2, Ubc13 катализирует реакцию переноса

убиквитина на собственные остатки лизинов, т.е. автоубиквитируется. Механизмы и физиологическое значение данного процесса оставались крайне плохо изученными, что и обусловило наше внимание к данному феномену.

Для идентификации сайтов модификации Ubc13 на первом этапе требовалось оптимизировать реакцию автоубиквителирования *in vitro*. Ранее было показано, что автоубиквителирование человеческого Ubc13 проходит по сайту Lys92 (McKenna et al., 2001). Нами было установлено, что кроме данного сайта, молекула дрожжевого Ubc13 содержит дополнительные сайты модификации, т.к. мутантный белок Ubc13 K92R сохраняет способность автоубиквителироваться (рис. 4). Используемый в работе белок GST-Ubc13 в немодифицированной форме мигрирует в полиакриламидном геле с массой около 55 кДа. При использовании антител к Ubc13 были выявлены дополнительные полосы иммунореактивности в диапазоне масс от 55 до 72 кДа, что указывает на присутствие модифицированных убиквитином форм белка.

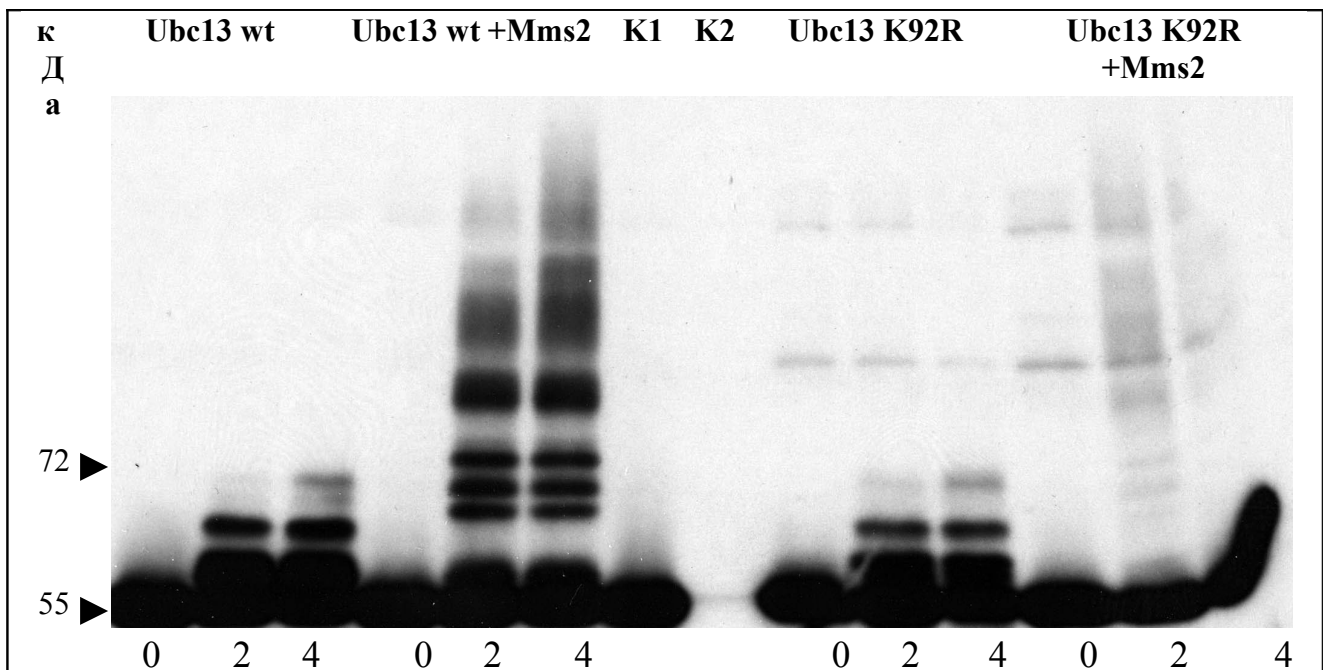


Рисунок 4. Мутантный Ubc13 K92R сохраняет способность подвергаться автоубиквителированию в отсутствие Mms2.

Антитела к Ubc13. Внизу указана продолжительность инкубации в часах.

K1 – реакционная смесь без убиквитина, K2 – реакционная смесь без Ubc13.

После оптимизации условий реакции автоубиквителирования Ubc13 *in vitro* реакция была масштабирована для получения количества продукта (модифицированного Ubc13), достаточного для масс-спектрометрического анализа. Продукты реакции разделялись с помощью SDS-PAGE. После окраски геля Coomassie G250 интересующие нас полосы были вырезаны и отправлены для дальнейшего анализа в Центр анализа белков Cancer Research UK (Лондон, Великобритания). В результате анализа полученных спектров, сочетая

результаты автоматического поиска и ручной обработки списка масс ионов, для Ubc13 удалось идентифицировать ряд специфических пептидов, один из которых содержит сайт убиквитилирования – Lys14 (Таблица 3).

Таблица 3.

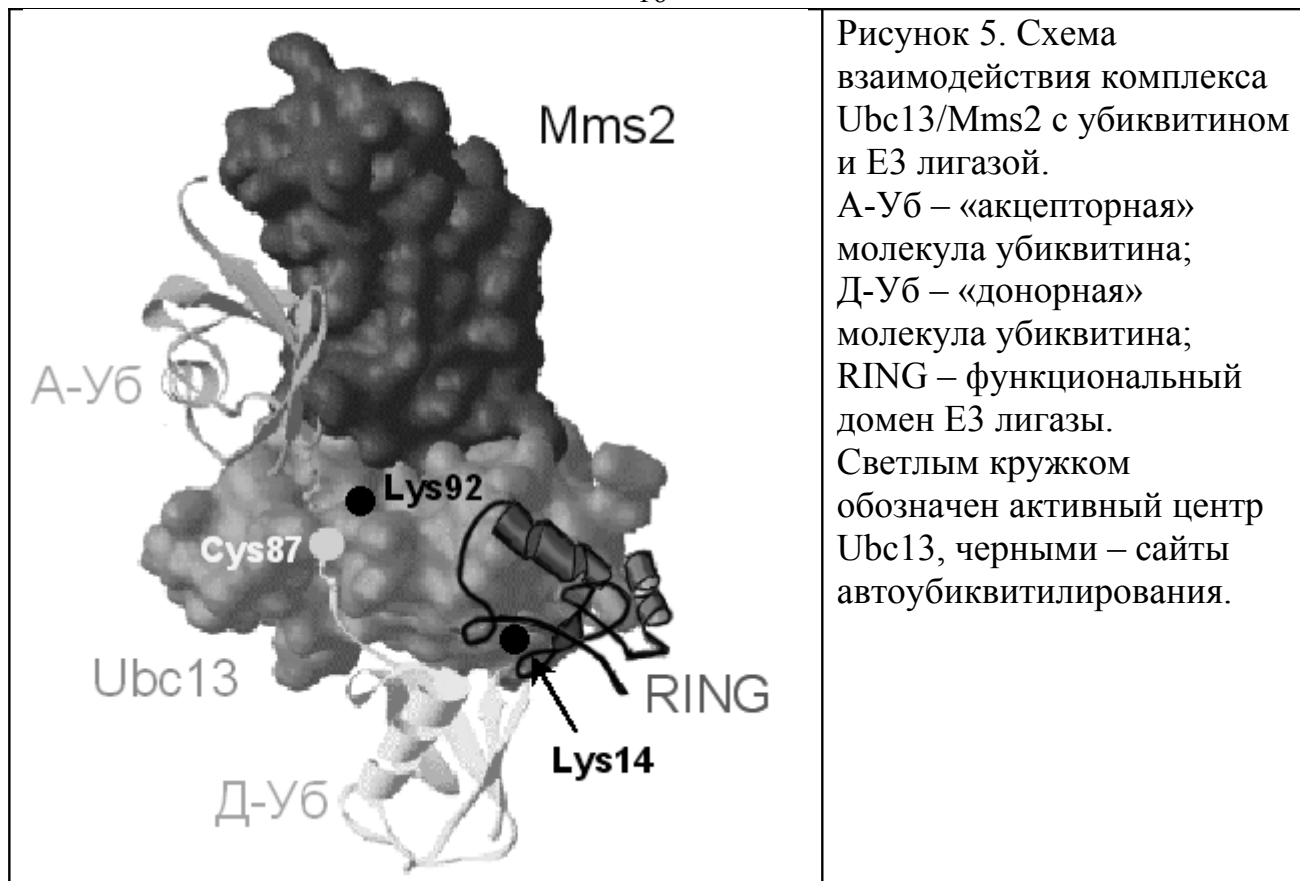
Идентифицированные в эксперименте пептиды Ubc13.

Моноизотопная масса, Да	Пептид	Позиция в последовательности
790	AREWTK	140-145
1027	IYHPNIDR	75-82
1185	TNWSPALQIR	93-102
2045	LVSDPVPGITAEPHDDNLR	15-33
2646	ETEK*LVSDPVPGITAEPHDDNLR	11-33

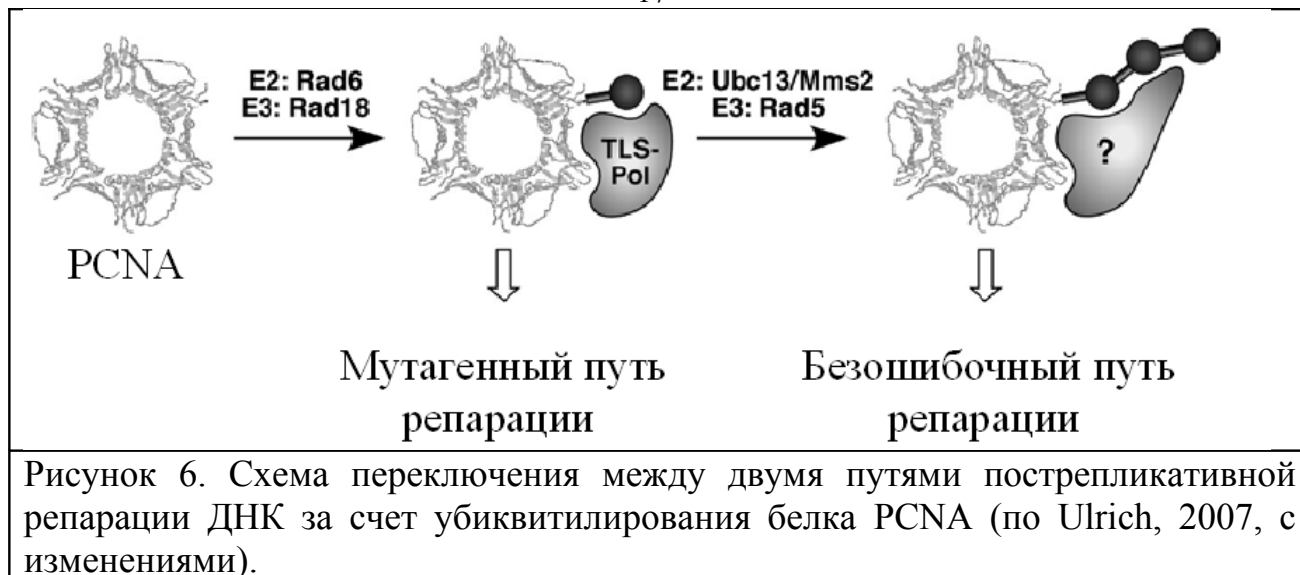
Звездочкой помечен модифицированный лизин (Lys14).

Таким образом, в дополнение к ранее известному сайту модификации (Lys92) был идентифицирован остаток лизина, находящийся на N-конце молекулы (Lys14). Этот феномен может играть роль в регуляции активности Ubc13. Хотя вопрос о роли убиквитилирования именно остатка Lys14 в молекуле фермента требует дальнейшего изучения, уже сейчас можно сказать, что такая модификация скорее всего не ведет к деградации белка в протеасоме, так как нами было показано, что ранее неизвестные сайты убиквитилирования преимущественно модифицируются Lys63-полимеризованными цепями (данные не показаны). Такая модификация может служить специфическим сигналом для узнавания Ubc13 белками-партнерами, имеющими соответствующие убиквитин-связывающие домены. С другой стороны, возможно и ограничение взаимодействия фермента с такими белками из-за перекрывания специфических зон узнавания присоединенной молекулой убиквитина. Возможно, автоубиквитилирование Ubc13 по одному или нескольким сайтам в отсутствие Mms2 – своего рода блокирующий механизм, делающий образование комплексов с любыми другими белками-партнерами невозможным.

Известно, что Ubc13 в качестве фермента E2 способен взаимодействовать с несколькими RING-доменными убиквитинлигазами, в том числе с TRAF6 (Deng et al., 2000) и Rad5 (Ulrich, 2003). По данным ряда исследователей, это взаимодействие осуществляется через связывание RING-домена с областью N-конца Ubc13 (Zheng et al., 2000; Moraes et al., 2001; Chan et al., 2001). Как видно из рис. 5, идентифицированный нами сайт модификации находится непосредственно в зоне взаимодействия. Этот факт позволяет предположить, что автоубиквитилирование по Lys14 способно предотвращать взаимодействие Ubc13 с Rad5, TRAF6 и другими RING-доменными лигазами в отсутствие Mms2. Для решения этого вопроса необходимо в дальнейшем точно определить области взаимодействия Ubc13 с белками-партнерами.



Автоубиквитилирование Ubc13 может иметь серьезные физиологические последствия в силу критической роли данного фермента в процессах репарации ДНК. В клетках эукариот существует система преодоления репликативного блока, позволяющая продолжить репликацию без удаления повреждений и включающая 2 пути. В первом случае включаются специализированные полимеразы с низкоспецифичными активными центрами, реплицирующие поврежденную ДНК с высокой вероятностью образования мутаций (т.н. error-prone translesion synthesis). Второй вариант – исключение полимеразой поврежденных участков и считывание неповрежденной информации с новосинтезированной комплементарной цепи. Переключение между этими двумя путями осуществляется через варьирование паттерна модификации белка PCNA (Shelter, Ulrich, 2003). Моноубиквитилирование этого белка лигазным комплексом Rad6-Rad18 запускает мутагенную быструю репарацию, мультиубиквитилирование комплексом Ubc13/Mms2-Rad5 – безошибочную аккуратную обработку поврежденных участков специализированными полимеразой (см. схему на рис. 6). При этом E3 лигаза Rad5 пришивает к PCNA длинную мультиубиквитиноую цепь, заранее собранную комплексом Ubc13/Mms2. Специфичность полимеризации цепи по Lys63 определяет белок Mms2, роль которого заключается в правильном ориентировании остатков убиквитина. Таким образом, автоубиквитилирование Ubc13 может предотвращать ассоциацию последнего с лигазой Rad5 в отсутствие Mms2, что позволяет избежать неспецифического убиквитилирования субстрата неправильно собранной мультиубиквитиновой цепью.



Такая модификация Ubc13 может быть «вышестоящим» механизмом переключения между двумя вышеописанными путями репарации. В результате нарушения сборки функционально активного комплекса Ubc13/Mms2-Rad5 репарационные процессы могут переключаться на альтернативный мутагенный путь.

***In silico* исследование влияния убиквителирования на функциональную активность белков-мишеней**

Идентификация точек убиквителирования для множества разнообразных белков делает возможным системный анализ феномена убиквителирования, т.е. изучение как механизмов самого убиквителирования, так и последствий данного процесса для белков-мишеней. Особый интерес представляет изучение непротеолитических регуляторных эффектов убиквителирования, так как далеко не все убиквителированные белки подвергаются протеасомной деградации. Обнаруженные в данной работе сайты модификации EGFR и Ubc13 также позволили нам оценить влияние убиквителирования на судьбу этих белков. Полученные нами данные свидетельствуют, что убиквителирование как EGFR, так и Ubc13 не ведет к протеасомной деградации этих белков, а следовательно, имеет регуляторный характер. Регуляторные эффекты в данном случае могут реализовываться за счет влияния убиквителирования на белок-белковые взаимодействия. Механизм подобной регуляции представляет особый интерес для изучения, вследствие почти полного отсутствия литературных сведений о его реализации. Поэтому нашей задачей на данном этапе работы было предсказание возможного прямого влияния убиквителирования на функциональные свойства белков-мишеней.

Для систематизации большого количества разрозненных данных об убиквителированных белках, с целью сделать эти данные доступными для проведения комплексного анализа, нами была создана специализированная база данных UbiProt (<http://ubiprot.org.ru>). В настоящее время в базе данных представлена информация о более чем 400 индивидуальных белках из различных организмов; процесс внесения новых записей продолжается. Каждая запись состоит из блоков, объединенных на отдельной странице. Первый

информационный блок содержит общие характеристики белка - название и синонимы, гены, организм-источник, а также общие свойства белковой молекулы – молекулярная масса, полная длина и длина зрелой формы. Второй блок описывает особенности убиквитилирования белка и включает описание модифицируемого остатка/остатков лизина, а также тип убиквитилирования – количество присоединяемых молекул убиквитина и структуру разветвленных мультиубиквитиновых цепей. Следующий информационный блок посвящен ферментам системы убиквитилирования-деубиквитилирования - убиквитин-конъюгирующим белкам, убиквитин-протеин лигазам, деубиквитирующим ферментам и неферментативным адапторным белкам, в случае, если эти компоненты известны. Каждая запись содержит также ссылки на статьи, из которых получена информация об убиквитилировании данного белка. Кроме того представлена перекрестная ссылка на соответствующую запись в Swiss-Prot/TrEMBL. В случае, если для белка представлена пространственная структура, дается ссылка на соответствующую запись Protein Data Bank. База данных оснащена полнотекстовой поисковой системой, использующей логические операторы.

Из всего массива данных, депонированных в UbiProt, для дальнейшего анализа были отобраны растворимые белки с известными точками убиквитилирования, содержащие охарактеризованные функциональные домены. Необходимым условием было также наличие экспериментальных данных о пространственной организации, или возможность моделирования структуры с высокой степенью достоверности.

В итоге были проанализированы следующие белки: дрожжевые ферменты оротидин 5'-фосфат декарбоксилаза (ODC) и пероксисомальная цитрат синтаза (PCS), кальмодулин позвоночных (CaM) и X-связанный ингибитор апоптоза (XIAP). Для проверки гипотезы о возможном прямом влиянии убиквитилирования на функциональную активность белков-мишеней был проведен анализ взаимного расположения сайтов убиквитилирования и функционально важных доменов выбранных белков. Пример колокализации акцепторных лизинов и аминокислот активного центра фермента показан на рис. 7. В приведенном примере рассматривалось убиквитилирование оротидин 5'-фосфат декарбоксилазы (ODC) в работе (Peng et al., 2003) идентифицировано 3 сайта убиквитилирования ODC: Lys93, Lys209 и Lys253. Анализ участия Lys93 в каталитическом акте показывает, что ϵ -аминогруппа этого лизина участвует в формировании водородных связей с субстратом и Asp96 другой субъединицы (Miller et al., 2000). Таким образом, убиквитилирование белка по Lys93 и соответственно блокирование его ϵ -аминогруппы будет приводить к полной потере ферментативной активности. Это согласуется с данными литературы о потере активности при замене этого лизина на цистеин (Smiley, Jones, 1992). Кроме того, ODC проявляет свою ферментативную активность в гомодимерном состоянии. Анализ поверхности димера показал, что акцепторный Lys93 находится в глубине активного центра, который сформирован обеими субъединицами ODC (рис. 7).

Таким образом, внедрение убиквитина в область активного центра будет нарушать взаимодействие субъединиц.

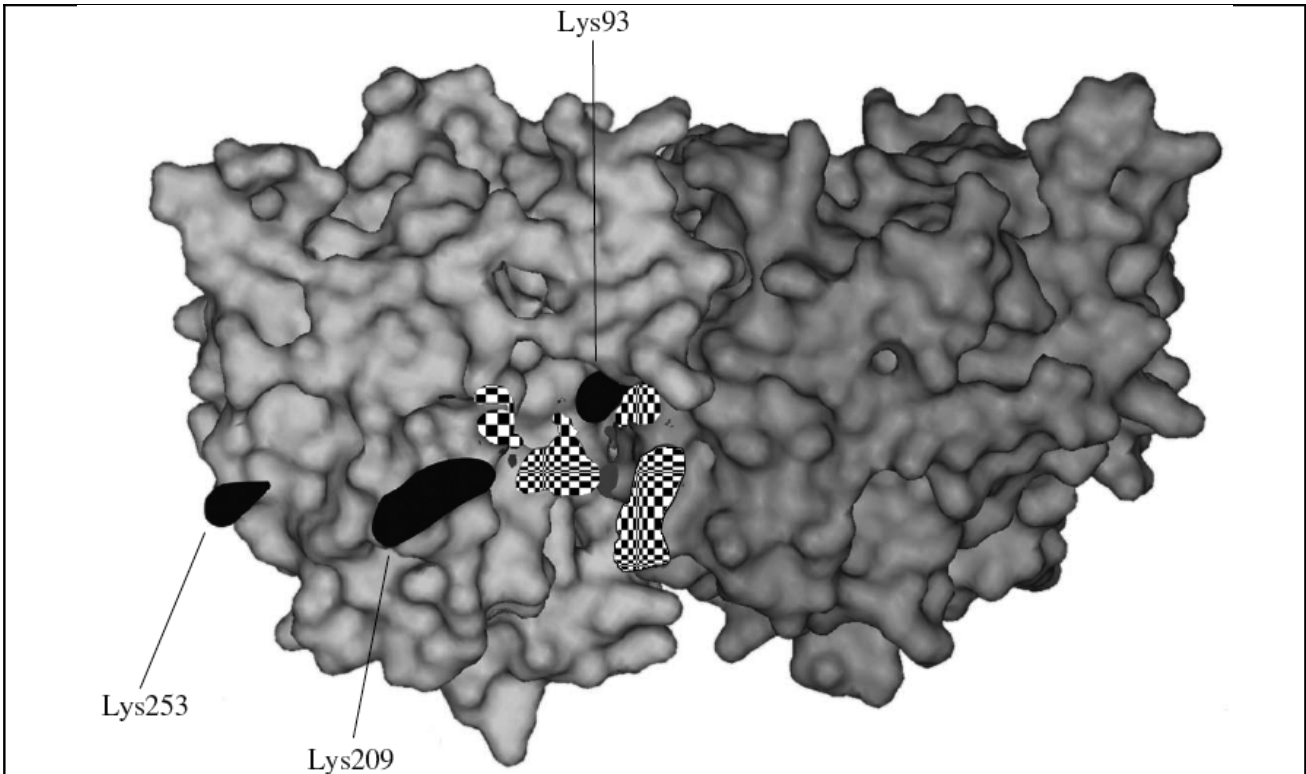
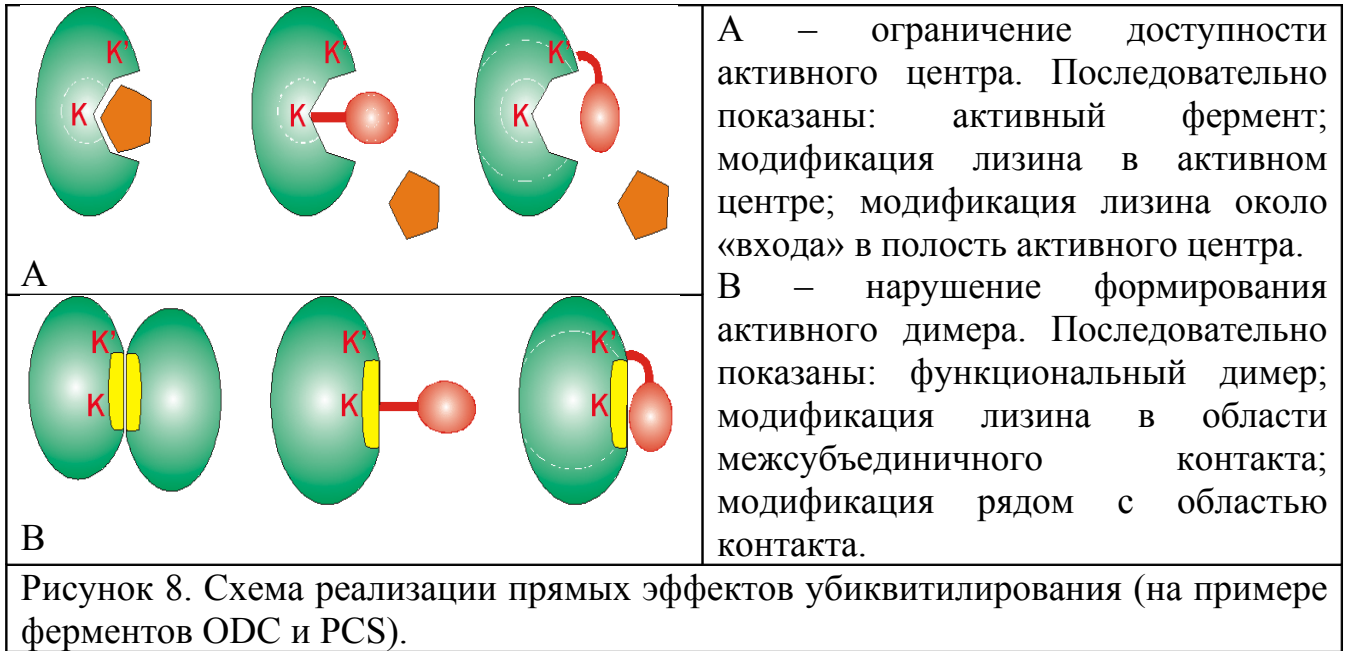


Рисунок 7. Поверхность димера оротидин 5'-фосфат декарбоксилазы (ODC), доступная для растворителя, с отмеченными аминокислотами активного центра и акцепторными лизинами. Две субъединицы ODC отмечены соответственно светло- и темно-серым. Аминокислоты активного центра заштрихованы. Сайты убиквитилирования выделены черным.

Экспонированность 3-х потенциальных акцепторных лизинов в димерной форме ODC убывает в ряду 253–209–93. Экспонированность этих лизинов в мономерной форме практически одинакова. Это позволяет предположить, что Lys93 может быть модифицирован только в мономерной форме ODC. Lys209, который также может убиквитилироваться, находится очень близко к активному центру, и его модификация также может затрагивать связывание субстрата. Lys253 же расположен относительно далеко от активного центра, и его убиквитилирование не может вести к тем же последствиям с точки зрения стерической регуляции.

Проведенный *in silico* анализ выявил следующие прямые эффекты присоединения убиквитина, затрагивающие функциональную активность белков-мишеней:

1. убиквитилирование может стерически блокировать или ограничивать доступность функциональные домены и/или активный центр белка-мишени, как это было показано для ODC и PCS (рис. 8,А);
2. также оно может препятствовать гомо-олигомеризации, как в случае с ODC и PCS (рис. 8,В), и влиять на гетерологические взаимодействия белков, мешая связыванию белков-мишеней с их партнерами, как в случае с XIAP и CaM;
3. взаимодействие с белками-партнерами также может нарушаться из-за ограничения конформационной подвижности, что наблюдается на примере кальмодулина.



Весь спектр рассматриваемых эффектов реализуется за счет стерических ограничений, вносимых присоединением к молекуле фермента крупного модификатора. Особенно важно отметить, что для рассмотренных в данной работе белков реализация таких эффектов напрямую зависит от убиквитилирования конкретных остатков лизина, т.е. является сайт-специфичной. Любой из этих эффектов будет вести к падению активности модифицируемого белка. Таким образом, мы предполагаем наличие нового механизма регуляции белков за счет убиквитилирования. Следует отметить, что функциональные нарушения могут предшествовать дальнейшей убиквитин-зависимой трансформации белка-мишени, например, протеасомальной деградации. В то же время представляется вероятным, что влияние убиквитилирования на функцию ряда белков крайне важно с точки зрения регуляции и не зависит от катаболической функции, так как убиквитилирование обратимо. Под действием специфических деубиквитирующих ферментов может происходить отщепление убиквитина от белка-мишени, что в рассматриваемых случаях будет сопровождаться восстановлением функции белков-мишеней.

Наши наблюдения, основанные на использовании биоинформатического подхода, хорошо согласуются с экспериментальными данными об убиквитилировании ряда других белков. В частности, для NO синтазы показано преимущественное убиквитилирование неактивной мономерной формы, по сравнению с каталитически активным олигомером (Bender et al., 2000; Dunbar et al., 2004). Для цитохрома P450 выявлена ко-локализация точки связывания убиквитина и активного центра, причем связывание убиквитина ведет к снижению ферментативной активности (Banerjee et al., 2000). Подобные стерические эффекты описаны также для сумоилирования, т.е. модификации белков убиквитиноподобным белком SUMO. Показано, что сумоилирование белка E2-25K сильно снижает его ферментативную активность (Pichler et al., 2005). При этом модификация не ведет к конформационным изменениям или перекрыванию активного сайта E2-25K, но присоединенный SUMO

перекрывает другой функционально важный участок поверхности белка-мишени, ответственный за специфические белок-белковые взаимодействия. Интересно, что белок E2-25K – классический убиквитин-конъюгирующий фермент E2. В данном случае наблюдается схожесть с механизмом регуляции, предполагаемым нами для Ubc13 в соответствующем разделе данной работы. Таким образом, все приведенные выше данные свидетельствуют о биологической релевантности предлагаемого регуляторного механизма.

ВЫВОДЫ

1. Идентифицирован ряд новых сайтов убиквителирования рецепторного белка EGFR на поздней стадии эндоцитоза. Обнаруженные сайты локализованы в тирозинкиназном (Lys704 и Lys715) и внеклеточном (Lys430) доменах рецептора. Установлено, что С-концевой домен и активность тирозинкиназного домена рецептора необходимы для достижения высокой степени убиквителирования молекулы EGFR.
2. Показано, что дрожжевой убиквитин-конъюгирующий фермент Ubc13 имеет дополнительный, ранее неизвестный сайт автоубиквителирования – Lys14. Модификация по данному сайту не ведет к протеасомальной деградации белка, а имеет регуляторное значение.
3. Продемонстрировано влияние специфичности сайтов модификации на молекулярно-физиологические последствия убиквителирования белков Ubc13, ODC, PCS и XIAP.
4. Предложен новый механизм регуляции функциональных свойств белков-мишеней за счет убиквителирования. Данный механизм реализуется за счет стерических эффектов, вызванных перекрыванием молекулой убиквитина функционально важных зон на поверхности субстрата.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

I. Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК:

1. Chernorudskiy A.L. Prediction of direct effects of protein ubiquitylation using computational analysis / **Chernorudskiy A.L.**, Shorina A.S., Garcia A., Gainullin M.R. // *Biophysics*, 2006. V. 51, S. 1, P. 39-43.
2. Chernorudskiy A.L. UbiProt: a database of ubiquitylated proteins / **Chernorudskiy A.L.**, Garcia A., Eremin E.V., Shorina A.S., Kondratieva E.V., Gainullin M.R. // *BMC Bioinformatics*, 2007. V. 8, N. 1, Article 126.
3. Кондратов К.А. Участие С-концевого домена рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР) в регуляции убиквитинирования рецептора / Кондратов К.А., **Чернорудский А.Л.**, Амосова А.П., Корнилова Е.С. // *Цитология*, 2007. Т. 49, № 9, С. 759-760.

II. Статьи, доклады, тезисы докладов региональных и международных конференций:

1. Chernorudskiy A.L. UbiProt: a tool for the study of protein ubiquitylation / **Chernorudsky A.L.**, Garcia A., Eremin E.V., Gainullin M.R. // Keystone Symposia meeting “Ubiquitin and Signaling”, Taos, New Mexico, USA, February 22-27, 2005. Abstract book, P. 46.
2. Chernorudskiy A.L. Spatial limitations caused by ubiquitylation: analysis of 3D model of yeast peroxisomal citrate synthase-ubiquitin complex / **Chernorudskiy A.L.**, Garcia A., Gainullin M.R. // FEBS Journal, 2005, V. 272, S. 1, P. 106.
3. Чернорудский А.Л. Биоинформатический анализ влияния убиквитилирования на каталитическую активность ферментов / **Чернорудский А.Л.**, Шорина А.С., Гарсия А., Корягин А.С., Гайнуллин М.Р. // XVIII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 7-10 февраля 2006 г., С. 54.
4. Chernorudskiy A.L. Direct influence of ubiquitylation on a target protein activity: “loss-of-function” mechanism revealed by computational analysis / **Chernorudskiy A.L.**, Shorina A.S., Garcia A., Gainullin M.R. // Proceedings of the Fifth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (Eds. N. Kolchanov, R. Hofstadt), V. 1, P. 252-255. Novosibirsk, Russia, July 16–22, 2006.
5. Chernorudskiy A.L. UbiProt: a database of ubiquitylated proteins as a tool for computational analysis of ubiquitylation / **Chernorudskiy A.L.**, Garcia A., Eremin E.V., Shorina A.S., Kondratieva E.V., Gainullin M.R. // A joint meeting of the Genetics Society and the British Societies for the Cell and Developmental Biology, Edinburgh, UK, 29th March - 1st April 2007, P. 102-103.
6. Гайнуллин М.Р. База данных UbiProt: объектно-ориентированный Интернет-ресурс, посвященный убиквитилированным белкам / Гайнуллин М.Р., Гарсия А., **Чернорудский А.Л.**, Шорина А.С., Кондратьева Е.В., Еремин Е.В. // Международная конференция «Рецепция и внутриклеточная сигнализация», 5-7 июня 2007 г., Пущино, С. 12-15.
7. Кондратов К.А. Анализ влияния синтетического ингибитора тирозинкиназы рецептора ЭФР тирфостина AG1478 на фосфорилирование различных тирозиновых остатков рецептора / Кондратов К.А., Амосова А.П., **Чернорудский А.Л.**, Корнилова Е.С. // Международная конференция «Рецепция и внутриклеточная сигнализация», 5-7 июня 2007 г., Пущино, С. 64-66.
8. Chernorudskiy A.L. Ubiprot Database and analysis of protein ubiquitylation for application in pharmacological research / **Chernorudskiy A.**, Garcia A., Eremin E., Shorina-Zhabereva A., Kondratieva E., Gainullin M. // Fourth International Symposium on Computational Methods in Toxicology and Pharmacology Integrating Internet Resources, Moscow, Russia, September 1-5, 2007, P. 88.
9. Chernorudskiy A.L. Direct effects of protein ubiquitylation revealed by computational analysis / **Chernorudskiy A.**, Shorina-Zhabereva A., Garcia A., Gainullin M. // EMBO Conference “Ubiquitin and Ubiquitin-like modifiers in cellular regulation”, Riva Del Garda, Italy, September 22-26, 2007, P. 45.