

ПОДСЕКЦИЯ «БИОХИМИЯ»

Получение и характеристика рекомбинантных Fab фрагментов антител клона 19С7, специфичных к сердечной изоформе тропонина I человека

Альтшулер Е.П. (Москва, lapotok@gmail.com)

Изоформа тропонина I из сердца человека (hcTnI) представляет собой надежный маркер повреждения кардиомиоцитов, сопровождающего такие серьезные сердечно-сосудистые заболевания, как инфаркт миокарда. Моноклональные антитела 19С7, полученные гибридным методом, с высокой аффинностью распознают hcTnI и используются в современных диагностических системах для количественного определения концентрации hcTnI в крови. Таким образом, создание новых и усовершенствование уже существующих диагностических систем такого типа представляет собой актуальную задачу как с фундаментально научной, так и с прикладной биомедицинской точек зрения. Одним из возможных способов модификации диагностических систем является использование рекомбинантных аналогов антител, входящих в их состав. Существенным преимуществом рекомбинантных антител перед антителами, полученными стандартным гибридным методом, является возможность модификаций их последовательности с помощью генно-инженерных методов. Это позволяет изменять такие свойства антител, как аминокислотный состав, аффинность, состав доменов, молекулярный вес, а также сорбционные свойства. Наиболее широко используемыми в диагностических системах рекомбинантными фрагментами антител, сохраняющими все свойства полноразмерных молекул, являются Fab-фрагменты. Таким образом, целью настоящей работы было получение рекомбинантных Fab-фрагментов антител клона 19С7 и изучение их биохимических и иммунохимических свойств.

кДНК Fd фрагмента тяжелой (фТЦ) и легкой цепи (ЛЦ) антител 19С7 со свободным цистеином в С-концевой части, были получены методами обратной транскрипции мРНК, выделенной из клеток гибридомы 19С7, и последующей ПЦР реакции со специфическими праймерами. Полученные фрагменты были встроены в вектор pET23a+ по сайтам рестрикции HindIII и XhoI для независимой экспрессии в клетках штамма BL21pLysS *E. coli*. ЛЦ и фТЦ антител клона 19С7 были экспрессированы в клетках штамма BL21pLysS *E. coli* и идентифицированы методами электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия и иммуноблоттинга с использованием специфических антител к Fab-фрагментам. Для образования дисульфидных связей фТЦ и ЛЦ, выделенные из телец включения, были подвергнуты ренатурации, а фракция иммунохимически активных Fab-фрагментов затем была аффинно-очищена на носителе Sulfolink с иммобилизованным пептидом, идентичным эпитопу антител 19С7. Чистота полученного препарата рекомбинантных Fab-фрагментов составила 80%. С помощью иммуноферментного анализа было показано, что полученные рекомбинантные Fab-фрагменты антител клона 19С7 взаимодействуют с hcTnI и тропониновым комплексом с высокой чувствительностью, сравнимой с чувствительностью антител 19С7, полученных гибридным методом.

Таким образом, в результате нашей работы был получен препарат рекомбинантных Fab-фрагментов антител клона 19С7, которые обладают иммунохимической активностью, сравнимой с активностью антител клона 19С7, полученных гибридным методом.

Автор выражает признательность к.б.н. Д.В. Серебряной, к.б.н. А.В. Березниковой и д.б.н. А.Г. Катрухе за помощь в работе и подготовке тезисов.

Влияние вторичной структуры ДНК на ее копирование при участии комплекса стероид–апоАI

Базалук В.В. (Новосибирск, v_bazaluk@mail.ru)

Механизмы репликации ДНК давно привлекают внимание биохимиков и молекулярных биологов и особенно актуально изучение влияния стрессирующих факторов на этот процесс. Ранее было показано образование комплекса метаболита стероидного гормона тетрагидрокортизола (ТГК) с аполипопротеином АI (апоАI) и его воздействие на вторичную структуру ДНК, которое приводит к образованию одностранных участков.

Способность комплекса апоАI-ТГК активировать копирование изолированной ДНК человека (здоровые добровольцы) или крысы Вистар исследовали с помощью фрагмента Кленова – части ДНК-зависимой ДНК-полимеразы *E. coli* и белкового экстракта из ядер клеток печени крыс (БЯЭ), содержащего все необходимые полимеразы.

ДНК обрабатывали комплексом апоАI-ТГК, инкубировали в условиях реакции копирования, добавляя 6-звенные рэндом-праймеры. Для обнаружения новосинтезированных копий ДНК использовали меченые трифосфаты нуклеозидов. Смесь наносили на 15% ПААГ и проводили электрофорез. С полученных гелей делали радиоавтографы. Количество синтезированных *de novo* фрагментов оценивали при помощи программы BandScan. Было показано, что при мольном соотношении ДНК/комплекс стероид-апоАI (тетрагидрокортизол, андростерон), равном 1:50, синтезируется на 20% больше копий ДНК, чем в отсутствие комплекса. К подобному результату приводят как фрагмент Кленова, так и полимеразы из ядерного экстракта клеток крыс. При дальнейшем повышении концентрации комплекса стероид-апоАI наблюдали ингибирование реакции копирования до практически полного ее отсутствия.

Комплекс кортизол-апоАI не производит подобного эффекта, т.к. число R^{32} -копий ДНК несколько снижается при добавлении этого комплекса в реакционную среду копирования по сравнению с контролем и затем практически не меняется при увеличении концентрации комплекса кортизол-апоАI.

Таким образом, основными компонентами при стимулировании копирования являются аполипопротеин АI – белок липопротеинов высокой плотности и восстановленные формы стероидных гормонов: тетрагидрокортизол, андростерон. Следует отметить, что комплексы стероид-апоАI активируют реакцию копирования ДНК крысы (стероид: ТГК, АС) и человека (стероид – ТГК) на внутренних одностранных участках, образующихся под влиянием этих комплексов, как в гомологичной (ДНК крысы/ДНК-полимераза крысы), так и в гетерологичной (ДНК крысы или человека/ДНК-полимераза *E.coli*) системах.

Таким образом, появление дополнительных одностранных участков в сайтах связывания комплекса стероид-апоАI с ДНК активирует копирование изолированной ДНК и способно на наш взгляд служить инициатором процесса репликации *in vivo* и, тем самым, пролиферации гепатоцитов в условиях стресса.

Автор выражает признательность д.б.н. О.И. Гимаутдиновой, профессору Л.Е. Панину за помощь в подготовке тезисов.

Использование Аламетицина и Луброла WX при определении активности Na,K-АТФазы в микросомальных фракциях из почек суслика *Spermophilus undulatus*

Басевич Е.В. (Москва, basevichev@mail.ru)

Некоторые мелкие млекопитающие, такие как соня, суслик, тушканчик, сурок, проводят зиму в состоянии глубокого оцепенения. Зимняя спячка таких животных (гибернация) является природным приспособлением, позволяющим животным выжить в условиях низких температур и недостатка кормов и воды. При этом наблюдается сложный

комплекс физиологических и биохимических перестроек, направленных на уменьшение энергозатрат и снижение скорости метаболизма, и приводящий, как следствие, к снижению температуры тела до 1–2°C. При этом физиологические процессы в организме полностью не «замирают», и осуществляется, хотя и на низком уровне, обмен веществ. Поэтому сохраняется необходимость периодически выводить накапливающиеся метаболиты при кратковременных пробуждениях между баутами спячки. Таким образом, выделительная система во время гибернации продолжает функционировать в замедленном режиме, а основным потребителем АТФ в почках становится Na,K-зависимая аденозинтрифосфатаза, литературные данные про активность которой в условиях гипометаболизма противоречивы. С целью исследовать активность Na,K-АТФазы в нативных мембранах были выделены микросомальные фракции из медуллярного слоя почек типичного гибернатора – суслика *Spermophilus undulatus*. Поскольку в различных микросомальных препаратах структура мембран может быть разной, что влияет на ферментативную активность, при измерении активности Na,K-АТФазы были использованы известные активаторы, действующие на мембраны и позволяющие стандартизовать препараты. При добавлении в пробу различных количеств *Луброла WХ* (эффективного солибилизатора микросомальной Na,K-АТФазы) была определена концентрация этого вещества (0,025%), при которой наблюдалось увеличение активности в 3 раза. При более высоких концентрациях этого вещества в пробе активационный эффект оказывался меньше. Поскольку при работе с лубролом в некоторых случаях требовалась предварительная инкубация микросомальных препаратов с этим поверхностно-активным веществом длительностью до 20 минут, то был использован каналобразующий активатор *Аламетицин*, не требующий предынкубации, что удобнее при стандартизации препаратов. Эффект аламетицина при концентрации 10 мкг/мл оказался таким же, как луброла в оптимальной концентрации, т.е. наблюдалось увеличение активности в 3 раза. При более высоких концентрациях аламетицина в пробе его активационный эффект также оказывался меньше. Было установлено, что эффективность аламетицина на фоне луброла, равно как и наоборот, меньше по сравнению с опытами, где они использовались по отдельности. При определении активности Na,K-АТФазы в микросомальных фракциях из почек активных летних и спящих зимних сусликов в присутствии аламетицина было установлено, что в препаратах из почек летних животных активность фермента в 1,5 раза выше по сравнению с препаратами из почек зимних животных. Такое соотношение активностей Na,K-АТФазы в препаратах из почек летних и зимних сусликов сохраняется при изменении температуры от 5 до 37°C. Таким образом, установлено, что при гибернации в почках не происходит изменений, способствующих более активной работе Na,K-АТФазы при низких температурах по сравнению с функционированием фермента в почках активных животных.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 08-04-00823.

Антитела крови больных системной красной волчанкой, гидролизующие основной белок миелина

Безуглова А.М. (Новосибирск, bezukaf@mail.ru)

Исследования последних десятилетий привели к открытию новой функции иммуноглобулинов – их способности катализировать большое число различных химических реакций.

Целью работы является детальное изучение протеолитической активности абзимов крови больных рассеянным склерозом (РС) и системной красной волчанкой (СКВ)

Получены гомогенные препараты IgG из плазмы крови больных РС, СКВ и здоровых доноров. Показано, что кровь больных СКВ, в отличие от здоровых доноров, содержит IgG, гидролизующие основной белок миелина (ОБМ) и четыре соответствующих ему

олигопептида различной последовательности, причем каталитический центр расположен на легких цепях антител.

Для оценки относительной удельной активности АТ в качестве субстрата использовали 19-членный олигопептид. При определении оптимальных условий обнаружено, что АТ СКВ эффективно гидролизуют 19-членный пептид в достаточно широком диапазоне значений рН, проявляя максимальную активность при рН 7,5–8,5.

Абзимы больных СКВ в большей степени представлены металлопротеазами и в меньшей – сериновыми протеазами; они существенно отличаются по свойствам от абзимов крови больных РС.

Протеолитическая активность поликлональных абзимов больных СКВ зависит от ионов металлов и возрастает в порядке: $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что абзимы могут содержать фракции АТ, активация которых происходит в присутствии двух ионов металлов различного типа.

С помощью метода фагового дисплея и библиотеки кДНК легких цепей антител больных СКВ наработан пул клонов, синтезирующих легкие цепи антител. Аффинной хроматографией на ОБМ-сефарозе фаговые частицы, продуцирующие легкие цепи АТ против ОБМ, разделены на девять фракций, отличающихся сродством к ОБМ. Показано, что все легкие цепи, продуцируемые девятью фракциями, активны в гидролизе пептидов, соответствующих ОБМ.

Научный руководитель – д-р хим. наук проф. Г.А. Невинский

Поли-N-винилпирролидон как носитель для иммобилизации липазы

Беленова А.С. (Воронеж, alenca198322@mail.ru)

Поли-N-винилпирролидон является наиболее известным представителем карбоцепных полимеров, имеющих поли-N-виниламидную структуру. Этот полимер занимает особое место среди большого круга водорастворимых полимеров разнообразного строения из-за широкого применения в различных областях науки, техники и медицины. Поли-N-винилпирролидон в водном растворе обладает высокой комплексообразующей способностью к молекулам самого различного происхождения. Этот полимер характеризуется весьма низкой токсичностью и биологической совместимостью.

В связи с возможностью использования липолитических ферментов в пищевой промышленности, медицине и фармации становится необходимым изучение условий иммобилизации липаз на носителях, которые могут применяться в данных отраслях.

Объектом исследования послужила липаза из *Rhizopus niveus*. Определение каталитической активности липазы проводили спектрофотометрическим методом Андерсона – Маккарти. Содержание белка в свободном ферментном препарате определяли методом Лоури, для иммобилизованной на поли-N-винилпирролидоне липазы использовали модифицированный метод Лоури.

Осуществлена иммобилизация липазы на поли-N-винилпирролидоне адсорбционным методом. Показано, что при иммобилизации липазы на поли-N-винилпирролидоне каталитическая активность составляет 79% от активности растворимого фермента.

При исследовании зависимости каталитической активности свободной и иммобилизованной липазы от температуры гидролиза показано, что связывание фермента с носителем приводит к сдвигу оптимальной температуры катализа в сторону более высоких значений с максимальной активностью при 40°C, что на 3°C выше, чем для нативного фермента.

По нашим данным, оптимальное значение рН для свободного фермента составляет 7,0, при иммобилизации оптимум рН не изменяется.

Показано, что при рН в диапазоне от 4,0 до 6,0 каталитическая активность иммобилизованной липазы достоверно выше, чем у нативной липазы при тех же значениях рН.

Очевидно, фермент достаточно прочно связывается с матрицей данного носителя, существенно не изменяя при этом своей каталитически активной конформации, что позволяет считать поли-N-винилпирролидон перспективным сорбентом-матрицей для получения стабильных и высокоактивных биокатализаторов на основе иммобилизованной липазы.

По-видимому, при иммобилизации липазы, характеризующейся наличием в структуре аминокислотных остатков доноров протонов, происходит перезарядка локальных областей молекулы, что способствует увеличению каталитической активности комплекса липаза- винилпирролидон при рН 4,0-6,0

Анализ результатов экспериментов позволяет сделать заключение о том, что поли-N-винилпирролидон является перспективным носителем иммобилизации липолитических ферментов.

Автор выражает признательность профессору, д.б.н. Т.А. Ковалевой за помощь в подготовке тезисов.

Интенсивность окисления белков и липидов в опухолевой ткани при мелкоклеточном и немелкоклеточном раке легкого

Белоногов Р.Н. (Красноярск, ro-x@ya.ru)

Одно из лидирующих мест по распространенности среди онкологических заболеваний в России и мире занимают злокачественные новообразования легких. В ходе развития опухоли важную роль играет воздействие на клетки активных форм кислорода (АФК). Однако выраженность и направленность происходящих изменений практически не изучены. Тем не менее, изучение свободно-радикального окисления в опухолевых клетках представляет определенный интерес для исследователей, поскольку оно участвует в реализации таких процессов, как апоптоз, распознавание клеток лейкоцитами, чувствительность к химио- и радиотерапии и др. В связи с этим, цель данного исследования – оценить интенсивность процессов свободно-радикального окисления белков и липидов в здоровой и опухолевой ткани больных раком легкого при различных гистологических типах заболевания.

На базе Красноярского краевого онкологического диспансера было обследовано 87 больных с раком легкого. Исследовали образцы опухолевой и здоровой ткани легкого, отобранные в процессе хирургического вмешательства. Ткани гомогенизировали, гомогенаты использовали для определения содержания продуктов окисления липидов – диеновых конъюгатов (ДК), малонового диальдегида (МДА) и карбонильных производных белков (КПБ). Определение ДК производили по измерению интенсивности поглощения при длине волны 232 нм в гептановом экстракте липидов. Уровень МДА определяли по его взаимодействию с 2-тиобарбитуровой кислотой, в результате которого образуется окрашенный комплекс, с максимумом поглощения при длине волны 532 нм. Содержание КПБ оценивали спектрофотометрическим определением продуктов реакции окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином при длине волны 370 нм.

Среди гистологических типов рака легкого в литературе как правило противопоставляются мелкоклеточный (МКР) и немелкоклеточный рак легкого (НМКР). НМКР главным образом представлен плоскоклеточным раком легкого (ПКР) и аденокарциномой (АКЛ). В проведенном исследовании при всех гистологических типах наблюдалось снижение интенсивности окисления белков и липидов. Концентрация ДК при ПКР снижается на 33%, при АКЛ – на 26%, при МКР – на 14% по сравнению с контролем. Такая же тенденция изменения концентрации наблюдается для МДА: при

ПКР происходит снижение на 30%, при АКЛ – на 28%, при МКРЛ – на 18% по сравнению со здоровой тканью. Содержание карбонильных производных ниже на 37%, 42% и 25% при ПКР, АКЛ и МКР соответственно по сравнению с клетками здоровой ткани легкого. Отмеченное нами снижение содержания КПБ, ДК и МДА в опухоли говорит об уменьшении интенсивности свободно-радикального окисления. Из полученных результатов видно, что наименьшее снижение степени окислительного повреждения белков и липидов происходит при МКР, который характеризуется наибольшей злокачественностью, быстрым ростом и относительно более высокой чувствительностью к химио- и радиотерапии. Это свидетельствует о возможной роли антиоксидантной системы в развитии устойчивости опухоли к терапевтическим воздействиям. Поскольку АФК также играют определенную роль в развитии апоптоза, можно предположить, что снижение степени свободно-радикального воздействия является одним из вероятных механизмов избегания апоптоза у раковых клеток.

Влияние состояния гипотермии на липидный состав ядер неокортекса крыс

Быкова О.В. (Пушино, lelechek@list.ru)

Естественный гипобиоз (зимняя спячка) у млекопитающих основан на обычных физиологических реакциях организма и сопровождается многократным подавлением физиологических и обменных процессов.

У крыс снижение T тела до $15-20^{\circ}\text{C}$ в условиях гипоксии-гиперкапнии вызывает состояние так называемого холодого наркоза с угнетением подвижности, интенсивности метаболизма и исчезновением электрической активности головного мозга. Из этого состояния животное способно возвращаться к нормотермии, аналогично выходу из состояния естественного гипобиоза. Спячка млекопитающих протекает под контролем ЦНС. Липиды ядер участвуют в регуляции синтеза нуклеиновых кислот и белков при воздействии на организм повреждающих агентов. В связи с этим целью нашей работы было исследование липидного состава ядер нервных клеток коры головного мозга крыс, находящихся в условиях искусственной гипотермии.

Опыты проводили на крысах-самцах массой 190-230 г. Для охлаждения животных использовали метод гипоксии-гиперкапнии методом Игнатьева. Крыс декапитировали согласно принятым в ИБК РАН правилам в состояниях нормотермии (t° тела $37-38^{\circ}\text{C}$) и гипотермии ($15-20^{\circ}\text{C}$). Для выделения ядер нейронов и глии использовали модифицированный метод Томпсона. Чистоту ядерных фракций контролировали методом электронной микроскопии. Экстракцию и очистку липидов проводили в смеси хлороформ/метанол. Липиды разделяли методом ТСХ. Количество фосфолипидов определяли по концентрации фосфора после сжигания, количество холестерина и жирных кислот – по методу Марша. Концентрацию белка определяли методом Лоури. Для статистической обработки использовали T -тест по Стьюденту.

Гипотермия не вызывает достоверных изменений количества фосфолипидов и нейтральных липидов в ткани неокортекса. В ядрах клеток глии выявлено достоверное увеличение количества холестерина и отношения холестерин/фосфолипиды, а также тенденция к увеличению сфингомиелина. Рост отношения холестерин/фосфолипиды свидетельствует о глубоких структурных перестройках ядерной мембраны глии в ответ на воздействие гипотермии/гипоксии/гиперкапнии. Накопление сфингомиелина ядрами глии можно объяснить адаптивным подавлением активности сфингомиелиназы для уменьшения продукции церамидов и защиты нейрональных клеток от апоптоза. Рост количества холестерина и тенденция к накоплению сфингомиелина свидетельствует об активации клеток глии неокортекса крыс под воздействием гипотермии.

Исследования изменений липидного состава неокортекса крыс в состоянии искусственной гипотермии способствуют лучшему пониманию процессов, происходящих при низкотемпературном состоянии млекопитающих.

Благодарю своего научного руководителя Искру Константиновну Коломийцеву за помощь в подготовке тезисов.

Специфичность галектина-8 человека

Вохмянина О.А. (Москва, vokhmyanina.olga@gmail.com)

Галектины – семейство β -галактозидсвязывающих лектинов, содержащих один или два углеводсвязывающих домена. Интерес исследователей к галектинам обусловлен их участием в регуляции клеточного цикла, дифференцировке и апоптозе, межклеточной адгезии и передаче межклеточных сигналов. В зависимости от структурной организации, галектины млекопитающих разделяют на три группы: прото-, химерный и тандемный тип. Галектин-8 относится к тандемному типу, содержит два углеводсвязывающих домена – N-УСД и С-УСД, соединенных пептидным линкером. Галектин-8 экспрессируется на нормальных тканях, эндотелиальных клетках и тимоцитах. Повышенная экспрессия его на опухолевых клетках коррелирует с плохим прогнозом заболевания, что дает возможность использовать галектин в качестве мишени при терапии рака молочной железы, легкого и простаты. В этой связи идентификация клеточных лигандов галектина-8 представляет несомненный интерес. Нами была разработана клеточная модель для исследования углеводной специфичности галектина-8: галектин нагружали на клетки Raji (которые сами не экспрессируют галектины) и исследовали их взаимодействие с полиакриламидными флуоресцеин-мечеными гликоконъюгатами (гликопробами) цитофлуориметрией. Данная клеточная модель позволила выявить: 1) аффинные лиганды галектина-8; 2) вклад линкера в углеводную специфичность; 3) определить, с чем связывается галектин-8 на поверхности клетки. Галектин-8 проявляет высокую аффинность к антигенам группы крови, содержащим остаток Fuc [H тип 2 – $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta$] и $\text{GalNAc}\alpha$ [A тип 2 – $\text{GalNAc}\alpha 1-3(\text{Fuc}\beta 1-2)\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$] при коровом остатке LacNAc. Олиголактозамины связываются с галектином-8 слабее, чем с галектинами прото- и химерного типа. 3'-О и 6-О-сульфаты LacNAc, а именно 3'OSuLe^c и 6OSuLacNAc проявляют аффинность к клеточному галектину-8, в то время как в клеточной системе не взаимодействуют с галектинами человека прото- и химерного типа. В твердофазной системе было показано, что за связывание с сульфатами отвечает С-домен галектина-8, а с олиголактозаминами – N-УСД. Увеличение длины линкера, соединяющего два УСД, галектина отрицательно влияет на связывание белка с олигосахаридами. В экспериментах с ферментами и ингибитором биосинтеза N-цепей было показано, что галектин-8 связывается на клетках с 3'-сиалозид и бета-галактозидтерминированными углеводными цепями. Кроме того, галектин-8 может быть маскирован на клетках 3'-сиалозидами и бета-галактозидами. Так, десИАлирование с последующим бета-дегалактозилированием клеток, нагруженных галектином-8, приводит к увеличению связывания с ними LacNAc. По-видимому, маскировка регулирует функциональную активность галектинов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 07-04-00969). Автор выражает признательность к.х.н. Е.М. Рапопорт за помощь в подготовке тезисов.

Состояние про и антиоксидантной системы в эритроцитах и плазме крови больных раком почки

Герасименко М.Н. (Красноярск, mgera_08@mail.ru)

Рак почки встречается в 3% от всех онкологических новообразований и занимает 10 место по уровню заболеваемости у взрослых. Среди всех впервые выявленных злокачественных образований почки почти 85% составляет аденокарцинома или

почечно-клеточный рак. Операция является основным методом лечения рака почки. Наиболее часто выполняется радикальная нефрэктомия.

Целью данной работы была оценка интенсивности процессов перекисного окисления липидов и состояния глутатионового звена антиоксидантной системы в эритроцитах и плазме крови больных раком почки до операции и после.

На базе красноярского Краевого онкологического диспансера проведены динамические наблюдения за больными местно-распространенным почечноклеточным раком (n=48). Наблюдения проводились до хирургического лечения, а так же первые, третьи, пятые и седьмые сутки после радикальной нефрэктомии. Группу контроля составили 15 практически здоровых людей.

Интенсивность перекисного окисления липидов оценивалась по концентрациям малонового диальдегида и диеновых конъюгатов. Для оценки состояния глутатионового звена антиоксидантной системы измерялась активность глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы, глутатионредуктазы, а так же содержание восстановленного глутатиона. В работе использованы статистические приемы подсчета медианы, определения 25 и 75 перцентеля с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0. Достоверность полученных данных оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, с достоверностью $p < 0,05$.

В ходе исследования было установлено, что содержание диеновых конъюгатов как в плазме, так и в эритроцитах больных до операции (0,54 ммоль/л и 1,44 мкмоль/г Hb) превышало таковое у здоровых людей (0,36 ммоль/л и 0,74 мкмоль/гHb). Так же отмечено высокое содержание первичного продукта перекисного окисления липидов на седьмые сутки после операции (0,81 ммоль/л и 2,44 мкмоль/гHb) (относительно контроля $p \leq 0,05$). При исследовании содержания малонового диальдегида в плазме крови достоверных различий с контролем, равно как и резких колебаний концентрации обнаружено. Тогда как в эритроцитах малоновый диальдегид превышал контрольные величины (7,42 нмоль/гHb) как до операции (8,67 нмоль/гHb), так и после (11,97 нмоль/г Hb на пятые сутки) ($p \leq 0,05$). Концентрация восстановленного глутатиона, до операции (6,44 мкмоль/гHb) не имея достоверных различий с таковой у здоровых людей (5,99 мкмоль/гHb), незначительно возрастает в первые сутки после нее (7,30 мкмоль/гHb) ($p \leq 0,05$). Активность глутатионпероксидазы плазмы и эритроцитов практически не отличается от контрольных показателей в течение всего периода наблюдения. Глутатион-S-трансфераза плазмы крови и эритроцитов имеет повышенную активность в течение всего периода лечения по отношению к контрольным показателям (41,6 мкмоль/мин*мл и 5,44 ммоль/мин*гHb) ($p \leq 0,05$). Активность глутатионредуктазы повышена по сравнению с контролем (1,81 мкмоль/мин*гHb). Не имея достоверных изменений между этапами лечения, она остается повышенной в течение всего периода наблюдения ($p \leq 0,05$).

Выявлены высокие концентрации продуктов перекисного окисления липидов в конечный период лечения. Так же выявлена повышенная активность глутатион-S-трансферазы плазмы крови и глутатионредуктазы. Все это говорит о дисбалансе про и антиоксидантной системы.

Исследование роли цАМФ в реализации гепатопротекторного действия 9,11-этан-аналогов простагландинов группы H *in vitro*

Губич О.И. (Минск, Беларусь, Hubich_Oksana@tut.by)

Ключевая роль лабильных эндоперекисей простагландинов (ПГ) в биосинтезе классических ПГ и тромбоксанов вызывает интерес к созданию и изучению биологических свойств их стабильных синтетических производных. Как свидетельствуют многочисленные данные литературы, в отличие от лабильных ПГ

группы Н, их 9,11-этан-аналоги химически стабильны и перспективны для использования в качестве антиагрегантов, цитопротекторов и иммуностимуляторов.

Целью данной работы явилось изучение гепатопротекторных свойств 9,11-этан-аналогов ПГ группы Н на клеточной модели повреждения печени 0,5 % CCl₄, а также анализ роли цАМФ в реализации защитных эффектов простаноидов.

В работе были использованы соединения, синтезированные в Лаборатории химии простагландинов ИБОХ НАН Беларуси. Величину цитопротекторного эффекта простаноидов (10^{-10} – 10^{-6} моль/л) оценивали по их способности предотвращать утечку лактатдегидрогеназы, кислой фосфатазы и глутаматдегидрогеназы из гепатоцитов, обработанных 0,5% CCl₄.

Установлено, что используемые простаноиды в присутствии четыреххлористого углерода проявляют дозозависимый защитный эффект. Максимально эффективными оказались концентрации, равные $1 \cdot 10^{-9}$ – $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л. По силе протекторного действия исследуемые ПГ образуют следующий ряд активности: LP-167 (-75,7% к контролю) > LP-165 (-61,4%) >> LP-172 (-39,1%) > LP-175 (-23,1%) > LP-147 (-11,7%) >> LP-171 = LP-120 = LP-25 ≈ 0.

Максимальный эффект проявлял аналог LP-167, содержащий тиольный фрагмент в 16-ом положении ω-цепи. Появление в структуре простаноида енонового радикала (LP-165) или атома азота в 13 положении ω-цепи (LP-172) приводило к снижению защитных свойств соединения.

Необходимо отметить, что действие данных простаноидов значительно превосходило аналогичные эффекты широко используемых гепатопротекторов флавоноидной (силимарин) и куркуминоидной (куркумин) природы, снижавших токсическое действие CCl₄ на 30,5 и 22,8 %, соответственно.

Несмотря на реализацию большинства эффектов природных ПГ через аденилатциклазный каскад и способность цАМФ стабилизировать плазматические мембраны клеток, действие простаноидов группы Н не коррелировало с изменением в их присутствии внутриклеточного уровня цАМФ.

Таким образом, в ходе выполнения работы установлено цитопротекторное действие синтетических 9,11-этан-аналогов ПГН, реализуемое по цАМФ-независимому пути. Структура данных соединений может быть взята за основу для создания фармакологических средств гепатопротекторного действия.

Работа выполнена в рамках гранта ГПОФИ Республики Беларусь “Физиологически активные вещества” (№ ГР 20063147).

Механизм взаимодействия лактоферрина человека с неспецифическими олигодезоксирибонуклеотидами

Гущина Т.А., Соболева С.Е. (Новосибирск, stepnogorsk85@rambler.ru)

Лактоферрин (ЛФ) – железо-связывающий гликопротеин, содержащийся в высокой концентрации в молоке, а также других эпителиальных секретах, гранулах нейтрофилов и плазме крови. Белок обладает антираковой активностью, проявляет антибактериальные, противовирусные и антигрибковые свойства, значительно увеличивает активность антибактериальных и противогрибковых препаратов. Лактоферрин относится к белкам неспецифического иммунитета, он участвует в защитных реакциях и регулирует функции иммунокомпетентных клеток. Белок взаимодействует с ДНК и РНК, полисахаридами, а также гидролизует их. Число различных биологических функций, обнаруженных у ЛФ, постоянно возрастает. Для понимания возможных причин исключительной полифункциональности ЛФ необходимо детальное изучение процесса взаимодействия белка с такими жизненно важными молекулами, как ДНК и РНК. В связи с этим целью данной работы являлось исследование ферментативных свойств лактоферрина при взаимодействии его с олигонуклеотидами.

В ходе работы впервые был проведен детальный анализ влияния неспецифических олигодезоксирибонуклеотидов ($d(pN)_n$) на комплексообразование ЛФ со специфическим олигонуклеотидом (TAGAAGATCAAA). Показано, что белок эффективно взаимодействует с 8–10 звеньями неспецифического олигонуклеотида, расположенными в пределах белковой глобулы. Увеличение длины неспецифических $d(pN)_n$ на одно звено приводит к возрастанию их сродства к белку в 1.93–2.35 раза за счет аддитивных контактов фермента с различными структурными элементами ОН. Основной вклад в сродство одноцепочечных олигонуклеотидов к ЛФ вносят слабые электростатические взаимодействия. В тоже время белок хуже взаимодействует с более гидрофобными $d(pA)_n$, чем с менее гидрофобными $d(pC)_n$ и $d(pT)_n$. Можно предположить, что ЛФ взаимодействует с цитозином и тиминном не посредством неспецифических гидрофобных контактов, а образует специфические водородные связи.

Работа поддержана Программой «Фундаментальные исследования и высшее образование» РФ (РНИ.2.2.2.3.16036) и BRNE-fellowship 2007 (Y5-B-08-11).

Биохимические механизмы повреждения слизистой оболочки желудка крыс на действие стрессового фактора

Двореценко Е.А. (Киев, Украина, k21@univ.kiev.ua)

Нарушение метаболизма под действием биосоциальных факторов оказывает разрушительное действие на здоровье и приводит к тяжелым последствиям, которые проявляются патологическими изменениями органов и систем организма.

Целью наших исследований было изучить биохимические механизмы патогенеза клеток слизистой оболочки желудка на действие стресса.

В исследованиях использовали крыс линии Вистар весом 180–220 г. В экспериментах создавали модель иммобилизационного водоиммерсионного холодового стресса. Получение общей фракции клеток слизистой оболочки желудка проводили по методу Таирова. Содержание диеновых конъюгатов определяли в гептан-изопропанольном экстракте спектрофотометрическим методом, шиффовых оснований – флуориметрическим методом, содержание ТБК-активных продуктов – по реакции с тиобарбитуровой кислотой. Активность супероксиддисмутазы определяли с использованием нитросинего тетразолия, оценку каталазной активности проводили по Королюк. Анализ общего состава белков осуществляли при помощи электрофореза в 10% полиакриламидном геле по методу Леммли. Для оценки электрофореграмм использовали программу TotalLab 1.10. Разделение и количественное определение адениннуклеотидов проводили методом тонкослойной хроматографии на силуфоловых пластинах. Для статистической обработки результатов использовали t-критерий Стьюдента.

Установлено, что при стрессовом воздействии в эпителиоцитах желудка возрастает уровень продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ): первичных продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов) – в 1,6 раза, промежуточных продуктов ПОЛ (ТБК-активных продуктов) – в 2,7 раза и конечных продуктов ПОЛ (шиффовых оснований) – в 1,5 раза относительно контроля. При исследовании активности ферментов антирадикальной защиты показано, что при стрессе активность супероксиддисмутазы снижается на 45%, при этом активность каталазы увеличивается на 38%.

При изучении общего белкового состава клеток слизистой оболочки желудка крыс, подвергавшихся воздействию стресса, установлено деградацию фракций белков с молекулярной массой 89 и 95 кДа.

Показано, что при действии стрессового фактора на крыс в общей фракции клеток слизистой оболочки желудка снижается содержание АТФ и АДФ, соответственно, на 20% и 28%, при этом повышается уровень АМФ – на 41% относительно контроля.

Полученные результаты проведенных исследований показали, что при действии на организм стрессового фактора в общей фракции клеток желудка крыс наблюдается смещение окислительно-антиоксидантного равновесия в сторону активации перекисного окисления липидов, что сопровождается снижением активности супероксиддисмутазы, изменением общего состава белков и нарушением энергетического баланса.

Влияние антител к ДНК на культивирование нейтрофилов человека *in vitro*

Иванова В.В. (Казань, fairybloom@rambler.ru)

Увеличение заболеваемости системной красной волчанкой (СКВ, хроническое, аутоиммунное заболевание соединительной ткани), тяжелый характер течения, высокий процент инвалидизации определяют медицинскую и социальную значимость данной проблемы. Этиология и механизмы заболевания СКВ остаются неясными. Предполагают, что основной причиной развития СКВ является повышенное содержание в крови больных антител (АТ) к ДНК класса IgG, которые способны проникать в различные клетки и ядра, вызывая при этом их морфологические и функциональные изменения. Но до настоящего времени истинная роль антител к ДНК класса IgG в патогенезе СКВ до конца не выяснена.

Поскольку нейтрофилы являются неотъемлемым компонентом иммунной системы, то их функциональные изменения также могут приводить к развитию патологических процессов. Цель работы: исследование и оценка влияния антител к нативной ДНК класса IgG на жизнеспособность и метаболизм нейтрофилов человека *in vitro*.

Известно, что патологические АТ к ДНК класса IgG могут отличаться по физико- и иммунохимическим свойствам. В результате работы из сывороток крови здоровых доноров и больных СКВ на стадии обострения выделено по шесть субфракций антител класса IgG к нДНК, различающиеся по заряду и сродству к аффинному сорбенту – нДНК-целлюлозе.

Для исследования взаимодействия полученных высокоочищенных АТ класса IgG и сывороточных антител на нейтрофилы (гранулоциты выделяли по оптимизированной методике Долгушина И.И. на двойном градиенте плотности фиколл-верографина (1.095 и 1.077 г/мл) проводили их инкубацию в 96-луночных планшетах в течение 24 ч, 37°C, 0.5% CO₂. После инкубации оценивали: выживаемость клеток в камере Горяева методом исключения трипанового синего; потребление глюкозы клетками глюкозооксидазным методом; выделение перекиси водорода определяли колориметрически с использованием пероксидазы хрена; фагоцитарную активность нейтрофилов с окрашиванием по Романовскому и микроскопированием; изменение молекулярной массы нуклеиновых кислот нейтрофилов методом электрофореза в агарозном геле.

АТ сыворотки крови больного СКВ в активной стадии приводят к гибели нейтрофилов (гранулоцитов), что сопровождается усилением потребления глюкозы из среды и нормальным выделением перекиси водорода. Вероятно, действие этих антител отлично от действия ДНКазы и нормальных АТ на нейтрофилы донора.

Очищенные АТ к ДНК в зависимости от заряда и сродства к ДНК оказывают заметное влияние на жизнеспособность и метаболизм нейтрофилов здорового донора *in vitro*, приводят к биохимическим и морфологическим изменениям клеток, которые могут вносить вклад в патологический процесс. АТ к ДНК больных СКВ приводят к гибели нейтрофилов, увеличивают потребление глюкозы из среды, изменяют выделение перекиси в зависимости от субфракции и, в целом, не влияют на фагоцитарную активность нейтрофилов здорового донора. ДНК, выделенная из культивированных гранулоцитов, остается высокомолекулярной, и видимых изменений электрофоретическим методом не обнаружено.

Результаты исследования показали, что АТ к ДНК гетерогенны и обладают широким спектром активностей, тем самым, по-разному влияя на метаболизм нейтрофилов *in*

vitro. В дальнейшем планируется исследовать взаимодействия антител к ДНК с мембранными рецепторами эукариот и механизм проникновения АТ внутрь клетки.

Мутация Lys141Glu (K141E) дестабилизирует малый белок теплового шока Hsp22 и снижает его шапероноподобную активность

Казаков А.С. (Москва, fenixfly@yandex.ru)

Малые белки теплового шока (sHsp), предотвращающие аморфную агрегацию белков, играют важную роль в защите клеток от гибели в условиях стресса. Семейство sHsp человека насчитывает около 10 различных представителей, среди которых белок Hsp22 (HspB8, H11) является одним из наименее изученных. Было высказано предположение, что Hsp22 относится к семейству белков с разупорядоченной третичной структурой (“intrinsically disordered proteins”). Известно, однако, что мутация K141E в молекуле Hsp22 сопровождается тяжелым наследственным заболеванием – амиотрофией Шарко-Мари-Тута II типа. Цель наших исследований состояла в том, чтобы выяснить влияние этой мутации на структуру Hsp22 и на его шапероноподобную активность (т.е. способность предотвращать аморфную агрегацию белков при их денатурации в условиях стресса).

Методом аналитического ультрацентрифугирования показано, что как Hsp22, так и его точечный мутант K141E находятся в растворе в равновесии мономер↔димер; это было подтверждено и методом химического «сшивания» глутаровым альдегидом. В отличие от большинства других sHsp, ни Hsp22, ни его точечный мутант K141E не образуют крупных олигомеров, причем не только при комнатной температуре (20°C), но и при 45°C. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) установлено, что плавление белка происходит с очень низкой кооперативностью в широком диапазоне температур (от 25 до 75°C); при этом с трудом выявляется тепловой переход с максимумом при 51,8°C и очень низкой энтальпией (~15 kJ/mol), значение которой много меньше, чем у других sHsp, исследованных методом ДСК. Сравнение термостабильности Hsp22 и его точечного мутанта путем измерения температурных зависимостей спектров собственной триптофановой флуоресценции показало, что мутация K141E снижает температуру полуперехода на ~6°C (с 57°C до 51°C). Эти данные хорошо согласуются с результатами исследований параметров денатурации белка с применением мочевины в качестве денатурирующего агента. Так, концентрация мочевины, необходимая для полуперехода из нативного состояния в денатурированное, для Hsp22 дикого типа составляла 1,94 М, тогда как для его точечного мутанта K141E она снижалась до 1,3 М. Исследование шапероноподобной активности Hsp22 и его точечного мутанта с использованием филаментов F-актина в качестве белка-субстрата показало, что мутация K141E заметно снижает способность Hsp22 подавлять агрегацию F-актина, вызываемую его тепловой денатурацией. При этом Hsp22 и его точечный мутант подавляют тепловую агрегацию F-актина значительно слабее, чем другие sHsp, исследованные в тех же условиях (Hsp27, Hsp20). По-видимому, это обусловлено менее плотной упаковкой молекул Hsp22 по сравнению с другими sHsp и меньшим количеством гидрофобных кластеров на их поверхности (особенно при повышении температуры), что показано в опытах с гидрофобным зондом bis-ANS.

На основании полученных данных сделан вывод, что точечная мутация K141E оказывает заметное дестабилизирующее влияние на молекулу Hsp22 (по-видимому, преимущественно на ее α -кристаллиновый домен), что приводит к снижению шапероноподобной активности Hsp22 и может быть одной из причин развития тяжелых наследственных заболеваний. Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках грантов РФФИ (гранты № 07-04-00115 и № 06-04-48343).

Исследование олигомерных форм адипонектина с помощью моноклональных антител

Катруха И.А. (Москва, katrukhai@mail.ru)

Адипонектин является белковым гормоном, секретируемым в жировой ткани и кардиомиоцитах. Данный белок оказывает влияние на углеводный и липидный обмены, участвует в регуляции кровяного давления, предотвращает возникновение воспалительных процессов в эндотелии кровеносных сосудов, смягчает повреждения сердечной мышцы, возникающие при ишемии и реперфузии.

Аминокислотная последовательность адипонектина включает 244 аминокислотных остатка и характеризуется высокой степенью гомологии с такими белками, как коллагены VIII и X типа, фактор комплемента c1q. Структурно, но не по первичной последовательности адипонектин похож на маннансвязывающий белок гепатоцитов, сурфактант легких, TNF α . В крови адипонектин присутствует в виде гомоолигомерных комплексов (тримеров, гексамеров и высокомолекулярных комплексов), кроме этого данный белок способен образовывать гетеромерные комплексы с некоторыми белками плазмы крови, в том числе с цитокинами и факторами роста.

В различных работах была показана отрицательная корреляция концентрации адипонектина в крови с такими заболеваниями, как метаболический синдром, диабет II типа, ожирение, инфаркт миокарда, что говорит о возможности использования данного белка для предсказания развития диабета II типа. В недавнее время установлено, что концентрация высокомолекулярного адипонектина в крови больных достовернее коррелирует с риском возникновения диабета II типа, чем уровень тотального (суммарная концентрация всех олигомеров) адипонектина.

С целью изучения свойств адипонектина в сыворотке крови человека нами была получена панель моноклональных антител, специфически взаимодействующих с адипонектином. В ходе дальнейшей работы были отобраны 2 пары моноклональных антител (пары 20-23* и 36-27*), способных, при использовании в ИФА сэндвич-типа, с высокой чувствительностью детектировать адипонектин в сыворотке крови. Методом гель-фильтрации с последующим ИФА показано, что пара 36-27* взаимодействует со всеми олигомерными формами адипонектина крови человека, в то время как пара 20-23* взаимодействует преимущественно с высокомолекулярной формой белка.

В процессе изучения взаимодействия антител с адипонектином с помощью методов ИФА, иммуноблоттинга и масс-спектропии было показано, что в крови часть адипонектина присутствует в виде комплексов с галектин-3-связывающим белком, сывороточным альбумином и фактором комплемента c1q. Показано, что в образовании комплекса с альбумином участвует низкомолекулярная форма адипонектина.

С использованием метода двумерного электрофореза в присутствии ДТТ и мочевины и последующего иммуноблоттинга установлено, что адипонектин представлен в крови в виде 5 изоформ, имеющих одинаковую молекулярную массу, но различающихся по заряду. Показано что четыре изоформы присутствуют во всех трех олигомерных формах, в то время как пятая характерна только для тримера адипонектина и отсутствует в гексамере и высокомолекулярной форме белка.

Окислительное фосфорилирование в мембранах суббактериальных частиц

Paracoccus denitrificans

Кежарикова К.А. (Москва, Karibok@gmail.com)

Широко принято, что механизм синтеза АТФ, катализируемого Fo-F1-АТФ синтетазой, является обращением последовательности отдельных стадий гидролиза нуклеотида. Однако существование однонаправленных ингибиторов (AMP-PNP), а также явление ADP·Mg²⁺ - зависимого торможения гидролазной активности АТФазы

послужили предпосылками к возникновению гипотезы о существовании двух форм фермента – синтетазной и гидролазной. Процесс окислительного фосфорилирования менее изучен, нежели механизм гидролиза АТФ, что связано с необходимостью проводить изучение на прочно-сопряженном мембранном препарате. Наиболее удобным объектом для такого изучения является почвенная бактерия *Paracoccus denitrificans*, сопрягающая мембрана которой по многим свойствам схожа с внутренней мембраной митохондрий млекопитающих. Целью нашей работы было исследование окислительного фосфорилирования в мембранах суббактериальных частиц *Paracoccus denitrificans*.

Было показано, что начальная скорость окислительного фосфорилирования, катализируемого прочно-сопряженными суббактериальными частицами *Paracoccus denitrificans*, имеет гиперболическую зависимость от концентрации субстратов, АДФ и неорганического фосфата (Pi). Определены величины констант Михаэлиса для АДФ и Pi, которые составляют 7-8 мкМ и 70-120 мкМ, соответственно. Показано, что снижение величины трансмембранного электрохимического протонного градиента приводит к параллельному уменьшению как величины V_{max} реакции синтеза АТФ, так и величин констант Михаэлиса для субстратов реакции. Таким образом, установлено бесконкурентное влияние трансмембранного электрохимического протонного градиента на связывание фермента с субстратами реакции, АДФ и Pi. Порядок связывания субстратов в реакции окислительного фосфорилирования определен как неупорядоченный. Основываясь на полученных результатах, предложена кинетическая схема протекания окислительного фосфорилирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 08-04-00594.

Изменение изоформ цитохрома P-450 в микросомной фракции карциномы Герена при действии противоопухолевого препарата

Кеца О.В. (Черновцы, Украина, ketsa80@mail.ru)

Известно, что окисление субстратов в организме катализируется изоформами цитохрома P-450 и соотношение образования продуктов реакций может служить показателем соотношения изоформ цитохрома P-450. С другой стороны, влияние введения разных лекарственных препаратов может по-разному действовать на состояние монооксигеназной системы, а в частности, на фракционный состав белков. Введение противоопухолевых препаратов, во-первых, может приводить к индукции изоформ цитохрома P-450, к изменению их соотношения и как следствие – к изменению метаболизма ксенобиотиков. Во-вторых, противоопухолевые препараты могут дезорганизовать компоненты монооксигеназной системы, в результате образования более токсичных активных метаболитов.

Учитывая выше изложенное целью работы было исследовать белковый состав и охарактеризовать изоформы цитохрома P-450 микросомной фракции карциномы Герена крыс на разных этапах онкогенеза и при действии липосомного средства гидробромид (5',6'-бензкумароил-3')-метиламиноурацила (ЛБКУ).

Результаты электрофоретического разделения белков микросомной фракции свидетельствуют о том, что противоопухолевое средство БКУ в липосомной форме вызывает образование белковой полосы с мол. массой 86 кДа в микросомной фракции карциномы Герена на 14-е сутки эксперимента в сравнении с крысами-опухоленосителями, которым не вводили вышеупомянутое средство.

Отсутствие белков из мол. массами 78, 69, 33, 27 кДа может указывать на то, что эти белки являются одним из источников образования белковых агрегатов. Следует отметить, что при этом также активируются процессы липопероксидации в микросомной фракции карциномы Герена при действии ЛБКУ, что может быть предпосылкой как образования высокомолекулярных белковых комплексов, так и

низкомолекулярных белков, в результате протеолиза поврежденных протеинов эндоплазматического ретикулума.

Фракционный состав белков микросом в пределах мол. масс, где располагаются изоформы цитохрома P-450 также изменяется. Введение БКУ в липосомной форме приводит к индукции синтеза изоформ цитохрома P-450 с мол. массами 56 и 53 кДа, тогда как применение немодифицированной формы БКУ приводит к образованию белковой полосы из мол. массой 56 кДа. Вероятно, ЛБКУ в большей концентрации попадает в опухоль, чем его немодифицированная форма, и приводит к интенсивному синтезу изоформ гемопротейна. Установленный факт может лежать в основе обнаруженной нами повышенной гидроксилазной активности цитохрома P-450 в микросомной фракции карциномы Герена, при действии исследуемых средств.

На терминальных этапах онкогенеза исследуемое противоопухолевое средство деструктивно влияет на белковый состав микросомной фракции, поскольку в микросомной фракции карциномы Герена снижается активность цитохрома P-450, в то же время на электрофореграммах отсутствуют белки, соответствующие изоформам цитохрома P-450.

Таким образом, введение ЛБКУ усиливает гидроксилазную активность энзима, за счет усиленного синтеза его изоформ с мол. массами 56 и 53 кДа в период интенсивного роста карциномы Герена, что способствует образованию активных метаболитов, деструктивно действующих на опухолевую ткань. В стационарную фазу онкогенеза введение ЛБКУ приводит к дезорганизации монооксигеназной системы опухоли.

Вовлечение процессов перекисного окисления липидов мембран гиппокампа и неокортекса крыс в адаптивные эффекты гипоксического preconditionирования

Кислин М.С. (Санкт-Петербург, Kislin_m@mail.ru)

Свободно радикальные процессы зачастую обуславливают развитие патологических процессов в клетках, однако, при невысокой интенсивности, они способны инициировать эволюционно сложившиеся и генетически детерминированные мобилизующие механизмы приспособительных реакций нервных клеток, направленные на повышение их устойчивости к возможному последующему повреждающему действию неблагоприятных факторов среды, таких как гипоксия. Особое значение при этом приобретает баланс про- и антиоксидантных систем, наилучшим образом находящий своё отражение в системе перекисного окисления липидов (ПОЛ), которая демонстрирует функциональное состояние ткани, а так же состояние пластичности её мембран. В контексте полученных в нашей лаборатории данных, об изменении экспрессии ключевых антиоксидантов (Cu, Zn, Mn-SOD и Trx-1,2), возникла необходимость оценить интенсивность окислительных процессов в нейронах гиппокампа и неокортекса.

Для решения данного вопроса, нами было проведено исследование отдельных этапов ПОЛ (определяли содержание диеновых и триеновых конъюгатов, липоперекисей, ТБКАП, оснований Шиффа и оценивали степень окисленности мембран по коэффициенту Клейна) в гиппокампе и неокортексе непосредственно после сеансов воздействия и через 3, 24 часа после предъявления различных форм гипобарической гипоксии. Первая группа экспериментальных животных подвергалась тяжелой гипобарической гипоксии (3 часа в барокамере при 180-200 мм рт. ст. (что соответствует подъему на высоту 10-11 км)), а вторая группа, за 24 часа до данного воздействия, подвергалась трехкратным умеренным (preconditionирующим) гипоксическим воздействиям (трехкратно по 2 часа с 24 часовым интервалом 360 мм рт. ст.). Третья группа подвергалась трёхкратному воздействию умеренной гипобарической гипоксии при давлении 360 мм рт. ст. («подъем крыс» на 5 км) по 2 часа 1 раз в сутки. Гипобарическая гипоксия осуществлялась в барокамере проточного типа, при

температуре от 20° до 25°С. Выживаемость крыс после 3-х часовой тяжелой гипобарической гипоксии составляла в среднем 50%. Выбранный режим прекодиционирования в среднем увеличивал выживаемость до 85%. В качестве контроля использовали крыс, которых помещали в барокамеру на те же сроки, что и экспериментальные группы, но при нормальном атмосферном давлении. Для каждой экспериментальной группы животных был свой контроль.

На основании полученных экспериментальных данных можно сделать следующие выводы. Тяжелая гипобарическая гипоксия (180-200 мм рт. ст., 3 часа) усиливает накопление полиненасыщенных жирных кислот и активизирует свободно-радикальное окисление липидов в неокортексе и гиппокампе головного мозга крыс. В период восстановления (3-24 часа) после воздействия тяжелой гипобарической гипоксии наблюдаются долгосрочные изменения системы ПОЛ дезадаптивного характера – увеличение уровня вторичных продуктов (ТБКАП) в гиппокампе и конечных продуктов (оснований Шиффа) во всех исследованных структурах мозга. Трехкратное гипоксическое прекодиционирование модулирует долгосрочные изменения системы ПОЛ, оказывая сенсibiliзирующее действие на изменение уровня продуктов ПОЛ, вызванных стрессом. ПОЛ активно вовлекается в молекулярно-клеточные механизмы формирования адаптивного к гипоксии состояния.

Генерация пептидных соединений эритроцитами человека при действии цАМФ

Кленов Р.О. (Самара, rklenov@yandex.ru)

Многие биологические активные соединения имеют пептидную природу. Пептидная биорегуляция – одна из самых сложных и многофункциональных систем регуляции в живых организмах. Изучение механизмов пептидной регуляции стало основой появления концепции существования в организме непрерывной совокупности регуляторных пептидов (континуума пептидов) обеспечивающих стимуляцию или подавление любых процессов жизнедеятельности. В течение ряда лет были получены данные о наличии у эритроцитов человека эндокринной функции, связанной с внутриклеточными процессами расщепления гемоглобина и генерацией биологически активных пептидных фрагментов в плазму. Образующиеся пептидные молекулы обладают широким спектром биологической активности – опиоидной, рилизинговой, эритропоэтиновой. Лизис гемоглобина осуществляется высокоспецифическими протеазами на внутренней стороне мембраны эритроцита, однако механизм их активации изучен недостаточно (Шаталаева, 2003). Ранее, нами было установлено увеличение содержания пептидов в клетках при действии адреналина в повышенных и физиологических концентрациях, что указывает на возможность активации примембранного комплекса протеаз через фосфорилирование специфическими протеинкиназами, которые в свою очередь активируются цАМФ в результате активации аденилатциклазного комплекса. Наибольший эффект наблюдался при воздействии высоких концентраций адреналина на молодые клетки (Кленова, 2006).

Целью данного исследования стало изучение образования пептидных соединений во фракциях молодых и старых эритроцитов при действии различных концентраций экзогенного цАМФ, АТФ и блокировании фосфодиэстеразы цАМФ эритроцитов имидазолом. Объектом исследования служила чистая фракция эритроцитов человека, разделенная на молодые и старые клетки по методу Т.В. Аврамовой и соавт. (1975). Результаты показали, что действие экзогенного цАМФ в концентрациях 100 и 200 мкг/мл приводило к увеличению содержания пептидов в клетках на 37% и 85% соответственно концентрации добавления и не зависело от возраста клеток. Добавление экзогенного АТФ в тех же концентрациях также вызывало увеличение содержания пептидов на 38% и 60%, соответственно, сходно в обеих фракциях. Блокирование фосфодиэстеразы цАМФ добавлением 43 и 72 мкг/мл имидазола также привело к

достоверному увеличению пептидных соединений на 20% и 30%, соответственно сходно во всех фракциях. Результаты проведенной гель-хроматографии указывают на присутствие пептидных молекул, сходных по молекулярной массе (более 1000 Да), при повышении концентрации цАМФ в эритроцитах.

Таким образом, активность примембранного комплекса протеаз определяется содержанием цАМФ в клетке и ее энергоресурсом и, в данном случае, не зависит от состояния мембраны, поскольку активация осуществлялась без участия сигнальных систем мембраны эритроцита.

Возрастные особенности жирнокислотного состава липидов плазмы крови белых крыс при парацетамоловом гепатите

Коваль М.И., Шуклинова О.А. (Тернополь, Украина, praxi0165@mail.ru)

Исследование состава липидов крови, а также тканей человека и животных в процессе их развития является актуальной задачей при изучении гомеостаза организма как в целом, так и его отдельных звеньев в норме и при различных патологических состояниях. Изменение жирнокислотного состава липидов крови и тканей характеризует глубину поражения и указывает возможные пути коррекции конкретной патологии. При гепатитах, в том числе медикаментозных, имеет место нарушение липидного обмена, характер которого зависит от возраста. Большинство исследователей при этом определяют, в основном, классы липидов крови и тканей, не учитывая, что более важным критерием оценки липидного обмена является жирнокислотный состав.

Учитывая вышесказанное, мы провели опыт по изучению изменений жирнокислотного состава липидов плазмы крови белых крыс 1, 6 и 12-месячного возраста из парацетамоловым гепатитом. Экстракцию липидов проводили по методу Фолча. Газохроматографический анализ спектра жирных кислот липидов осуществляли на газовом хроматографе серии "Цвет-500" в изотермическом режиме с пламенно-ионизационным детектором. Качественную оценку спектра жирных кислот липидов проводили по методу нормирования плоскостей метиловых производных жирных кислот и определяли их долю в процентах. Изучали следующие фракции жирных кислот: миристиновая ($C_{14:0}$), пальмитиновая ($C_{16:0}$), стеариновая ($C_{18:0}$), олеиновая ($C_{18:1}$), линолевая ($C_{18:2}$), линоленовая ($C_{18:3}$), арахидоновая ($C_{20:4}$), эйкозапентаеновая ($C_{20:5}$). Рассчитывали сумму насыщенных, ненасыщенных, полиненасыщенных жирных кислот. Результаты обрабатывали методом вариационной статистики с использованием t -критерия Стьюдента.

Результаты проведенного хроматографического анализа свидетельствовали о зависимости качественного состава жирных кислот плазмы крови белых крыс от возраста. Установлено достоверное уменьшение содержания ненасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот у 12-ти месячных крыс по сравнению с 6-ти и, особенно, с 1-месячными животными. При этом у них практически не изменялось содержание насыщенных жирных кислот. Снижение содержания полиненасыщенных жирных кислот происходило как за счёт класса ω -3, так и ω -6 и их предшественников – линолевой и линоленовой кислот, что согласуется с результатами других исследователей. Результаты нашего исследования также продемонстрировали различия качественного состава жирных кислот плазмы крови белых крыс разных возрастных групп с парацетамоловым гепатитом. Наиболее выраженные изменения в сторону увеличения количества насыщенных и уменьшения полиненасыщенных жирных кислот обнаружены в 1-месячных белых крыс с парацетамоловым гепатитом, что свидетельствует о большей лабильности гомеостаза у молодых животных, чем у взрослых и старых при данном патологическом процессе. Оценка нарушений жирнокислотного состава липидов плазмы крови человека и животных разного возраста

при отдельных патологических состояниях может быть информативным тестом при выборе обоснованного терапевтического влияния.

Авторы выражают признательность профессору, д.б.н. О.С. Покотило за помощь в подготовке тезисов.

Гетерогенность ферментативных свойств антител крови аутоиммунных мышей линии *mrl-lpr/lpr*

Колесова М.Е. (Новосибирск, koljasova@yandex.ru)

Природные каталитически активные антитела (абзимы) обнаружены в крови пациентов с аутоиммунными патологиями: астмой, системной красной волчанкой (СКВ), полиартритом, аутоиммунным тиреоидитом, рассеянным склерозом, а также гепатитом, лейкоемией и ВИЧ-заболеваниями, сопровождающимися тяжелыми поражениями иммунной системы.

Наиболее удобной моделью для детального изучения причин спонтанного и индуцированного проявления и развития аутоиммунных заболеваний (АИЗ), приводящих к наработке абзимов, являются мыши с генетической предрасположенностью к таким заболеваниям, например, мыши линии MRL, у которых вследствие дефектного белка гена *fas* происходит спонтанное развитие симптомов СКВ.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании гетерогенности ферментативных свойств антител (АТ), гидролизующих нуклеиновые кислоты, индуцированных иммунной системой мышей линии MRL-*lpr/lpr* после спонтанного развития у них симптомов СКВ.

Проведено разделение антител на ДНК-целлюлозе и исследована ферментативная активность отдельных фракций с различным сродством к ДНК. Показано, что ДНКазная активность АТ является Me^{2+} -зависимой. Ионы Mg^{2+} , Mn^{2+} и Ca^{2+} активировали АТ, но по-разному влияли на относительную активность разных фракций после хроматографии. Ионы Mg^{2+} совместно с ионами Ca^{2+} стимулировали образование как релаксированной кольцевой, так и линейной формы плазмидной ДНК.

Установлено, что основным иммуногеном при развитии аутоиммунных реакций является не сама ДНК, а ее комплексы с белками. Белки крови, взаимодействующие с ДНК, моделировали с помощью бычьего сывороточного альбумина (БСА) и его метилированного производного (мБСА). Показано, что в зависимости от фракции АТ, элюированной с ДНК-целлюлозы, бычий сывороточный альбумин и его метилированный аналог активируют, ингибируют или не влияют на активность АТ.

Показано, что в зависимости от фракции антитела гидролизуют РНК с большей, примерно такой же или меньшей эффективностью, чем ДНК. Определены величины константы скорости (k_{cat}) и константы Михаэлиса (K_M) реакции гидролиза $r(pC)_{10}$.

При исследовании РНКазной активности СКВ-антител показано, что пул поликлональных IgG катализирует не только реакции гидролиза ДНК и РНК, но и реакцию отщепления 5'-[^{32}P]-концевого фосфата $r(pC)_{10}$ (фосфатазная активность).

Полученные данные свидетельствуют о гетерогенности пула ДНК-абзимов, образующихся при спонтанном развитии СКВ у мышей: 1) по сродству к ДНК, 2) относительной активности в гидролизе ДНК и РНК, 3) зависимости от ионов металлов и 4) эффективности взаимодействия с белками.

Работа поддержана Программами президиумов РАН и СО РАН “Молекулярная и клеточная биология” (грант № 10.1), “Фундаментальные науки – медицине” (грант № 12.2), РФФИ (грант № 08-04-90014) и программой АВЦП “Развитие научного потенциала высшей школы” (грант № 2.1.1/5580).

Идентификация и изучение нового блокатора натриевых каналов из яда паука *Heriaeus melloteei*

Кузьменков А.И., Никольский А.С., Василевский А.А. (Москва, anteka@ya.ru)

Потенциал-зависимые натриевые каналы представляют один из ключевых элементов, контролирующей клеточную возбудимость в биологических системах. Поэтому неудивительно, что эти мембранные белки служат мишенью действия множества растительных и животных токсинов, которые, в свою очередь, выступают в роли специфичных и эффективных инструментов, незаменимых в арсенале современных исследователей. Одним из наиболее богатых источников модуляторов натриевых каналов различного типа являются яды пауков, представляющие собой природные библиотеки биологически активных молекул. В рамках данной работы мы провели выделение, установление первичной структуры и предварительную характеристику нового блокатора натриевых каналов из яда паука *Heriaeus melloteei*.

В результате трех стадий фракционирования яда *H. melloteei* методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в различных условиях был выделен в чистом виде пептид, который в концентрациях ~0,1 мкМ проявлял блокирующий эффект в отношении натриевых каналов млекопитающих. Эксперименты по тестированию биологической активности токсина проводили на ооцитах лягушки *Xenopus laevis*, экспрессирующих гены канальных белков (изоформы Nav1.2 и Nav1.5), с помощью метода двухэлектродной фиксации потенциала. С использованием масс-спектрометрии была измерена средняя молекулярная масса токсина, которая составила 3907,7 Да. Полная аминокислотная последовательность пептида была установлена с помощью комбинации методов автоматического секвенирования по Эдману и масс-спектрометрии. Молекула токсина содержит 35 аминокислотных остатков, шесть из которых являются остатками цистеина, образующими три внутримолекулярные дисульфидные связи, и, по-видимому, формирует структуру типа «цистинового узла». Новая последовательность показала значительное сходство (~46% идентичных остатков) лишь с одним ранее известным пептидом Nm-2, также выделенным из яда *H. melloteei* и являющимся блокатором натриевых каналов. Поскольку значимое сходство этих токсинов с другими известными пептидами отсутствует, на наш взгляд, можно говорить об открытии нового семейства блокаторов натриевых каналов. Полученные данные вносят новый вклад в исследование потенциал-зависимых натриевых каналов и их модуляторов.

Оценка чувствительности *PR1* гена пшеницы, маркера развития системной приобретенной устойчивости, к салициловой и абсцизовой кислотам

Ласточкина О.В., Юлдашев Р.А., Постригань Б.Н., Сахабутдинова А.Р. (Казань, Oksanaibg@gmail.com)

Салициловая кислота (СК) – эндогенный регулятор роста, выполняющий в растениях разнообразные физиологические функции, является признанным индуктором системной приобретенной устойчивости (СПУ). Кроме того, сейчас уже не вызывает сомнения участие СК в формировании устойчивости растений к стрессовым факторам абиотической природы (нарушение температурного режима, засоление, засуха, воздействие ионов тяжелых металлов). Ранее нами было обнаружено, что обработка растений пшеницы 50 мкМ СК вызывает быстрое транзитное накопление абсцизовой кислоты (АБК) в них. Это позволило предположить, что реализация защитного действия СК в отношении разных по природе стрессовых факторов обусловлена ее способностью увеличивать концентрацию эндогенной АБК в ходе предобработки и поддерживать ее повышенный уровень при стрессе.

В связи с этим, важно было сопоставить влияние СК и АБК на уровень экспрессии *PR-1* гена, являющегося признанным маркером СК-индуцированной СПУ.

Для решения поставленной задачи был проведен анализ имеющихся в генбанке нуклеотидных последовательностей *PR-1* генов злаков, позволивший подобрать праймеры для синтеза амплификата, на основе которого впоследствии были подобраны специфичные FAM/ROX праймеры, позволяющие оценивать экспрессию этого гена в режиме реального времени. Нами выявлено, что обработка 4-суточных проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. 50 мкМ СК вызывает в них существенное усиление экспрессионной активности гена *PR1*. что не удивительно, поскольку этот ген характеризуется чувствительностью к СК. В то же время с помощью метода реал-тайм ПЦР была обнаружена высокая чувствительность гена *PR1* пшеницы к обработке растений 4 мкМ АБК. Причем усиление транскрипции этого гена в проростках в ответ на воздействие АБК происходило раньше по времени и на более высоком уровне в сравнении с СК.

Полученные данные о чувствительности гена *PR1* не только к СК, но и к АБК свидетельствуют в пользу вероятности выполнения АБК роли интермедиата в реализации защитного действия СК на проростки пшеницы.

Изоформы лакказы базидиомицета *Cerrena unicolor* ВКМ F-3196

Лусова З.А. (Пуццино, zoyapozhid@rambler.ru)

Лакказа (К.Ф.1.10.3.2, *para*-дифенол: кислород оксидоредуктаза) – «голубая» медьсодержащая оксидаза – катализирует четырехэлектронное восстановление молекулы кислорода до двух молекул воды при одноэлектронном окислении редуцирующего субстрата, преимущественно фенолов и ароматических аминов.

В последние десятилетия к лакказе благодаря ее особым каталитическим свойствам (высокому окислительному потенциалу, широкой субстратной специфичности, стабильности) обращено пристальное внимание исследователей как к удобному инструменту в биотехнологии. Лакказа используется для разрушения ксенобиотиков и биоремедиации воды и почвы, трансформации продуктов разложения лигнина, делигнификации и отбеливания растительных волокон, детоксикации и обесцвечивания красителей в промышленных стоках, в пищевой промышленности, в органическом синтезе, в косметике и медицине.

Отобран эффективный продуцент лакказы – базидиомицет *Cerrena unicolor* ВКМ F-3196. Подобраны оптимальные условия культивирования *C. unicolor*. В ходе культивирования на среде Кирка с индуктором (0,1 мМ Cu^{2+}) *C. unicolor* продуцирует 2 изоформы лакказы: LacC1 и LacC2. Изоформы были очищены до электрофоретически гомогенного состояния из культуральной жидкости гриба. LacC1 и LacC2 имели молекулярные массы 69 и 65 кДа, pI 4,05 и 3,85, соответственно. Углеводная часть молекул обеих изоформ представлена маннозой, степень гликозилирования составляла 10,9% – для LacC1 и 4,98% – для LacC2.

Трипсинолиз белков с последующим MALDI TOF MS анализом показал уникальные фингепринты для каждой изоформы, что позволяет считать два очищенных фермента разными изоформами – продуктами разных генов.

Изучены физико-химические и каталитические свойства выделенных лакказ. Оптимумы pH для 2,6-диметоксифенола и АБТС для обеих изоформ лежат в кислой области. LacC1 была активна в более широком диапазоне pH и была активна при нейтральных значениях pH. Установлено, что за взаимодействие с субстратом у лакказ отвечает одна ионогенная группа, в то время как за каталитическое превращение – две. Значения pK ионогенных групп свободного фермента и фермент-субстратного комплекса имеют более низкие значения у LacC2, что и определяет более кислый pH оптимум этой изоформы. Температурный оптимум составлял 50⁰С и 55⁰С для LacC1 и

LacC2, соответственно. Время полуинактивации при 70⁰С для LacC1 составляло 30 мин, для LacC2 – 5 мин. Обе изоформы имеют низкие константы Михаэлиса.

Обнаруженные высокая термостабильность, широкий рН оптимум и низкие константы Михаэлиса у лакказы LacC1 определяют перспективность ее применения в биотехнологии. Для оценки биотехнологического потенциала лакказы LacC1 была изучена реакция фермента с высокотоксичным ксенобиотиком – пентахлорфенолом (ПХФ). Реакцию проводили в присутствии 1-гидроксibenзотриазола (1-ГБТ) как медиатора и без него. В присутствии медиатора – (1-ГБТ) – LacC1 осуществляла трансформацию ПХФ, при этом содержание ПХФ снижалось на 85 % в течение 3-х часов, что указывает на эффективность применения систем LacC1/медиатор в качестве агентов первичной атаки при разработке технологических приемов очистки природных сред, загрязненных хлорфенолами для деградации ксенобиотиков.

Влияние гипотермии на активность орнитиндекарбоксилазы в тимусе крыс

Логвинович О.С. (Пушино, Ologvinovich@rambler.ru)

Орнитиндекарбоксилаза (ОДК, КФ 4.1.1.17) – ключевой фермент биосинтеза полиаминов, которые в свою очередь вовлечены в ряд клеточных процессов (упаковка нуклеиновых кислот, транскрипция, трансляция, стабилизация мембраны и апоптоз). Любой вид нормального и злокачественного роста сопровождается индукцией ОДК, приводящей к усиленному синтезу и накоплению в клетках полиаминов. ОДК млекопитающих – один из наиболее быстро обменивающихся ферментов, активность которого может служить индикатором активирования метаболизма клетки. Отмечена зависимость между активностью фермента и увеличением доли клеток в S-фазе клеточного цикла. Влияние факторов внешней среды, в том числе и гипотермия, могут существенно изменять темп пролиферации и активность фермента.

Мы поставили своей задачей исследовать влияние искусственной гипотермии на активность ОДК в тимусе крыс. Крыс подвергли искусственной гипотермии в условиях гипоксии/гиперкапнии. Активность ОДК ткани определяли радиоизотопным методом по освобождению ¹⁴CO₂ из меченого L-[1-¹⁴C]орнитина. В состоянии гипобиоза при температуре тела 15-17 °С наблюдали падение активности фермента в тимусе до 22 % от контроля; через 24 ч после окончания охлаждения активность фермента оставалась сниженной до 32 % от контроля. Восстановление активности ОДК в тимусе происходит через 48 часов после окончания охлаждения и возвращения в состояние нормотермии. Для контроля пролиферативной активности клеток после воздействия гипотермии определяли распределение тимоцитов по фазам клеточного цикла методом проточной цитофлуорометрии. Через 24 ч после окончания охлаждения достоверно снижается процент клеток, находящихся в S-фазе, и увеличивается содержание клеток в фазах G₀ + G₁ клеточного цикла. Это соотношение сохраняется и через 48 ч. Восстановление характерного для контроля распределения клеток по фазам клеточного цикла происходит в тимусе через 72 ч после окончания охлаждения. Снижение и восстановление числа тимоцитов в S-фазе клеточного цикла на сутки отстает от соответствующих изменений активности ОДК тимуса.

Воздействие повреждающих факторов на организм приводит к снижению числа клеток в лимфоидных органах за счет апоптоза и усиления миграции. При проведении экспериментальной работы контролировалась также масса тимуса. Достоверных изменений не отмечено. Следовательно, гипотермия в условиях гипоксии/гиперкапнии крыс вызывает резкое падение активности ОДК в тимусе, что указывает на снижение пролиферативной активности тимоцитов, но не приводит к инволюции органа. Выяснение механизмов устойчивости организма к действию низких температур представляет интерес для фундаментальной и практической медицины, а также космической биологии.

Выражаю благодарность профессору, д.б.н. И.К. Коломийцевой за помощь в подготовке тезисов.

Влияние 2-оксипропил- β -циклодекстрина на тепловую инактивацию, денатурацию и агрегацию креатинкиназы из скелетных мышц кролика

Малолеткина О.И. (Москва, maloletkina@inbi.ras.ru)

Природные циклические олигосахариды, в частности циклодекстрины (ЦД), привлекают внимание биохимиков и биотехнологов в связи со способностью этих соединений подавлять агрегацию белков. В ряде работ ЦД были использованы для подавления агрегации, сопровождающей рефолдинг белков, предварительно денатурированных высокими концентрациями гуанидингидрохлорида или мочевины. Исследовано также подавление тепловой агрегации белков производными ЦД. Однако, как правило, агрегация белков прослеживалась по изменению интенсивности светорассеяния белковых агрегатов и не проводилась оценка величины агрегатов. Для того чтобы иметь более надежные представления о механизме действия ЦД на процесс агрегации белков в настоящей работе было изучено влияние 2-оксипропил-бета-циклодекстрина (ОПЦД) на тепловую агрегацию креатинкиназы (КК; КФ 2.7.3.2) с использованием метода динамического светорассеяния. Метод динамического светорассеяния дает информацию о распределении частиц по размерам.

В результате определения влияния ОПЦД на ферментативную активность КК путем определения остаточной ферментативной активности рН-метрическим методом показано, что ОПЦД не влияет на кинетику тепловой инактивации фермента. Тепловую денатурацию КК изучали методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) при нагревании раствора фермента со скоростью 1 К/мин. Положение максимума на ДСК-профиле в присутствии ОПЦД изменялось незначительно. Следовательно, можно заключить, что ОПЦД не влияет на термостабильность КК.

Изучение кинетики тепловой агрегации КК методом динамического светорассеяния показало, что процесс агрегации КК включает стадию образования стартовых агрегатов и последующее слипание стартовых агрегатов и агрегатов более высокого порядка. Ключевыми понятиями механизма тепловой агрегации белков являются длительность стадии, приводящей к образованию стартовых агрегатов, (t_0), гидродинамический радиус стартовых агрегатов ($R_{h,0}$) и параметр $1/t_{2R}$, характеризующий скорость агрегации. Для агрегации КК в присутствии ОПЦД при повышении концентрации ОПЦД в интервале 0 – 76 мМ наблюдалось увеличение параметра t_0 (0,84–2,69 мин) и параметра $R_{h,0}$ (32 – 138 нм). Экспоненциальный характер зависимости гидродинамического радиуса от времени на начальном участке указывает на то, что процесс агрегации протекает в режиме, при котором вероятность слипания частиц при столкновении меньше единицы. 10-кратное уменьшение параметра $1/t_{2R}$ с ростом концентрации ОПЦД может указывать на то, что в присутствии ОПЦД происходит уменьшение вероятности слипания сталкивающихся частиц. Стартовый агрегат формируется из комплексов денатурированных молекул белка с ОПЦД, и увеличение содержания ОПЦД в стартовом агрегате приводит к уменьшению числа центров агрегации (липких участков) на поверхности стартового агрегата, и, как следствие, к снижению вероятности слипания частиц при столкновении.

Таким образом, подавление тепловой агрегации КК в присутствии ОПЦД обусловлено увеличением продолжительности стадии образования стартовых агрегатов и уменьшением вероятности слипания стартовых агрегатов при столкновении.

Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта РФФИ (грант № 08-04-00666-а).

Изучение изоморфного состава моклобенид зависимой моноаминоксидазы А в коре головного мозга условно здоровых людей
Малофеева Е.В. (Казань, Katrin537@yandex.ru)

Изучение вопроса о связи между афферентными расстройствами и обменом нейромедиаторов является важной задачей молекулярной фармакологии. МАО А, являющаяся оксидоредуктазой, дезаминирующей моноамины, локализована в разных тканях организма. Наибольший интерес представляет изучение изоморфного состава МАО А нейроглии для получения полной информации о регуляции обмена моноаминов при патологиях ЦНС. Кроме того, многие антидепрессанты разработаны без учета тканевой специфичности у здоровых людей и с нейродегенеративными заболеваниями.

Целью работы является определение изоморфного состава МАО А в микросомах головного мозга условно здоровых людей.

Работа включала: частичное разделение изоформ МАО А коры головного мозга с помощью гель – фильтрации на колонке с сефадексом G-200; выделение изоформ моклобенид зависимой МАО А с помощью ионообменной хроматографии на QAE ZETAPREP 15 DISK; сравнительный анализ кинетических характеристик выделенных изоформ; анализ молекулярной массы МАО А с помощью электрофореза в ПААГе в неденатурирующих условиях.

Таким образом, с помощью гель-фильтрации и ионообменной хроматографии было выделено 18 изоформ моклобенид зависимой МАО А. Анализ электрофореграмм фракций, содержащих активность МАО А, в ПААГе в неденатурирующих условиях показал, что фракции, полученные с помощью гель-фильтрации и ионообменной хроматографии, содержали белок с молекулярной массой 55-65 кДа. Все выделенные изоформы МАО А коры головного мозга условно здоровых различались по значению K_m для адреналина и каталитическому числу V_{max}/K_m . Сравнительный анализ кинетических характеристик выделенных изоформ МАО А показал, что значения K_m для адреналина составили 0,44-2,9 мкМ, а значения каталитического числа 3-54.

Полученные данные в дальнейшем следует учитывать при сравнении изоморфного состава людей с афферентными расстройствами и здоровых людей, а также при назначении препаратов, мишенью которых является МАО А.

Малые ГТФазы семейства Rho регулируют подвижность митохондрий
Матвеева Е.А. (Москва, e.a.matveeva@inbox.com)

Митохондрии играют особую роль в физиологии клетки. Они обеспечивают клетку энергией, регулируют концентрацию ионов кальция в цитоплазме, а также являются местом локализации многих компонентов, участвующих в программируемой клеточной смерти – апоптозе. Для нормального функционирования митохондрий важным является их правильное внутриклеточное распределение: во многих клетках митохондрии локализуются вблизи областей высокого потребления энергии или повышенной концентрации кальция. Такое распределение митохондрий достигается, во-первых, при помощи транспорта вдоль микротрубочек и актиновых микрофиламентов и, во-вторых, в результате их закрепления на структурах цитоскелета. Поэтому можно предположить, что многообразные перестройки цитоскелетных структур, которые сами являются объектом сложной регуляции, приводят к изменениям в распределении и функции митохондрий.

Малые ГТФазы семейства Rho играют центральную роль в регуляции организации компонентов цитоскелета. Так, белок RhoA контролирует образование стресс-фибрилл и фокальных контактов, а белки Rac1 и Cdc42 участвуют в регуляции ламеллиподий и филоподий соответственно. Малые ГТФазы в клетках активируются в ответ на сигналы, полученные клетками извне, и передают их, активируя нижестоящие белки-мишени,

которые либо непосредственно изменяют структуру микротрубочек и актиновых микрофиламентов, либо передают сигнал на эффекторы, расположенные после них в регуляторной цепи.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что лизофосфатидная кислота (ЛФК) – фосфолипид, обладающий активностью факторов роста в нормальных и опухолевых клетках, – ингибирует подвижность митохондрий, вызывая их закоривание на периферии клетки. ЛФК действует через малую ГТФазу Rho-A и связанный с ней белок из семейства форминов mDia1, который стимулирует полимеризацию актина и образование продольных пучков актиновых микрофиламентов смешанной полярности – стресс-фибрилл. Из полученных данных был сделан вывод, что подвижность митохондрий зависит от перестроек актинового цитоскелета

Настоящая работа посвящена исследованию роли других ГТФаз семейства Rho, белков Rac1 и Cdc42, в регуляции подвижности митохондрий. Для того чтобы выяснить, как эти белки влияют на движение митохондрий, клетки линии CV-1 трансфецировали плазмидами, кодирующими их конститутивно-активные и доминантно-негативные мутанты, а затем анализировали движение митохондрий в живых клетках при помощи флуоресцентной видеомикроскопии. Уровень подвижности митохондрий оценивали по величине их относительной подвижности, которую определяли как долю быстрых перемещений относительно общего числа перемещений всех митохондрий за время съемки.

Оказалось, что экспрессия конститутивно-активных мутантов белков Cdc42 и Rac1 вызывает повышение относительной подвижности митохондрий в клетках CV-1. Экспрессия доминантно-негативных мутантов, напротив, снижает относительную подвижность митохондрий. Поскольку белки Rac1 и Cdc42 оказывают на актиновый цитоскелет действие, противоположное действию белка RhoA, мы предполагаем, что причиной эффектов на подвижность митохондрий может быть перестройка актиновых структур. Однако регуляторный механизм их действия нам предстоит выяснить в процессе дальнейшей работы.

Белок-белковые взаимодействия в гомоолигомерах малых белков теплового шока человека

Мымриков Е.В. (Москва, evgenet@mail.ru)

Малые белки теплового шока (sHsp) обнаружены практически во всех организмах. У человека описано 11 представителей этого семейства. Некоторые из них тканеспецифичны (α A-кристаллин, cvHsp, ODFP), другие же экспрессируются повсеместно (α B-кристаллин, Hsp27, Hsp20, Hsp22). Характерной чертой этих белков является способность предотвращать агрегацию денатурированных белков, образующихся при различных неблагоприятных воздействиях, что способствует повышению выживаемости клеток при стрессе. Кроме того, sHsp человека участвуют в самых различных процессах, таких как, мышечное сокращение, апоптоз и передача сигнала в клетке. Малые белки теплового шока способны образовывать олигомеры переменного состава, что сильно затрудняет их кристаллизацию. Вследствие этого к настоящему времени трехмерная структура sHsp человека не определена, а данные о роли отдельных участков молекул sHsp во внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействиях малых белков теплового шока остаются крайне противоречивыми.

Мы исследовали роль участка, расположенного в середине α -кристаллинового домена, в образовании гомоолигомеров малых белков теплового шока человека. В кристаллах малых белков теплового шока бактерий и растений в этом участке располагается короткая шестая β -складка, играющая важную роль в димеризации sHsp, петля и седьмая β -складка. Трехмерная структура sHsp человека не известна, однако предполагается, что эти белки не имеют в своем составе шестой β -складки. Описано

множество мутаций в исследуемом участке в α -кристаллинах, Hsp27 и Hsp22 человека, коррелирующих с развитием врожденной катаракты, некоторых нейродегенеративных заболеваний. В первичной структуре Hsp27 человека в данном участке расположен единственный остаток цистеина (Cys137), который при окислении может образовывать дисульфидный мостик с соседним мономером белка, и при этом образование дисульфидной связи не влияет на свойства Hsp27. Мы предположили, что введение остатка Cys в гомологичное положение других малых белков теплового шока человека позволит получить стабилизированные гомо- и гетероолигомеры этих белков. В нашей лаборатории были получены мутантные формы α B-кристаллина, Hsp20 и Hsp22, содержащие единственный остаток цистеина в положении, гомологичном Cys137 в Hsp27. Введение точечных мутаций не сопровождалось значительными изменениями физико-химических свойств исследуемых белков. «Цистеиновые» мутанты sHsp человека в окислительных условиях способны образовывать димеры, связанные дисульфидной связью. При окислении олигомерное состояние «цистеиновых» мутантов α B-кристаллина и Hsp20, а также Hsp27 дикого типа и Hsp27 3D (мутанта Hsp27, имитирующего фосфорилирование по трем остаткам серина) не изменяется, в то время как окисление «цистеинового» мутанта Hsp22 сдвигает равновесие между мономерами и димерами в сторону образования димеров. Hsp22 дикого типа, в котором три остатка цистеина расположены в других участках молекулы белка, в значительно меньшей степени образует димеры при окислении. Сделан вывод о том, что участок структуры малых белков теплового шока (предположительно седьмая β -складка или петля, соединяющая пятую и седьмую β -складки), в котором располагается введенный остаток Cys, играет важную роль в образовании димеров и, возможно, в олигомеризации sHsp. Известные мутации в этом участке могут влиять на структуру мономеров sHsp и их взаимодействие при олигомеризации.

Работа поддержана грантом РФФИ № 04-07-00115-а.

Природные каталитически активные антитела при инфекционных заболеваниях

Пархоменко Т.А. (Новосибирск, tapar@yandex.ru)

Первое сообщение о природных антителах с каталитической активностью (абзимах) было опубликовано в 1989 г., когда группой исследователей под руководством С. Пола были обнаружены антитела, гидролизующие вазоактивный интестинальный пептид, из крови больных бронхиальной астмой. После этого антитела с различными каталитическими активностями были обнаружены при ряде других аутоиммунных заболеваниях (системная красная волчанка, рассеянный склероз и др.), а также при некоторых вирусных инфекциях (гепатит, ВИЧ-инфекция). Также было показано, что антитела из крови здоровых доноров либо не обладают каталитической активностью, либо она крайне низкая. Очевидно, что наработка абзимов имеет место при нарушении иммунного гомеостаза. Вопрос о возможной роли каталитически активных антител в патогенезе заболеваний остается дискуссионным, и для ответа на него необходимо детальное исследование свойств абзимов и выявление их возможных корреляций с тяжестью заболевания и его исходом.

Целью данной работы являлось исследование антител с ДНК-гидролизующей активностью при вирусных и бактериальных инфекциях.

Проведен анализ ДНК-гидролизующей активности антител из крови больных бактериальными инфекциями (урогенитальный уреоплазмоз, ассоциированный с реактивным артритом, уrogenитальный хламидиоз, ассоциированный с реактивным артритом, иерсиниоз, шигеллез, гнойная хирургическая инфекция, рожистое воспаление) и клещевым энцефалитом. С использованием ряда жестких критериев показано, что ДНКазная активность является собственным свойством антител. Относительная активность препаратов сильно варьирует от пациента к пациенту, но, в отличие от

здоровых доноров, все препараты демонстрируют достоверно тестируемую ДНКазную активность. В среднем ДНК-гидролизующая активность антител при исследуемых инфекциях оказалась значительно ниже таковой при аутоиммунных заболеваниях. Средние значения активностей уменьшаются в порядке урогенитальный уреоплазмоз, ассоциированный с реактивным артритом > клещевой энцефалит > гнойная хирургическая инфекция > урогенитальный хламидиоз, ассоциированный с реактивным артритом > шигеллез > рожистое воспаление > хламидиоз.

Тезисы доклады основаны на материалах исследований, проведенных в рамках грантов: Программа фундаментальных исследований Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" «Молекулярные механизмы функционирования защитно-репарационных систем прокариот и человека» – № 10.1; Программа фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» «Разработка дифференциальных комплексных методов диагностики и терапии заболеваний с аутоиммунными патологиями» – № 12.2; РФФИ– № 08-04-90014, 07-04-00387, 07-04-00395; Грант АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы» – № 2.1.1/5580. Автор выражает признательность д.б.н. В.Н. Буневой за помощь в подготовке тезисов.

Изучение роли метилрезорцина в изменении стабильности и активности ферментных белков

Петровский А.С., Мартиросова Е.И. (Москва, ms_martins@mail.ru)

В совместных исследованиях с Институтом микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН получены данные, свидетельствующие о способности химического аналога микробных ауторегуляторных факторов d_1 (C_7 -АОБ или метилрезорцин), относящихся к алкилоксибензолам (АОБ), стимулировать функциональную активность лизоцима яичного белка и регулировать эффективность катализируемых им реакций гидролиза специфических (пептидогликан) и неспецифических (хитин) субстратов. При этом величина регистрируемых эффектов определялась концентрацией и временем инкубирования модификатора с ферментом. Полученные результаты в значительной степени воспроизводят зависимости, показанные в отношении эффектов C_7 -АОБ на другие моносубъединичные ферменты (трипсин, α - и β -амилаза, рибонуклеаза и др.) и подтверждают функциональную роль АОБ в модификации активности ферментных белков неспецифически к их структуре. Еще один эффект модификации лизоцима C_7 -АОБ заключается в изменении его стабильности, что было продемонстрировано по сохранению активности фермента после его термоденатурации (функциональная стабильность) или по расширению температурного диапазона катализа (операционная стабильность).

Изменения основных свойств ферментов, таких как активность и стабильность, в их комплексах с АОБ обусловлены изменениями физико-химических характеристик биополимеров. С использованием методов дифференциальной сканирующей микрокалориметрии установлена корреляция между эффектом повышения неспецифической активности лизоцима в отношении коллоидного хитина до 550% и понижением избыточной свободной энергии денатурации лизоцима в присутствии C_7 -АОБ в диапазоне концентраций 0,2-2,0 мг/мл. Очевидно, что понижение избыточной энергии денатурации лизоцима ≈ 15 кДж/моль способствует повышению активности фермента, по-видимому, вследствие увеличения свободного объема и подвижности фрагментов макромолекулы лизоцима при конформационном превращении, что приводит к повышению доступности дополнительных участков активного центра фермента.

Показано, что увеличение времени инкубирования до 5 суток приводит к значительному подавлению эффекта активирования лизоцима и сопровождается более

глубокой дестабилизацией его нативной конформации с изменением кооперативной единицы денатурации.

Методом динамического светорассеяния установлено, что гидродинамический диаметр макромолекул лизоцима не изменяется в диапазоне концентраций С₇-АОБ 0,2-2,0 мг/мл и составляет 4,05±0,06 нм. При концентрации С₇-АОБ более 2 мг/мл наблюдается повышение степени ассоциации молекул лизоцима, изначально присутствующих в растворе с рН 7,4, от 300 до 1400 нм. Обнаружен синергический эффект повышения поверхностной активности лизоцима в присутствии С₇-АОБ.

Совокупность результатов полученных в широком диапазоне концентраций С₇-АОБ (0,2-2,0 мг/мл) свидетельствует о дестабилизации нативной конформации белка и преимущественном взаимодействии С₇-АОБ с его денатурированной формой. Повышение термостабильности белка связано, по-видимому, со стабилизацией денатурированной формы лизоцима за счет взаимодействия с метилрезорцином.

TRIP8b: белок-адаптер, взаимодействующий с клатрином

Попова Н.В. (Москва, popova@ibch.ru)

Кальцийнезависимый рецептор латротоксина (CIRL, calcium-independent receptor of α -latrotoxin или latrophilin) принадлежит GPS семейству G-белоксопряженных рецепторов (GPCR), имеющих протяженную N-концевую внеклеточную область, включающую структурные домены белков клеточной адгезии. Считается, что эти химерные рецепторы могут быть вовлечены в межклеточные взаимодействия и передачу сигналов, опосредованных G-белками. Но до сих пор для рецепторов данного семейства не найдены природные агонисты.

Для выяснения молекулярных механизмов работы CIRL при помощи дрожжевой SR-системы выполнен поиск внутриклеточных белков, взаимодействующих с его цитоплазматическим доменом. Найден один из партнеров CIRL – цитоплазматический белок с несколькими тетра трикопептидными повторами (TRIP8b), предположительно выполняющий адаптерные функции. Для изучения функциональной роли TRIP8b мы провели поиск белков, которые с ним взаимодействуют, методом аффинной хроматографии экстрактов мозга крысы на иммобилизованном TRIP8b. Методом масс-спектрометрии в элюатах с TRIP8b-Сефарозы были идентифицированы клатрин и субъединицы комплекса AP-2. С помощью укороченных конструкций и многоточечных мутантов TRIP8b, в последовательности этого белка были определены области, отвечающие за взаимодействие с клатрином.

Как известно, клатрин и AP-2 участвуют в процессе эндоцитоза активированных рецепторов в составе клатрин-покрытых пузырьков. Выделение таких пузырьков и анализ их белкового состава позволяет находить новые белки, вовлеченные в эндоцитоз. Методом дифференциального центрифугирования была выделена фракция клатрин-покрытых пузырьков. Окрашивание специфичными антителами выявило, что TRIP8b действительно содержится во фракции клатрин-покрытых пузырьков.

Полученные результаты позволяют предположить участие TRIP8b в клатрин-опосредованном эндоцитозе.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 06-04-49706а), Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология». Автор выражает признательность научному руководителю, д.х.н. А.Г. Петренко за помощь в подготовке тезисов.

Хепсин – перспективный маркер злокачественных заболеваний предстательной железы

Раевская А.А. (Москва, xandraбmay@gmail.com)

Хепсин относится к семейству трансмембранных сериновых протеаз второго типа. Открытие хепсина произошло более двадцати лет назад, однако его физиологические функции остаются не до конца ясными. В последние годы накоплен большой объем данных о возможном участии хепсина в развитии и прогрессировании некоторых опухолевых заболеваний, одним из которых является рак предстательной железы. Исследование профилей экспрессии генов в здоровых и опухолевых клетках предстательной железы выявляет в последних стабильную гиперэкспрессию хепсина, уровень которой коррелирует с прогрессированием заболевания. Слабая при гиперплазии и на ранних стадиях опухолевого процесса, экспрессия хепсина значительно увеличивается на терминальных стадиях заболевания.

В настоящее время во врачебной практике для диагностики рака предстательной железы наиболее широко используется метод, основанный на определении простат-специфического антигена в крови человека. Недостатком данного теста является его низкая достоверность. В связи с этим актуальным является вопрос выбора иных маркеров заболеваний предстательной железы, обладающих большей диагностической ценностью.

Целью нашей работы является создание неинвазивного метода диагностики рака предстательной железы, основанного на определении активности хепсина с применением хромогенного субстрата. Получен рекомбинантный хепсин, используемый в тест-системе для стандартизации, оптимизированы условия его экспрессии в бактериальной системе. Разработана методика очистки рекомбинантного хепсина с использованием методов аффинной металло-хелатной и ионообменной хроматографии. Охарактеризовано взаимодействие рекомбинантного хепсина с различными субстратами, а также с селективным ингибитором. Проведено исследование активности хепсина более чем в 100 образцах, взятых у пациентов с патологиями предстательной железы различной степени тяжести. Установлены следующие интервалы активности хепсина для основных заболеваний предстательной железы, $p \leq 0,05$: не более 0,187 нмоль/л*мин у здоровых лиц, 0,187 – 0,395 нмоль/л*мин в группе больных хроническим простатитом и доброкачественной гиперплазией предстательной железы, 0,395 – 1,559 нмоль/л*мин в группе больных простатической интраэпителиальной неоплазией и более 1,559 нмоль/л*мин в группе больных раком предстательной железы.

Депо-управляемые кальциевые каналы в клетках A431 и их регуляция адаптерными белками Homer 1a и Homer 1c

Рязанцева М.А. (Санкт-Петербург)

Одним из основных путей входа Ca^{2+} из внеклеточной среды в электроневозбудимых клетках является вход Ca^{2+} через depo-управляемые каналы, активируемые опустошением внутриклеточных кальциевых депо. В клетках эпидермоидной карциномы человека линии A431 ранее были описаны низкопроводящие высокоселективные depo-управляемые каналы I_{min} . Определяющую роль в процессе их активации играет прямое белок-белковое взаимодействие канала I_{min} с рецептором инозитол-1,4,5-трисфосфата (IP_3R), расположенным в мембране эндоплазматического ретикулума. В клетках A431 и других электроневозбудимых клетках экспрессируются адаптерные белки семейства Homer, способные связываться с белками-мишенями, содержащими аминокислотную последовательность PPXXF, где X – любая аминокислота. Таким белком-мишенью для Homer белков является IP_3R . Белки Homer 1c за счет образования олигомерных комплексов способны осуществлять связь между

белками-мишенями, белки Homer 1a способны связываться с белками-мишенями, но не способны образовывать олигомерных комплексов.

Целью работы была проверка гипотезы о том, что белки семейства Homer могут участвовать во взаимодействии I_{\min} каналов и IP_3R , и регулировать депо-управляемый вход. В работе использовался метод локальной фиксации потенциала patch-clamp в конфигурации “inside-out”. Во всех экспериментах приложение рекомбинантного белка GST-Homer 1c к внутренней стороне мембраны клеток A431 не вызывало активации I_{\min} каналов, последующее приложение рекомбинантного белка GST-Homer 1a вызывало активацию I_{\min} каналов в 55% попыток. Приложение синтетического пептида PPKKFR, являющегося лигандом для Homer белков, к внутренней стороне мембраны вызывало активацию I_{\min} каналов в 45% попыток, а приложение контрольного пептида PPKKRR, не распознаваемого белками в качестве лиганда, не вызывало активации I_{\min} каналов. Активность I_{\min} каналов в условиях разобщения связи белков Homer с белками-мишенями свидетельствует об участии адаптерных белков семейства Homer в регуляции активности I_{\min} каналов. Регуляция активности I_{\min} каналов происходит таким образом, что для блокирования спонтанной активности необходимы олигомерные комплексы белков Homer 1c, замена их на Homer 1a, неспособные образовывать олигомеры и осуществлять связь между белками-мишенями, вызывает активацию каналов в отсутствие агониста.

Каталитическая полиспецифичность иммуноглобулинов молока человека

Седых С.Е. (Новосибирск, sedyh@niboch.nsc.ru)

Полиспецифичными, или полиреактивными, называют такие антитела, которые неспецифически взаимодействуют с различными по химической природе антигенами и лигандами. Антитела против ДНК при иммуноферментном анализе дают положительную реакцию на некоторые фосфолипиды, белки и другие полимеры полианионной природы.

В данной работе впервые была исследована полиспецифичность каталитически активных антител (абзимов). Электрофоретически гомогенные IgG и sIgA молока человека были разделены аффинной хроматографией на ДНК-целлюлозе на большое число фракций, отличающихся по сродству к ДНК. Затем были исследованы их каталитические активности в реакциях гидролиза ДНК плазмиды, АТФ, олигосахарида, а также фосфорилирования прочно связанных с антителами липидов и олигосахаридов.

В случае sIgA разделенных на ДНК-целлюлозе, все указанные выше каталитические активности проявляли как фракции, элюированные с сорбента при нанесении, так и фракции, обладающие высоким сродством к ДНК. Все фракции IgG, разделенные на ДНК-целлюлозе, также обладали всеми каталитическими активностями; при использовании градиента концентраций NaCl эти активности распределились по всему профилю хроматографии. Аналогичная ситуация наблюдалась при последующей хроматографии sIgA и IgG, имеющих сродство к ДНК, на АТФ-сефарозе. При этом наблюдалось полное или частичное перекрывание пиков, соответствующих различным исследованным активностям.

Некоторые субфракции абзимов могут с определенной эффективностью связывать большое число различных лигандов, как это происходит в случае сывороточных альбуминов. В данной работе впервые показана каталитическая полиспецифичность антител. Известно, что некоторые ферменты могут образовывать комплексы не только со специфическим субстратом, но с той или иной эффективностью могут связывать лиганды другой природы. Однако ферменты катализируют в основном один тип химической реакции, реализуемый только в случае специфического субстрата. Все остальные – неспецифические лиганды могут связываться с ферментами, выступая

в качестве ингибиторов, активаторов или нейтральных по отношению к ферменту соединений, но не подвергаются превращению.

Полученные данные свидетельствуют в пользу каталитической гетерогенности и полиреактивности абзимов молока человека. Возможным механизмом происхождения каталитической полиреактивности абзимов IgG может быть обмен “плечами” их Fab, доказанный ранее для IgG четвертого подкласса крови человека, или легкими цепями. В случае sIgA, кроме обмена легкими цепями, вероятно образование химерных молекул из мономеров IgA с различными активными центрами.

Работа поддержана грантом РФФИ (№ 07-04-00387)

Фосфорилирование цАМФ-зависимой протеинкиназой влияет на взаимодействие тау белка с белком 14-3-3 ζ

Случанко Н.Н. (Москва, nns@live.ru)

Группа тау белков объединяет специфические для нервной ткани структурные белки, которые взаимодействуют с тубулином и отвечают за организацию цитоскелета нейрона. Нарушение функционирования тау белка часто сопровождается его агрегацией и может приводить к различным нейродегенеративным заболеваниям, называемым таупатиями. Было установлено, что тау может фосфорилироваться под действием многих протеинкиназ, и фосфорилирование влияет на способность тау белка связываться с микротрубочками, на его склонность к агрегации и другие свойства. цАМФ-зависимая протеинкиназа (ПКА) фосфорилирует несколько участков в структуре тау белков, в том числе остаток серина, находящийся в консенсусной последовательности R(S/X)XpSXP, распознаваемой универсальным адапторным белком 14-3-3. Белок 14-3-3 экспрессируется практически во всех тканях человека, однако его содержание в мозге особенно велико. Учитывая тот факт, что белок 14-3-3 преимущественно взаимодействует с белками, имеющими участки фосфорилирования со строго определенной первичной структурой (консенсусной последовательностью), а также высокое содержание 14-3-3 и тау в нейронах, исследование взаимодействия 14-3-3 и тау представляет особый интерес. Мы исследовали взаимодействие 14-3-3 ζ с короткой изоформой тау (τ 3) методами нативного электрофореза, химического «сшивания» и гель-фильтрации. Нефосфорилированный τ 3 обладает низким сродством к 14-3-3 ζ . Фосфорилирование τ 3 под действием ПКА (с включением около 2 молей фосфата на моль белка) ведет к значительному усилению связывания τ 3 с 14-3-3 ζ . Кажущаяся константа диссоциации комплексов, образованных фосфорилированным тау (τ 3) и 14-3-3 ζ , составляет около 2 мкМ, в то время как константа диссоциации в случае с нефосфорилированным тау как минимум в 10 раз выше. Стехиометрия комплекса, образуемого при титровании фиксированной концентрации 14-3-3 ζ увеличивающимися количествами τ 3, отличается от 1:1 и варьирует в зависимости от концентрации исследуемых белков. По данным химического «сшивания», 14-3-3 ζ уменьшает вероятность образования высокомолекулярных «сшитых» олигомеров τ 3 и одновременно с этим увеличивает вероятность образования гетероолигомерных комплексов, содержащих τ 3 и 14-3-3 ζ . Поскольку 14-3-3 в большом количестве присутствуют в мозге, мы предполагаем, что, взаимодействуя с τ 3, 14-3-3 ζ может влиять на олигомерное состояние тау белка и таким образом участвовать в регуляции сборки микротрубочек и формирования нейрофибриллярных структур, являющихся ключевым маркером целого ряда нейродегенеративных заболеваний.

Работа проведена при поддержке гранта 07-04-0115-а Российского фонда фундаментальных исследований.

Токсические действия бета-амилоидного пептида 25-35 на эритроциты человека

Соломадин И.Н. (Пушино, iliusmaster@rambler.ru)

В настоящее время существует амилоидная теория болезни Альцгеймера. Предполагают, что заболевание развивается в результате накопления агрегатов бета-амилоидных пептидов (Аβ). Амилоидные пептиды встречаются не только в мозге или мышцах, – они являются нормальными компонентами крови. В ней они способны связываться с альбуминами и форменными элементами крови. Описано, что эритроциты гибнут при контакте с бета-амилоидным пептидом, но механизмы смерти клеток неизвестны.

В нашей работе мы исследовали действие Аβ на эритроциты человека. Мы проводили инкубацию эритроцитов с Аβ, после чего изучали различные биохимические показатели в клетках. Было установлено, что бета – амилоидный пептид 25-35 изменяет морфологию мембраны эритроцита. Уже при кратковременной инкубации наступает лизис клеток и степень лизиса пропорциональна концентрации Аβ. Из литературных источников было известно, что Аβ способны связываться с мембраной и образовывать неспецифические каналы. Изменение ионного баланса в клетке можно проследить по активности ферментов, его поддерживающих. Измерение активности Na/K- АТФазы выявило усиление активности уже через 10 минут после начала инкубации. Активация этого фермента происходит при увеличении внутриклеточной концентрации ионов Na и уменьшения концентрации ионов K. Кроме ионного дисбаланса, мы наблюдали нарушение асимметрии мембраны эритроцитов, – на поверхности клеток появлялось большое количество фосфатидилсерина (ФС). Через 15 минут инкубации число клеток с ФС на поверхности мембраны увеличивалось с 0,5% до 11%. В последнее время известна теория, согласно которой увеличение содержания ФС на поверхности клеток является сигналом к уничтожению макрофагами. Измерения активности мембранносвязанного фермента фосфофруктокиназы показало двукратное уменьшение ее активности. Для эритроцита такие изменения фатальны. Ключевой фермент гликолиза – главного пути снабжения энергией, снижает свою активность, что приводит к существенному нарушению энергетического обмена. Это приводит к неспособности эритроцитов выполнять свою основную функцию – переноса кислорода.

Можно говорить о различных путях воздействия Аβ на эритроциты. Мы показали только часть из них. Дальнейшие работы будут направлены на уточнение механизмов токсических действий Аβ.

Структурные свойства внутренней митохондриальной мембраны и содержание ключевых антимиоптических белков в тканях колоректальной аденокарциномы

Сорокина Л.В. (Киев, Украина, sorokina_molbiol@mail.ru)

В последние годы колоректальному раку принадлежит третье место в структуре онкозаболеваемости в Украине и Европе. Важное участие митохондрий в процессах опухолевой трансформации подтверждается тем фактом, что эти органеллы, помимо энергетической функции, осуществляют регуляцию каспазозависимых путей клеточной гибели, регуляцию кальциевого гомеостаза, прооксидантно-антиоксидантного статуса и т.д. К настоящему времени характер изменений структуры и динамических свойств митохондриальных мембран при колоректальной аденокарциноме (КА) человека остается малоизученным. Целью работы являлось: 1) провести сравнительную оценку уровней экспрессии митохондриальных антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL в тканях КА человека при различных клинических стадиях; 2) исследовать структурно-динамические параметры внутренних митохондриальных мембран (ВММ) тканей КА.

Клинический материал тканей КА человека был любезно предоставлен Отделением абдоминальной онкологии ГП «Национальный Институт Рака» (г. Киев). Первичные

опухоли были классифицированы как умеренно- и малодифференцированные и соответствовали I, II-III и IV клиническим стадиям. Прилежащую к опухоли макроскопически неизмененную ткань рассматривали в качестве условно нормальной (УНТ). Содержание Vcl-xL, Vcl-2 определяли с использованием моноклональных антител в ходе Вестерн-блот анализа. Структурное состояние ВММ оценивали с использованием метода флуоресцентных зондов. Особенности пространственной организации мембран оценивали методом индуктивно-резонансного переноса энергии в донорно-акцепторных парах флуорофоров, характеризующихся различной локализацией в мембране. Полученные данные проанализированы с помощью общепринятых методов вариационной статистики и при использовании программного обеспечения TotalLab 2.01. *Результаты.* Полученные данные указывают на отсутствие достоверных различий в содержании антиапоптотических белков семейства Vcl-2 между опухолевыми тканями и соответствующими им УНТ для I и II стадии аденокарциномы. III стадия характеризуется возрастанием количества Vcl-2 в 1,54 раза и Vcl-xL в 1,31 раза в опухолевых тканях по сравнению с УНТ, а при IV стадии КА количество Vcl-2 в 2,53, а белка Vcl-xL – в 1,89 раза в ткани аденокарциномы толстого кишечника превышало данный показатель для УНТ. Показано уменьшение микровязкости аннулярных липидов и увеличение микровязкости общей липидной фазы внутренней митохондриальной мембраны опухолевых тканей. Эффективность гашения триптофановой флуоресценции мембранных белков и степень погружения их в толщину бислоя для тканей КА выше по сравнению с УНТ. Модификации физико-химических свойств ВММ в ткани КА по сравнению с УНТ состоят в конформационных изменениях белковых макромолекул, уменьшении структурной упорядоченности липидного бислоя, изменении топографии белок – липидных комплексов и характера взаимодействий между белковой и липидной компонентами.

Полученные данные свидетельствуют о повышении уровня митохондриальных антиапоптотических белков на более поздних стадиях опухолевой прогрессии при колоректальном раке. Показаны изменения структурно-динамических особенностей ВММ в опухолевых тканях, что может указывать на возможное значение структурных модификаций митохондрий в изменении их функциональных свойств.

Влияние аминокислотных замещений вблизи молекул бактериохлорофиллов на свойства реакционного центра пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides*

Фуфина Т.Ю. (Пуцино, tat-fufina@yandex.ru)

Фотосинтетические реакционные центры (РЦ) – это мембраносвязанные пигмент-белковые комплексы, в которых осуществляются первичные процессы преобразования световой энергии. РЦ пурпурной бактерии *Rba. sphaeroides* состоит из 10 кофакторов переноса электрона и трех белковых субъединиц (L, M, H). Кофакторы представлены димером бактериохлорофилла (БХл), который является первичным донором электрона (Р), двумя молекулами мономерных БХл (В), двумя молекулами бактериофеофитина (БФео), двумя хинонами, молекулой каротиноида и атомом негемового железа. Отличительной особенностью РЦ является наличие двусторонней оси симметрии, относительно которой расположены активная (А) и неактивная (В) ветви переноса электронов. Белковые субъединицы не только представляют собой остов, поддерживающий компоненты РЦ в определенной ориентации, но и принимают непосредственное участие в процессе переноса электрона. Именно поэтому необходимо изучение роли пигмент – белковых взаимодействий в процессе электронного транспорта в РЦ.

Целью работы было исследование влияния аминокислотных замещений вблизи молекул БХл первичного донора электрона (РА) и мономерного БХл неактивной ветви (ВВ) на свойства РЦ *Rba. sphaeroides*.

Методом сайт-направленного мутагенеза были получены РЦ *Rba. sphaeroides* с замещениями I(L177)H, I(L177)H+H(L173)L, I(L177)H+H(M182)L. Было отмечено, что в модифицированных РЦ наиболее выраженные изменения спектральных и фотохимических свойств произошли в области поглощения молекул БХл.

Впервые получены РЦ, где в результате единичной замены I(L177)H образуется ковалентная связь между L-белковой субъединицей РЦ и молекулой БХл. Интересным представляется тот факт, что образование ковалентной связи между белковой субъединицей и БХл не оказало влияния на квантовый выход разделения зарядов. Результатом замены I(L177)H стало также образование шестой координационной связи к атому магния молекулы БХл В_В. Известно, что His-L173 является лигандом к атому магния молекулы БХл Р_А. При замене его на гидрофобный Leu молекула БХл утрачивает центральный атом магния и превращается в БФео. Нами показано, что в РЦ двойного мутанта H(L173)L+I(L177)H при замене гистидина L173 на лейцин образования БФео в позиции Р_А не происходит, и первичный донор электрона остается гомодимером БХл. Это дает возможность предположить, что в РЦ H(L173)L+I(L177)H лигандом к атому магния является His L177.

В РЦ H(M182)L+I(L177)H удаление лиганда молекулы БХл В_В не приводит к образованию БФео. Спектральные изменения указывают на то, что молекула БХл В_В образует пятую координационную связь с лигандом (возможно молекулой воды) с бета стороны молекулы пигмента. В РЦ H(M182)L+I(L177)H отмечается первый случай бета – лигандирования БХл В_В в фотосинтетическом реакционном центре.

Автор выражает благодарность научным руководителям д.б.н., академику В.А. Шувалову и к.б.н. Л.Г. Васильевой. Работа проводилась при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям Российской Академии Наук, программы «Молекулярная и клеточная биология» №10П), гранта Президента Российской Федерации № НШ-3277.2006.4

Разработка высокочувствительного твердофазного иммуноферментного анализа для определения концентрации миелопероксидазы при различных патологиях

Черкалина О.С. (Санкт-Петербург, tcherkalina@yandex.ru)

Миелопероксидаза (МПО) – прооксидантный фермент лейкоцитов является маркером воспалительных заболеваний. Повышение МПО при инфаркте миокарда связано с риском смертельного исхода. Для точного измерения уровня МПО, мы разработали высокочувствительный твердофазный иммуноферментный метод определения концентрации МПО в образцах биологических жидкостей. В нашем методе используются два вида антител против МПО, полученных от разных видов лабораторных животных, крыс и кроликов. Моноспецифические поликлональные антитела против МПО человека получали путем иммунизации кроликов и крыс. Для измерения содержания МПО в образцах, проводили пассивную сорбцию антител крыс против МПО на полистирольной поверхности лунок планшета. Затем в лунки вносили образцы и, после сорбции, в лунки добавляли антитела кролика против МПО. После этого добавляли в систему меченные пероксидазой хрена антитела против антител кролика, затем хромогенный субстрат. После развития окраски, данные считывали на планшетном фотометре. Концентрацию МПО в биологических образцах рассчитывали по калибровочному графику. На этапе разработки метода были подобраны оптимальные условия сорбции антител крысы на поверхности планшета (рН буферного раствора, время сорбции, концентрация антител), разведения стандартных растворов и образцов, антител кролика и меченных пероксидазой антител. Проведенные измерения показали, что концентрация МПО составляет 0.15 – 0.35 мкг/мл в сыворотке крови здоровых доноров и повышается до 0.75 – 0.9 мкг/мл у больных атеросклерозом, и до 0.8 – 4

мкг/мл у больных с воспалительными процессами различной степени тяжести. Исследование поддержано грантом РФФИ № 06-04-48602.

Исследование кинетических характеристик связывания белков теплового шока HSP70 с антигенными пептидами

Черников В.А. (Москва, vladimir-chernikov@rambler.ru)

Белки теплового шока HSP70 представляют интерес как адъювантные молекулы для создания противоопухолевых вакцин. Это обуславливается их шаперонными функциями внутри клеток и возможностью участия в механизме кросс-презентации антигенов при попадании во внутреннюю среду организма. Целью нашего исследования было выяснение закономерностей связывания различных представителей семейства HSP70 с HLA-A2-рестриктивными пептидами.

Белки HSP70_{A1B}, HSC70 были получены стандартными методами генной инженерии согласно известным последовательностям (GenBank NM_005346 и GenBank NM_006597). Были получены гибридные белки HSP70_{HYB} и HSC70_{HYB}, составленные из АТФ-азного домена HSC70 и субстрат-связывающего домена HSP70_{A1B}, соответственно. Выделение белков проводилось с помощью Ni²⁺-хелатной хроматографии, чистота составляла не менее 95% по SDS-электрофорезу. Спектры белков в диапазоне 200-380 нм были получены при помощи спектрофотометра BIO-RAD SmartSpec 3000. Анализ спектров производился при помощи ПО OriginPro 7.5. АТФ-азная активность белков измерялась колориметрическим методом по количеству образовавшегося фосфата. Комплексы с HLA-A2-рестриктивными пептидами YMLDLQPETT (E7), ALFDIESKV (PSMA), VVLDSLPMV (NS5), YLLPRRGPR (HCV2a) и ITDQVPFSV (gp100) получали инкубацией 40 мкг белка с 2,5, 5, 10 и 20-и кратным избытком индивидуального пептида или их смеси в отсутствие или присутствии 1, 2, 3 или 5 мМ ADP в течение 30, 60, 90, 120 и 180 мин, при pH 6.0 и 8.0 и температуре 4, 15, 25 и 37°C. Свободный пептид отделяли на Ni²⁺-сефарозе с помощью mini-spin фильтра согласно инструкциям производителя. Общее количество комплексов определяли по величине АТФ-азной активности. Количество меченого FITC пептида определяли колориметрическим методом.

В результате проведенных исследований обнаружено различное влияние концентрации ADP на динамику образования комплексов пептидов с HSP70_{A1B}, HSC70 и HSP70_{HYB}. Получить комплексы с HSC70_{HYB} не удалось. Описаны стереотипные изменения спектров HSP70_{A1B}, HSC70 и HSP70_{HYB} в процессе связывания с пептидами и при различных значениях pH. Спектральные изменения, наблюдаемые у HSC70_{HYB}, отличались от остальных белков. Сходства изменений спектров при изменении pH среды и в процессе образования комплексов выявить не удалось. Обнаружена разная степень сродства HSP70_{A1B} и HSC70 к одним и тем же пептидам. Избирательность связывания HSP70_{HYB} с исследованными пептидами практически не отличалась от HSP70_{A1B} при изменении характера кинетики связывания с пептидами. Исследования влияния pH среды на связывание HSP70 с пептидами показали усиление связывания пептидов с изоэлектрической точкой близкой к значению pH среды. Максимальное количество пептидных комплексов с HSP70_{A1B}, HSC70 и HSP70_{HYB} образовывалось при температуре 25°C. Было показано уменьшение константы диссоциации (K_d) комплексов HSP70_{A1B} и HSC70 с увеличением концентрации ADP при повышении констант скоростей прямой и обратной реакций. Зависимость K_d пептидных комплексов HSP70_{HYB} от концентрации ADP носила сложный характер и различалась для пептидов с различной аффинностью. Обнаружено также вытеснение низкоаффинных пептидов из состава комплексов при увеличении суммарного соотношения пептид:белок.

Таким образом, были определены оптимальные параметры для нагрузки пептидами белков HSP70 *in vitro*. Сделано предположение об определяющем влиянии АТФ-азного

домена на пептид-связывающую функцию HSP70. Были определены основные кинетические характеристики взаимодействия пептидов с белками. Исследования выполнены при поддержке Совета по грантам президента РФ (Грант НШ-4018.2008.7). Автор выражает признательность проф., члену-корр. РАН, д.х.н. С.Е. Северину и в.н.с., к.б.н. Н.В. Гороховец за помощь в подготовке тезисов.

Виментиновые промежуточные филаменты регулируют потенциал митохондрий
Черноиваненко И.С. (Москва, ivansblack@yandex.ru)

С митохондриями связаны такие процессы, как синтез АТФ и продукция активных форм кислорода, регуляция внутриклеточной концентрации ионов кальция и программированная клеточная смерть – апоптоз. Важную роль в функционировании митохондрий играет их внутриклеточное распределение, которое достигается в результате их взаимодействия с различными структурами цитоскелета. Транспорт и локализации митохондрий в клетках являются одной из важнейших тем в клеточной биологии.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что виментиновые промежуточные филаменты (ПФ) ингибируют транспорт митохондрий. Ингибирование обусловлено прямым взаимодействием митохондрий с центральной частью N-концевого домена молекулы виментина. ПФ, сформированные из виментина с делецией этого участка, не влияли на подвижность митохондрий. В настоящей работе нами исследовалось влияние ПФ на свойства митохондрий. Одной из используемых характеристик функционального состояния митохондрий является энергизованность их внутренней мембраны или трансмембранный электрохимический потенциал.

В качестве экспериментальной модели нами использовались клетки линии MFT-16, полученные из мышцы с нокаутом гена виментина и не содержащие ПФ. В этих клетках систему ПФ можно восстановить при помощи экспрессии гена виментина человека или его мутантных форм.

Для сравнения уровня мембранного потенциала митохондрий использовали систему двух специфических митохондриальных красителей – потенциал-зависимого и потенциал-независимого. С помощью прижизненной флуоресцентной видеомикроскопии получали изображения окрашенных клеток, на которых затем измеряли интенсивность флуоресценции отдельных митохондрий. Уровень потенциала митохондрий в клетках определяли по среднему значению интенсивности с учетом ошибки.

Мы обнаружили, что восстановление сети ПФ при помощи виментина дикого типа увеличивает потенциал митохондрий. В тоже время экспрессия виментина с делецией в 26 аминокислот в N-концевой части молекулы (44-69) не влияет на потенциал митохондрий. Видимо, именно этот участок виментина непосредственно взаимодействует с наружной мембраной митохондрий и участвует в регуляции их потенциала.

Таким образом, в данной работе показан новый способ регуляции мембранного потенциала митохондрий с помощью виментиновых ПФ, а также выявлен участок молекулы виментина, отвечающий за эту регуляцию.

**Рекомбинантный С-концевой фрагмент альфафетопротейна человека
как основа для адресной доставки цитостатиков**
Шарапова О.А. (Москва, sharapova_o@hotmail.com)

Проблема повышения эффективности действия противоопухолевых препаратов в отношении резистентных к химиотерапии опухолевых клеток актуальна и в настоящее время. Одним из наиболее многообещающих путей создания перспективных

лекарственных препаратов является повышение эффективности традиционных химиотерапевтических препаратов за счет их направленного транспорта к клеткам мишеням с помощью белковых молекул. Преимущество данного подхода заключается в возрастании селективности противоопухолевых препаратов, ограничении побочных токсических эффектов на организм человека, а также повышении восприимчивости опухолевых клеток к лекарственному воздействию.

В качестве векторной молекулы нами был выбран альфафетопротеин человека (АФП). Рецепторы этого белка экспрессируются в значительном количестве на разных типах опухолевых клеток (рак легких, печени, молочной железы и пр.), в отличие от нормальных клеток. Существуют данные о том, что конъюгаты нативного АФП с цитостатиками ингибируют рост раковых клеток *in vivo* и *in vitro*. Природный АФП получают из абортивного материала, что связано с техническими и этическими проблемами и ограничениями. Таким образом, необходимо использовать рекомбинантные формы белка.

Полноразмерный нативный АФП содержит 15 S-S связей, поэтому очень сложно получить его в функциональном состоянии. Необходимо было выбрать оптимальный фрагмент АФП, который связывается с рецептором, и разработать методику его выделения, очистки и эффективной ренатурации.

Имеющиеся данные указывают на то, что сайт связывания белка с рецептором находится в С-концевом фрагменте АФП. Был создан генно-инженерный конструкт, содержащий С-концевой фрагмент белка. Была разработана методика его эффективной ренатурации. Его функциональная активность была показана в экспериментах *in vitro* на линии клеток аденокарциномы человека SCOV3, на поверхности которых есть рецепторы АФП, и лимфоцитах человека в качестве отрицательного контроля. Меченный флуоресцентной меткой фрагмент АФП специфически взаимодействовал с рецепторами на поверхности раковых клеток и накапливался ими с такой же эффективностью, как и полноразмерный нативный АФП. С лимфоцитами полученный белок не связывался.

В настоящее время ведется работа по подбору условий конъюгации полученного фрагмента с широко используемым в химиотерапии цитостатиком доксорубицином.

Исследование влияния пропоследовательности на биологические свойства и фолдинг нейротрофинов человека

Шкурина Е.Е., Рафиева Л.М. (Москва, keyushka@yandex.ru)

Нейротрофины – семейство нейрональных белков, регулирующих рост, дифференцировку и выживаемость нейронов. Как большинство секреторных белков, нейротрофины синтезируются в клетках в виде предшественников – препронейротрофинов, процессирующихся с образованием зрелых белков. Исследование функциональной роли пропоследовательностей как в формировании пространственных структур нейротрофинов, так и в модуляции их биологической активности, представляет в настоящее время огромный интерес. Изучение механизмов сворачивания и процессинга пронейротрофинов, а также установление роли пропоследовательности, является важным элементом для понимания механизмов биохимической регуляции функционирования нервной системы человека в норме и при патологии.

Целью данной работы было исследование влияния пропоследовательности на биологические свойства и фолдинг рекомбинантных нейротрофинов человека NGF и BDNF.

На основе штамма *Escherichia coli* BL-21 нами сконструированы рекомбинантные продуценты предшественников NGF и BDNF человека, а также их индивидуальных пропоследовательностей и зрелых частей. Для всех целевых белков разработаны условия очистки и подобраны оптимальные условия фолдинга. Проанализирована олигомерная

организация этих белков методом гель-проникающей хроматографии. Показано, что зрелые нейротрофины человека NGF и BDNF могут формировать функционально активные гомодимеры без участия пропоследовательностей. Для NGF впервые осуществлен фолдинг в присутствии экзогенной, не связанной ковалентно, собственной про-части, существенно увеличивающей выход активного нейротрофина при сворачивании. Эти данные позволяют предположить, что фолдинг нейротрофина NGF протекает по про-зависимому механизму. При этом наличие ковалентной связи между пропептидом и зрелой частью NGF не является необходимым условием фолдинга. Впервые продемонстрирована способность не связанной ковалентно чужеродной пропоследовательности направлять фолдинг NGF.

Для оценки биологической активности нейротрофинов были использованы клетки феохромоцитомы крысы линии PC12 и клетки эритролейкемии человека TF-1.

Методом гель-проникающей хроматографии проанализировано сворачивание различных форм нейротрофина BDNF человека – зрелой части, предшественника и про-части. Показано, что пропоследовательность не влияет на эффективность фолдинга зрелого BDNF человека, из чего следует, что сворачивание данного белка пропептид-независимое.

Пропоследовательности NGF и BDNF не обладают собственной дифференцирующей или пролиферативной активностью в использованных экспериментальных системах.

Таким образом, хотя зрелые нейротрофины NGF и BDNF высокомолекулярны и способны оказывать на нейрональные и глиальные клетки схожие эффекты, фолдинг их протекает по разным механизмам. Функции их пропептидов, по-видимому, также различны.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №06-04-48690.

Активность мембранных ферментов в клетках слизистой оболочки желудка при экспериментальной язве

Юзефович Ю.М., Ковалева В.А. (Киев, Украина, yuzefovych@gmail.com)

Язвенная болезнь (ЯБ) относится к числу наиболее распространенных заболеваний и представляет собой серьезную проблему для здравоохранения, так как носит хронический характер, часто рецидивирует и дает многочисленные осложнения. Несмотря на достигнутые результаты в изучении разных аспектов этиологии, патогенеза и лечения ЯБ сегодня остается ряд нерешенных и спорных вопросов, дать ответ на которые можно исследовав ультраструктурные особенности язвенного дефекта и приблизившись к пониманию тонких механизмов ulcerogenesis. Это даст возможность разработки новых комплексных методов диагностики, лечения и позволит более эффективно влиять на ход данного заболевания.

Целью исследования было определить активность мембраносвязанных ферментов 5'-нуклеотидазы (5'-АМФазы), Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы и Na^+ , K^+ -АТФазы в клетках слизистой оболочки желудка (СОЖ) крыс при разных экспериментальных моделях язвы (аспириновая, этаноловая и стрессовая).

В эксперименте использовали белых крыс линии Вистар весом 130-150 г. Нейродистрофические поражения желудка получали по модели иммобилизационного стресса в модификации С.Д. Гройсмана и Т.Г. Каревинной. Этаноловые язвы вызывали методом Окабе. Аспириновую язву желудка индуцировали пероральным введением аспирина. Плазматические мембраны (ПМ) получали из гомогената СОЖ путем нескольких последовательных центрифугирований. Активность 5'-нуклеотидазы, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы и Na^+ , K^+ -АТФазы рассчитывали по количеству неорганического фосфата методом Фиске-Суббароу.

В результате наших исследований установлено, что при этаноловой язве активность 5'-АМФазы снижается в 1,8 раза, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы в 1,4 раза, Na^+ , K^+ -АТФазы – в 2

раза по отношению к контролю. При стрессовой язве показано снижение активности 5'-АМФазы в 1,5 раза, активность Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы и Na^+ , K^+ -АТФазы была очень низкой. Исследование активности Na^+ , K^+ -АТФазы при аспириновой язве показало ее снижение в 2 раза, активность 5'-АМФазы и Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы при этой модели язвы достоверно не изменялась.

Полученные результаты свидетельствуют о снижении активности ферментов ПМ: 5'-нуклеотидазы, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы и Na^+ , K^+ -АТФазы в клетках СОЖ при экспериментальной язве, что указывает на вовлечение ферментов в цепь патологических событий. Будучи маркерными ферментами ПМ, исследованные АТФазы могут служить также маркерами патологических состояний СОЖ и других тканей и органов, диагностическим и прогностическим критерием развития заболевания, в том числе и ЯБ желудка.

Автор выражает признательность профессору, д.б.н. Л.И. Остапченко за помощь в подготовке тезисов.