

**СЕКЦИЯ «БИОЛОГИЯ»****ПОДСЕКЦИЯ «БИОХИМИЯ»****Исследование функционального взаимодействия между NMDA-рецепторами и Na/K-АТФазой в нейронах мозжечка***Аккуратов Евгений Евгеньевич**студент**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия**E-mail: eea-msu@mail.ru*

Глутаматные рецепторы – одни из самых распространенных типов рецепторов в нервной ткани. Класс глутаматных рецепторов, активируемых N-метил-D-аспаратом (NMDA), - NMDA-рецепторы – ответственен за когнитивные процессы в мозге - консолидацию памяти и процессы обучения [1]. Их активация приводит к увеличению внутриклеточной концентрации кальция, и, следовательно, к повышению уровня активных форм кислорода (АФК). При повышении уровня гомоцистеина (структурного аналога глутамата и NMDA) создаются условия для возникновения заболеваний сердечно-сосудистой и нервной систем, поэтому изучение влияния гомоцистеина на NMDA-рецепторы представляется актуальной проблемой. Представляется также важным выяснить взаимодействие NMDA-рецепторов с другими мембранными белками. В этом отношении привлекает внимание недавно открывшаяся вторая роль сердечных гликозидов – «привлекать» трансмембранный фермент Na/K-АТФазу к участию во внутриклеточной сигнализации [2]. При взаимодействии убаина (один из сердечных гликозидов) также происходит повышение АФК, а также синтез элементов клеточного сигналинга. Недавно в литературе появились данные о функциональной связи NMDA-рецепторов и Na/K-АТФазы [3]. Целью настоящей работы является попытка установить пути взаимодействия между этими белками.

Объектом исследования была выбрана суспензия нейронов, выделенных из мозжечка. В работе использовались методы проточной цитометрии для определения уровня АФК и кальция в нейронах, а также измерение активности Na/K-АТФазы путем определения высвобождающегося фосфата в результате каталитического цикла, методы электрофореза и Western-blotting для выявления агрегации Na/K-АТФазы и NMDA-рецепторов.

Показано совместное влияние на активность митоген-активированной киназы Na/K-АТФазы и NMDA-рецепторов нейрональной ткани и исследовано участие активных форм кислорода и кальция во взаимосвязи данных белков. Показано влияние активации NMDA-рецепторов на активность Na/K-АТФазы. Показана большая чувствительность E2-конформации Na/K-АТФазы к действию окислителей.

**Литература**

1. Asztely F. Iontropic glutamate receptors: Their role in the expression of hippocampal synaptic plasticity./F. Asztely, B. Gustafsson//Mol Neurobiol. – 1996. – 12. – 1–11.
2. Zijian X., Askari A.. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase as a signal transducer.//Eur. J. Biochem. – 2002 – 269 – 2434–2439
3. Болдырев А., Булыгина Е., Герасимова О., Ляпина Л., Шонер В. Функциональная взаимосвязь между Na/K-АТФазой и NMDA-рецепторами в гранулярных клетках мозжечка крыс//Биохимия. 2004. 69, 4, 530 – 536.

## Влияние пролина на тепловую денатурацию, инактивацию и агрегацию мышечной гликогенфосфоорилазы *b*<sup>1</sup>

Бажина Светлана Георгиевна<sup>2</sup>

студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: svetabaj@gmail.com

Гетероциклическая аминокислота пролин привлекает внимание исследователей как агент, подавляющий агрегацию белков, поскольку она обладает рядом уникальных свойств. Пролин обладает исключительно высокой растворимостью в воде (до 7М при комнатной температуре) и повышает растворимость в воде гидрофобных соединений. В настоящей работе для выяснения механизма влияния пролина на тепловую агрегацию белков проведено комплексное исследование тепловой инактивации, денатурации и агрегации гликогенфосфоорилазы *b* (Phb) из скелетных мышц кролика в присутствии пролина.

При изучении влияния пролина на термоинактивацию Phb при 48°C изменение каталитической активности фермента регистрировали с помощью турбидиметрического метода. Показано, что низкие концентрации пролина (до 0,1М) уменьшают величину лаг-периода на кинетической кривой инактивации и ускоряют дальнейшую инактивацию фермента. Высокие концентрации пролина (1,5М), напротив, увеличивают длительность лаг-периода и снижают скорость термоинактивации. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии было показано, что малые концентрации пролина не влияют на денатурацию Phb, а высокие концентрации пролина (1,0-2,0М) стабилизируют фермент, что проявляется в смещении профиля теплопоглощения в область более высоких температур. Обнаруженное стабилизирующее действие пролина характерно для краудинг-агентов.

Влияние пролина на кинетику агрегации Phb при 48°C изучали методом динамического светорассеяния. Кинетические кривые увеличения интенсивности светорассеяния во времени характеризуются наличием лаг-периода. Длительность лаг-периода ( $t_0$ ) растет с увеличением концентрации пролина от значения  $t_0 = 4.0$  мин в отсутствие пролина до значения  $t_0 = 8.0$  мин в присутствии 1М пролина. Поскольку начальной стадией тепловой агрегации является стадия разворачивания белковой молекулы, подобное увеличение длительности лаг-периода в присутствии пролина объясняется стабилизацией нативного состояния Phb в присутствии этого краудинг-агента. Характер зависимости гидродинамического радиуса  $R_h$  от времени указывает на то, что агрегация протекает в диффузионно-контролируемом режиме. Начиная с определенного момента времени, обозначаемого как  $t^*$ , зависимость  $R_h$  от времени описывается степенной функцией:  $R_h = R_h^* [1 + K_2(t - t^*)]^{d_f}$ , где  $R_h^*$  - величина  $R_h$  при  $t = t^*$ ,  $K_2$  - константа, и  $d_f$  - фрактальная размерность агрегатов (величина  $d_f$  близка к 1,8). Диффузионно-контролируемый режим агрегации сохраняется в присутствии пролина.

<sup>1</sup> Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках грантов РФФИ (гранты № 08-04-00666-а и 06-04-39008-ГФЕН\_а).

<sup>2</sup> Автор выражает признательность д.б.н. Чеботаревой Н.А. и проф. Курганову Б.И. (Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН) за помощь в подготовке тезисов.

**Исследование фосфорилирования белков микросомальных препаратов, обогащенных Na,K-АТФазой, из почек суслика *Spermophilus undulatus*****Басевич Евгений Викторович**

аспирант

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: basevichev@mail.ru

Одним из адаптационных приспособлений мелких млекопитающих к выживанию в зимний период является гибернация (зимняя спячка) – 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 накопившиеся 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. Нами показано, что при гибернации в 2–3 раза снижается активность Na,K-АТФазы в почках типичного гибернатора – суслика *Spermophilus undulatus*. Известно, что такое же снижение активности Na,K-АТФазы в скелетных мышцах суслика *Spermophilus lateralis* связано с фосфорилированием этого фермента эндогенными протеинкиназами [MacDonald J.A., Storey K.B. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 254, 424–429]. Поэтому мы исследовали уровень фосфорилирования белков микросомальных препаратов, обогащенных Na,K-АТФазой, из наружного медуллярного слоя почек суслика *Spermophilus undulatus*. С помощью моноклональных антител на фосфосерин и фосфотреонин не было обнаружено различий в исходном уровне фосфорилирования белков по остаткам Ser и Thr. Однако в условиях *in vitro* фосфорилирование микросомальных белков эндогенными протеинкиназами в присутствии ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)АТФ показало, что при гибернации уровень включения радиоактивной метки в белки микросом ниже, чем уровень фосфорилирования белков в препаратах из почек активных сусликов. Это может объясняться тем, что при гибернации изменяется содержание некоторых белков в медуллярном слое почек. Методом автордиографии показано, что в препаратах из почек спящих сусликов происходит фосфорилирование белка с кажущейся молекулярной массой 15 кДа, являющегося, возможно,  $\gamma$ -субъединицей Na,K-АТФазы или каким-то другим регуляторным белком. При этом в препаратах из почек активных сусликов этот белок практически не фосфорилирован. Содержание этого белка в микросомальных фракциях из почек спящих сусликов на 12% выше, чем в препаратах из почек активных сусликов. Также показано, что уровень фосфорилирования белка с молекулярной массой 45 кДа в почках спящих сусликов уменьшается на 30%, при этом содержание этого белка в микросомальных препаратах, определенное по электрофореграммам, не имеет сезонных различий. Помимо этого на автордиограммах видно слабое фосфорилирование белков с молекулярными массами 145 и 66 кДа, не несущее сезонных различий. Фосфорилирование Na,K-АТФазы, которое приводит к ингибированию фермента, не обнаружено. Таким образом, полученные данные позволяют предполагать, что в микросомальных фракциях из наружного медуллярного слоя почек суслика присутствуют белки, фосфорилирование которых может являться одним из механизмов регуляции активности Na,K-АТФазы в почках. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 03-04-48661 и 08-04-00823.

## Выявление активности глюкантрансферазы Vgl2p клеточной стенки дрожжей *in vitro* в присутствии высокомолекулярных полифосфатов

Безсонов<sup>1</sup> Евгений Евгеньевич, Горковский<sup>3</sup> Антон Александрович, Егоров<sup>1</sup> Сергей Николаевич, Арбатский<sup>2</sup> Николай Петрович, Калебина<sup>1</sup> Татьяна Сергеевна, Кулаев<sup>1</sup> Игорь Степанович

Аспирант; аспирант; сотрудник, доктор биол. наук; сотрудник, кандидат хим. наук; сотрудник, доктор биол. наук, профессор; чл.-корр. РАН, профессор

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

<sup>2</sup>Институт органической химии РАН, Москва, Россия; <sup>3</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пуцино, Россия

E-mail: bzhenya1@yandex.ru

Высокомолекулярные неорганические полифосфаты (ВМПФ) играют важную роль в регуляции метаболических процессов у мицелиальных грибов и дрожжей, присутствие ВМПФ в клеточной оболочке данных организмов было показано с помощью многих методов. Известно, что ВМПФ способны влиять на активность некоторых ферментов грибов [1]. Клеточная стенка (КС) дрожжей содержит большое количество ферментов, способных гидролизовать ее структурные компоненты (в первую очередь глюкан). Перегруппировки глюканового каркаса КС, происходящие постоянно на различных стадиях жизненного цикла дрожжевой клетки, требуют четкого механизма активации работы глюканаз и трансфераз, которая происходит за пределами цитоплазматической мембраны, а также перевода данных ферментов из активированной формы в малоактивную. Механизм регуляции работы данного типа ферментов оставался неизвестным до настоящего времени. Глюкантрансфераза Vgl2p, мажорный конститутивный белок КС дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, является примером таких ферментов - по данным литературы Vgl2p встраивает маннопротеины в состав КС [2]. В нашей работе мы использовали ВМПФ с длиной цепи 150 (ВМПФ именно с такой длиной цепи детектировали в КС по данным литературы), с целью проверки их влияния на активность Vgl2p. Определение активности Vgl2p проводили с использованием оригинального метода, разработанного нами. Показано, что в отсутствие ВМПФ глюкантрансферазная активность данного белка *in vitro* не детектируется, тогда как в присутствии ВМПФ Vgl2p активизируется. Обнаружено, что конститутивная кислая фосфатаза (КФ), которая в норме присутствует в составе КС [3], гидролизует ВМПФ. Отсутствие кислых фосфатаз в КС приводит к снижению ее прочности и значительному увеличению размеров дрожжевых клеток. На основе полученных данных можно предположить, что КФ участвуют в инактивации Vgl2p путем гидролиза ВМПФ, в связи с чем нами была предложена гипотетическая схема, в которой описана последовательность событий при переходе Vgl2p из неактивного состояния в активное и обратно.

### Литература

1. Kulaev I.S., Vagabov V.M., Kulakovskaya T.V. The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates (Second Edition). John Wiley & Sons, Ltd. 2004.
2. Калебина Т.С., Кулаев И.С. Роль белков в формировании молекулярной структуры клеточной стенки дрожжей//Успехи биологической химии. 2001, 41, 105-130.
3. Andreeva N. A., Okorokov L. A. Purification and characterization of highly active and stable polyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* cell envelope.//Yeast. 1993, 9, 127-139.

**Карнозин замедляет скорость кислотного гемолиза эритроцитов, отягощенного воздействием гомоцистеиновой кислоты**

**Беляев Михаил Сергеевич, Трунова Ольга Андреевна\***

*аспирант, студент\**

*Российский университет дружбы народов; Научный центр неврологии РАМН, Москва, Россия*

*osb204m@mail.ru*

В настоящей работе проведено исследование влияния гомоцистеиновой кислоты на характер протекания кислотного гемолиза и рассмотрена возможность защиты эритроцитов от действия гемолитических факторов.

Гомоцистеиновая кислота (ГЦК) – производное серосодержащей аминокислоты гомоцистеина. Повышение его концентрации в плазме крови считается независимым фактором риска атеросклероза, тромбоза, сосудистых заболеваний, а также грозит ранним развитием нервно-психических заболеваний, осложнений при беременности [1]. Целостность мембран эритроцитов и их устойчивость к повреждающим факторам существенно зависит от общего антиоксидантного статуса организма. Устойчивость эритроцитов к гемолитическому воздействию определяется многими факторами, в том числе возрастом клеток и состоянием их клеточной мембраны. Подверженность эритроцитарной мембраны гемолизу может служить интегральным показателем жизнеспособности клеток [2].

На модели кислотного гемолиза, вызванного воздействием соляной кислоты *in vitro*, нами было показано, что присутствие гомоцистеиновой кислоты значительно увеличивает скорость протекания гемолиза и уменьшает lag-период, то есть увеличивает скорость разрушения эритроцитарных мембран. Выявлено, что 5-мин преинкубация эритроцитов человека с 0,25мМ ГЦК вызывает резкое уменьшение lag-периода кислотного гемолиза (в 3-4 раза), а максимальная скорость достигается к 20 мин. Без преинкубации с ГЦК продолжительность lag-периода составляет 2-3 мин (в зависимости от образца крови). Эффект ГЦК зависит от времени преинкубации эритроцитов с этим фактором. В то же время, гомоцистеиновая кислота в концентрациях, близких к содержанию ГЦК у лиц с гипергомоцистеинемией, в условиях *in vitro* способна вызывать гемолиз сама по себе, хотя в этом случае скорость протекания гемолиза на порядок ниже. Ранее Арзуманян Е.А. было показано, что гомоцистеиновая кислота ускоряет скорость гемолиза эритроцитов. В наших исследованиях было подтверждено, что карнозин защищает эритроциты от действия ГЦК [3]. Предварительная инкубация эритроцитов с карнозином замедляет скорость гемолиза, но не оказывает существенного влияния на lag-период. Также нами был установлен характер зависимости продолжительности lag-периода и начальной скорости гемолиза от времени преинкубации эритроцитов с ГЦК *in vitro*.

#### **Литература**

1. Шевченко О.П., Олефиренко Г.А., Червякова Н.В. Гомоцистеин. М.: Реафарм, 2002. – 48 с.
2. Тюлина О.В., Стволинский С.Л., Каган В.Е., Болдырев А.А. Влияние карнозина и его природных производных на хемилюминесценцию лейкоцитов, активированных  $\text{BaSO}_4$ .//Нейрохимия, 12, 1, 1995. 46-51.
3. Арзуманян Е.С. Защитное действие карнозина на гемолиз эритроцитов, ускоренный гомоцистеиновой кислотой.//Новые лекарственные препараты. М.: 2007, 9, 12-15.

**Влияние ADP на  $\Delta\mu_{H^+}$ -зависимую регуляцию активности  $F_0\cdot F_1$ -АТРазы*****Paracoccus denitrificans*****Бродягина Наталья Александровна**

студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: NataliaAlBr@mail.ru

Исследовали потенциал-активируемый гидролиз АТФ и его субстратного аналога ГТФ, катализируемый  $F_0\cdot F_1$ -АТФазой прочно-сопряженных суббактериальных частиц почвенной бактерии *Paracoccus denitrificans*. Гидролиз нуклеотидов регистрировали по изменению рН реакционной среды в присутствии рН-чувствительного индикатора фенолового красного. АТФ-гидролазная активность  $F_0\cdot F_1$ -АТФ-синтазного комплекса *Paracoccus denitrificans* сильно возрастает в результате энергизации мембран, добавление разобщителей приводит к быстрой и полной де-активации АТФазы [1,2]. Показано, что в этих условиях кинетика гидролиза АТФ и ГТФ качественно не различается: гидролиз ГТФ активируется после энергизации мембран, и эта реакция также полностью чувствительна к разобщителю. При измерении кинетики гидролиза нуклеозидтрифосфатов (НТФ) в присутствии НТФ-регенерирующей системы (пируваткиназа + ФЕП) разобщение частиц также приводит к ингибированию гидролиза АТФ. Однако мы обнаружили, что в тех же условиях гидролиз ГТФ не чувствителен к разобщителю. Различия в кинетике гидролиза двух нуклеотидов в различных условиях измерения могут быть объяснены разницей в концентрациях ADP в среде, который может быть привнесен как примесь с препаратом АТФ (~ 1-10 мкМ) и/или с препаратом частиц (~ 0,1-1 мкМ). При гидролизе ГТФ в присутствии НТФ-регенерирующей системы достигалось значительное снижение ADP в среде (<1 мкМ). С целью получить препарат частиц свободный от ADP мы обработали мембраны *Paracoccus denitrificans* щелочной фосфатазой, ферментом, необратимо расщепляющим ADP. Однако, ГТФазная активность такого препарата, измеренная по  $H^+$ -иону оставалась чувствительной к разобщителю. Мы сравнили влияние пируваткиназы и щелочной фосфатазы на кинетику де-активации де-энергизованного фермента, и показали, что если частичное удаление ADP (в присутствии пируваткиназы) значительно тормозит де-активацию фермента, то полное удаление ADP (в присутствии щелочной фосфатазы) приводит к его инактивации. Мы предполагаем, что ADP в концентрации, соизмеримой с концентрацией фермента, необходим для сохранения  $F_0\cdot F_1$ -АТФазной активности в де-энергизованных мембранах.

**Литература**

1. Жарова Т.В., Виноградов А.Д. (2003) Протон-транслоцирующая АТФ-синтаза *Paracoccus denitrificans*: АТФ-гидролазная активность. *Биохимия*, **68**, 1370 – 1380.
2. Zharova T.V., Vinogradov A.D. (2004) Energy-dependent transformation of  $F_0F_1$ -ATPase in *Paracoccus denitrificans* plasma membranes. *J. Biol. Chem.*, **279**, 12319 – 12324.

**Влияния гомоцистеина и гомоцистеиновой кислоты на генерацию активных форм кислорода нейтрофилами грызунов****Брюшкова Екатерина Александровна***студентка**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия**E-mail: kitty\_scarlett@mail.ru*

Гомоцистеин (ГЦ) и различные продукты его окисления, в частности гомоцистеиновая кислота (ГЦК), являются факторами риска при возникновении многих сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний, таких как атеросклероз, инфаркт миокарда, ишемическая болезнь сердца, инсульт, болезнь Альцгеймера [3]. Считается, что ГЦ, находясь в крови в избыточной концентрации (больше 15μМ), оказывает патологическое воздействие на эндотелиальные клетки, клетки гладкой мускулатуры сосудов, а также на клетки крови, в которых ГЦ, по видимому, способен регулировать образование активных форм кислорода (АФК). Уровень АФК является важной характеристикой метаболического состояния клеток крови. Его изменение служит сигнальным механизмом для запуска различных клеточных процессов, таких как дифференцировка, пролиферация и апоптоз. Мы предположили, что различные сосудистые патологии, развивающиеся на фоне повышенного содержания ГЦ в крови, могут быть результатом взаимодействия этого вещества с клетками крови, приводящего к усилению генерации АФК.

Объектом исследования были выбраны нейтрофилы, поскольку генерация АФК, сопряженная с фагоцитозом, является их основной функцией [2]. Были исследованы клетки в двух функциональных состояниях – интактные и активированные. Уровень АФК регистрировали хемилюминиметрическим методом с использованием флуоресцентных зондов [1], а также с помощью проточной цитометрии.

Показано, что эффект гомоцистеина зависит от функционального состояния иммунокомпетентных клеток. ГЦ подавляет дыхательный взрыв в покоящихся клетках, выступая в роли антиоксиданта прямого действия, связывающего гипохлорит-анион. Кроме того, ГЦ и ГЦК частично ингибируют миелопероксидазу. При этом в активированных клетках, выделенных из очага острого воспаления, ГЦ вызывает рост уровня АФК, а также увеличивает смертность нейтрофилов, по-видимому, путем апоптоза.

**Литература**

1. Владимиров Ю.А., Шерстнев М.П. (1989) Хемилюминесценция клеток животных // Итоги науки и техники. Серия Биофизика, 24.
2. Carr A.C., Winterbourn C.C. (1993) Oxidation of neutrophil glutathione and protein thiols by myeloperoxidase-derived hypochlorous acid//Annu Rev Biochem, 62, 797-821.
3. Seshadri, S., Beiser, A., Selhub, J., Jacques, P.F., Rosenberg, I.H., D'Agostino, R.B., Wilson, P.W.F., Wolf, P.A. (2002) Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease//N. Engl. J. Med., 346, 476–483.

## Участие виментиновых филаментов в заякоривании клеточного ядра

*Геращенко Максим Васильевич*

*студент*

*Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

*E-mail: [germaximus@gmail.com](mailto:germaximus@gmail.com)*

Ядро является основным хранилищем генетического материала в клетке. Оно обладает сложной морфологией и строго упорядоченной внутренней структурой. Однако до недавнего времени клеточное ядро часто рассматривали отдельно от цитоплазмы, считая, что оно пассивно дрейфует в районе клеточного центра. Современные исследования, напротив, показывают необходимость правильного позиционирования ядра в клетке на всех стадиях ее развития, что достигается двумя взаимосвязанными процессами: заякориванием и миграцией. Особенно это важно в высокоспециализированных мышечных и нервных клетках, а так же на ранних стадиях эмбрионального развития. В заякоривание вовлечены все структуры цитоскелета: микротрубочки, актин и промежуточные филаменты.

В настоящей работе мы показали непосредственное участие промежуточных филаментов в заякоривании ядра. В качестве модели использовались две линии мышечных фибробластов, MFT-16, лишенные виментина, и MFT-6, используемые в качестве контроля. При помощи видео-микроскопии мы обнаружили высокую вращательную подвижность ядер в безвиментиновых клетках MFT-16 по сравнению с клетками MFT-6. Чтобы изучить роль виментиновых промежуточных филаментов в заякоривании ядра, мы восстанавливали их в клетках MFT-16 при помощи экспрессии в них виментина человека. Вращение ядер в таких клетках не наблюдалось, как и в клетках MFT-6. Далее мы решили определить участок молекулы виментина, который необходим для взаимодействия промежуточных филаментов с ядром. Для этого трансфецировали клетки MFT-16 плазмидами, кодирующими различные делеционные мутанты виментина, способные образовывать филаменты. Виментин представляет собой белок с протяженной центральной  $\alpha$ -спиральной частью и слабоструктурированными N- и C-концевыми доменами. Для сборки промежуточных филаментов необходимы  $\alpha$ -спиральный участок и часть N-конца. В наших исследованиях использовались мутанты виментина, лишенные C-конца или различных частей N-конца. Экспрессия любого из этих мутантов в клетках MFT-16 приводила к полному восстановлению заякоривания ядер. Отсюда мы делаем вывод, что для заякоривания ядра необходима только  $\alpha$ -спиральная часть молекулы виментина. Основываясь на данных литературы можно предположить, что промежуточные филаменты связываются с ядерной мембраной посредством белка плектина. Кроме того, мы решили выяснить, какие структуры цитоскелета ответственны за вращение ядер в отсутствие заякоривания. Для этого использовали нокодазол (токсин разрушающий микротрубочки) и латранкулин В (токсин дестабилизирующий актиновые филаменты). Наши данные показывают, что вращение ядра является активным процессом, требующим участия микротрубочек, и при добавлении к клеткам MFT-16 нокодазола вращение ядер не наблюдается. В то же время при добавлении латранкулина В вращательное движение, наоборот, увеличивается, что свидетельствует о том, что актиновый цитоскелет не участвует в этом процессе. Мы предполагаем, что вращение ядер это физиологический процесс, находящийся под контролем цитоскелета.



**Свойства гетероолигомерных комплексов Hsp20 и Hsp27 человека.**

**Глухова Алиса Евгеньевна, Мырников Евгений Викторович, Букач Олеся Владимировна**

*студент, студент, ассистент*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

*E-mail: [alisaeg@gmail.com](mailto:alisaeg@gmail.com)*

Hsp20 и Hsp27 относят к обширной группе малых белков теплового шока (sHsp). sHsp – белки-шапероны, основная функция которых – предотвращение агрегации денатурированных белков-субстратов. Hsp20 и Hsp27 в значительных количествах содержатся в различных типах мышц, где, вероятно, предохраняют сократительный аппарат от повреждений. Помимо этого указанные белки участвуют в ряде важных процессов, таких как регуляция сократительной активности и апоптоз. Известно, что эти белки могут формировать гетероолигомерные комплексы, свойства которых пока остаются малоизученными.

В нашей работе мы установили, что рекомбинантные Hsp20 и Hsp27 человека преимущественно образуют два типа гетероолигомерных комплексов с молекулярными массами примерно 400 и 140 кДа. Эти комплексы находятся в динамическом равновесии, и при разведении равновесие сдвигается в сторону образования комплексов с меньшей молекулярной массой. При этом молярное отношение Hsp20/Hsp27 в этих комплексах остается постоянным и равным единице. Этот факт позволил предположить, что меньшие по размеру гетероолигомеры представляют собой строительные блоки для образования более крупных комплексов. Наши экспериментальные данные свидетельствуют о том, что скорость образования гетероолигомерных комплексов Hsp20 и Hsp27 увеличивается при повышении температуры или ионной силы раствора. Вероятно, образование гетероолигомеров является важным регуляторным механизмом в условиях теплового стресса. Одной из важных характеристик малых белков теплового шока является способность к подавлению агрегации денатурированных белков. Используя в качестве модельного субстрата инсулин, мы обнаружили, что шаперонная активность гетероолигомерных комплексов Hsp20 и Hsp27 несколько выше, чем активность гомоолигомеров этих белков. Данные литературы свидетельствуют о том, что фосфорилирование Hsp20 протеинкиназой A играет важную роль в регуляции расслабления гладких мышц. Мы установили, что скорость фосфорилирования изолированного Hsp20 выше скорости фосфорилирования Hsp20 в составе гетероолигомерных комплексов. Кроме того Hsp27 замедляет катализируемое протеинкиназой A фосфорилирование другого малого белка теплового шока, Hsp22, который по нашим данным не способен образовывать гетероолигомерных комплексов с Hsp27. Полученные данные позволяют предположить, что Hsp27 может взаимодействовать с протеинкиназой A и ингибировать ее.

Суммируя полученные данные, можно заключить, что Hsp20 и Hsp27 образуют гетероолигомерные комплексы разного размера, при этом их формирование приводит к изменению скорости фосфорилирования и шаперонной активности малых белков теплового шока, входящих в состав таких комплексов.

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

## Сравнительная характеристика цитопротекторных свойств аналогов

### 11-дезоксипгЕ<sub>1</sub> и циклопентеноновых гетеропростаноидов<sup>1</sup>

Губич Оксана Игоревна<sup>2</sup>

ассистент, кандидат биологических наук

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

E-mail: [Hubich\\_Oksana@tut.by](mailto:Hubich_Oksana@tut.by)

Простагландины (ПГ) – мультифункциональные молекулярные регуляторы различных физиологических функций. Эффекты ПГ в печени подразделяются на сосудистые, метаболические, секреторные и защитные [1]. Реализация последних наблюдается как на уровне цельной печени, так и в условиях повреждения гепатоцитов *in vitro* [2], что позволяет рассматривать ПГ в качестве потенциальных хемотерапевтических средств. Однако присущая природным ПГ лабильность и отсутствие селективности ограничивают возможность их практического использования. Данный факт послужил основой для проведения сравнительного анализа цитопротекторной активности 6 11-дезоксипгЕ<sub>1</sub> аналогов ПГЕ<sub>1</sub> и 8 циклопентеноновых гетеропростаноидов на клеточной модели повреждения печени, индуцированного ССl<sub>4</sub>. Указанные соединения синтезированы и предоставлены для исследований Лабораторией химии простагландинов Института биоорганической химии НАН Беларуси и Институтом органической химии УфО РАН. 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% ССl<sub>4</sub>. В ходе проведенной работы установлено, что защитное действие циклопентеноновых простаноидов значительно превосходит эффект производных ПГЕ<sub>1</sub>, снижавших цитотоксическое действие ССl<sub>4</sub> не более, чем на 36%. Среди циклопентеноновых ПГ наиболее выраженным эффектом обладали соединения ЭМ-3.2 и Ю-34, подавлявшие в концентрации  $1 \cdot 10^{-7}$  моль/л цитотоксический эффект ССl<sub>4</sub> в 2 раза, что на 21% превышает защитное действие наиболее известного гепатопротектора простаноидного типа (ПГ<sub>2</sub>). Указанные соединения, характеризовались наличием 2-оксо-4-аминооктенильной α-цепи и мононенасыщенной карбоксилсодержащей ω-цепи, а также атома хлора во втором и гетероцикла в третьем положении циклопентенонового кольца. Защитный эффект исследуемых простаноидов не был связан с изменением внутриклеточного распределения ионов кальция, нарушенного в присутствии ССl<sub>4</sub> и характеризующегося накоплением данных ионов в цитозоле клеток. Однако в присутствии простаноидов наблюдалось значительное (76-98%) снижение образования триеновых конъюгатов в мембранах гепатоцитов, коррелировавшее с достоверным (34-46%) увеличением внутриклеточного уровня SH-групп. Полученные результаты свидетельствуют о реализации цитопротекторного эффекта простаноидов через снижение интенсивности свободнорадикальных реакций в клеточных мембранах. Структура циклопентеноновых простаноидов, проявивших защитное действие, может быть взята за основу для создания фармакологических средств гепатопротекторного действия.

### Литература

1. Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease//Adv.Anat.Embriol.CellBiol. – 2001, 161, 1-151.
2. Машковский, М.Д. Простагландины//Фармакология. – 1972, 1, 109-115.

<sup>1</sup>Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта № ГР 20063147 ГПОФИ Республики Беларусь “Физиологически активные вещества”.

<sup>2</sup> Автор выражает признательность вед. научн. сотр., к.б.н. Шолуху М.В. за помощь в подготовке тезисов.

## **Альфа7-субъединица ацетилхолинового рецептора как эндогенная мишень для терапии болезни Альцгеймера**

**Камынина Анна Владимировна**

*студент*

*Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия*

*Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия*

*E-mail: aneskaminina@mail.ru*

Болезнь Альцгеймера (БА) – тяжелое нейродегенеративное заболевание, точный механизм развития которого неизвестен и отсутствуют методы радикальной терапии. По одному из предполагаемых механизмов развития БА бета-амилоид связывается с альфа7-субъединицей ацетилхолинового рецептора (АХР) на поверхности нейронов мозга, что приводит к гибели клеток и к запуску нейродегенеративных процессов [1]. Мы предположили, что антитела к  $\alpha 7$ -субъединице АХР могут препятствовать ее связыванию с бета-амилоидом и тем самым защищать нейрон от гибели. В соответствии с этим предположением в нашей лаборатории исследуется подход к терапии БА, основанный на выработке специфических антител к альфа7-субъединице АХР.

Проведены эксперименты по изучению влияния иммунизации синтетическими фрагментами  $\alpha 7$ -субъединицы АХР на пространственную память мышей в модели спорадической формы БА. Для стимуляции выработки антител, специфичных к альфа7-субъединице АХР, мы иммунизировали мышей тремя пептидами, являющимися фрагментами экспонированных участков экстрацеллюлярного домена альфа7-субъединицы АХР: двумя пептидами – в виде конъюгатов с белком-носителем (гемоцианин улитки) и одним пептидом – в свободном виде. В качестве животной модели БА были выбраны мыши, которым проводили операцию ольфакторной бульбэктомии, после которой развиваются все признаки БА, характерные для человеческой формы: гибель нейронов мозга, накопление бета-амилоида, формирование сенильных бляшек и потеря пространственной памяти. Показано, что иммунизация конъюгатами двух пептидов и третьим пептидом в свободном, неконъюгированном с белком-носителем виде оказывает выраженное терапевтическое действие на пространственную память мышей в модели БА. В результате иммунизации наблюдалось улучшение пространственной памяти у 20% мышей, иммунизированных конъюгатом первого пептида, у 50% - иммунизированных конъюгатом второго пептида и у 82% животных, иммунизированных третьим пептидом в свободном виде. Чтобы доказать, что терапевтический эффект на память бульбэктомированных животных вызван именно действием антител, направленных к фрагментам альфа7-субъединицы АХР, мы поставили эксперименты на мышах, иммунизированных разными контрольными соединениями: белком-носителем, глицином, конъюгированным с гемоцианином улитки, и двумя пептидами из последовательности других, неэндогенных белков: одним – конъюгированным с белком-носителем, другим – в свободном виде. Выявлено, что иммунизация такими соединениями не приводит к изменениям в состоянии памяти животных в модели БА. Таким образом, можно сделать вывод о том, что именно иммунизация фрагментами альфа7-субъединицы АХР оказывает выраженное терапевтическое действие на состояние памяти мышей в модели БА.

### **Литература**

1. D'Andrea M.R., Lee D.H.S., Wang H-Y., Nagele R. / Targeting intracellular A $\beta$ 42 for Alzheimer's disease drug discovery // Drug development research. 2002. 56:194-200

**Влияние гликозилирования на процессинг молекул предшественника  
натрийуретического пептида В (proBNP) человека**

**Карпова Наталья Сергеевна<sup>1</sup>, Семенов Александр Геннадьевич<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>студентка, <sup>2</sup>аспирант

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

*E-mail: nat\_karпова@mail.ru*

Натрийуретический пептид В (BNP) является гормоном, участвующим в регуляции кровяного давления, поддержании гомеостаза организма. BNP синтезируется кардиомиоцитами в виде предшественника (proBNP, 108 а.к.), который позднее расщепляется специфической протеазой с образованием двух пептидов – N-концевого фрагмента (NT-proBNP, 1-76 а.к.) и BNP (77-108 а.к.). Оба пептида секретируются в кровоток. Концентрация BNP в крови значительно увеличивается при различных заболеваниях сердечно-сосудистой системы, в том числе и при сердечной недостаточности (СН). Показано, что у больных СН расщеплению подвергаются не все молекулы предшественника, и в крови может быть обнаружено значительное количество proBNP. Факторы, препятствующие расщеплению proBNP до сих пор неизвестны, однако именно нарушение процессинга proBNP у больных СН может быть одной из причин развития заболевания. Недавно было показано, что proBNP в крови больных СН и рекомбинантный proBNP, экспрессированный в клетках линии CHO-K1, гликозилированы. Для рекомбинантного proBNP было определено 7 сайтов гликозилирования (T36, S37, S44, T48, S53, T58, T71). Мы предположили, что гликозилирование молекулы proBNP, особенно вблизи участка расщепления, может оказывать негативное влияние на процессинг proBNP.

Чтобы оценить влияние гликозилирования на процессинг, мы исследовали свойства proBNP, экспрессированного в 3 различных клеточных линиях (НЕК 293, CHO-K1 и NIH 3T3). Мы сравнили иммунохимические свойства proBNP и NT-proBNP, содержащихся в культуральной среде, используя широкую панель моноклональных антител, специфичных к различным участкам молекулы proBNP. Антитела, специфичные к участку 61-76, примыкающему к сайту расщепления, взаимодействовали с NT-proBNP значительно лучше, чем с proBNP. Было показано, что различие в иммунореактивности двух молекул было связано с гликозилированием этого участка в молекуле proBNP. Отсутствие гликозилирования в С-концевой области NT-proBNP позволило нам предположить, что NT-proBNP является продуктом процессинга молекул proBNP, слабо или совсем не гликозилированных в области расщепления. Чтобы подтвердить эту гипотезу, мы исследовали корреляцию между уровнем гликозилирования участка 61-76 а.к. и степенью процессинга молекул proBNP, экспрессированного в вышеперечисленных клеточных линиях. Было показано, что участок расщепления гликозилирован в наибольшей степени у proBNP, экспрессированного в клетках линии НЕК 293, и значительно меньше – при экспрессии в клетках линий NIH 3T3 и CHO-K1. Уровень гликозилирования остальных участков молекулы proBNP не отличался при экспрессии в разных линиях клеток. Соотношение концентраций NT-proBNP/(NT-proBNP+proBNP), определенное в культуральной среде, составило 1:10 для НЕК 293, а для CHO-K1 и NIH 3T3 было примерно в 3 раза выше.

Таким образом, можно заключить, что гликозилирование участка молекулы, примыкающего к сайту расщепления, подавляет процессинг proBNP. Молекулы proBNP с высокой степенью гликозилирования участка 61-76 а.к. не подвергаются расщеплению и секретируются в кровь в интактном состоянии.

**Получение моноклональных антител к различным олигомерным формам адипонектина человека**

***Катруха Иван Алексеевич (1), Филатов Владимир Львович (2)***

*(1) – студент (2) – научный сотрудник, к.б.н.*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

*E-mail: katrukhai@mail.ru*

Адипонектин (Acpr30, арМ1), белковый гормон массой 26 кДа, выделяемый жировой тканью, регулирует катаболизм жирных кислот, чувствительность к инсулину, уровень глюкозы в крови, оказывает влияние на воспалительные и другие процессы в тканях. Адипонектин секретируется в кровь в необычно высокой для гормона концентрации и составляет  $\approx 0,01\%$  от общего белка крови. Перед секрецией из адипоцита адипонектин подвергается посттрансляционной модификации (гидроксилирование, гликозилирование и олигомеризация), и в крови присутствует в виде гомомультимеров: тримеров (LMW-форма), гексамеров (MMW-форма) и высокомолекулярных комплексов (HMW-форма). Установлено, что разные олигомерные формы адипонектина взаимодействуют с различными рецепторами в тканях-мишенях и тем самым оказывают многообразное влияние на метаболические процессы в организме. Многие авторы отмечают особую роль HMW олигомера адипонектина в реализации основных биологических функций данного белка. Было также показано, что концентрация HMW формы адипонектина в крови коррелирует с такими заболеваниями как ожирение, диабет второго типа, сердечно-сосудистые заболевания и метаболический синдром, что говорит о возможности использования адипонектина в качестве потенциального диагностического маркера данных заболеваний.

Используя рекомбинантный и нативный (выделенный из сыворотки крови человека) адипонектин в качестве иммуногена, мы получили панель мышинных моноклональных антител, способных взаимодействовать с адипонектином в сыворотке крови. Проведя серию дополнительных экспериментов, мы установили, что несколько пар антител пригодны для количественного определения адипонектина в сыворотке крови при помощи сэндвич-иммуноанализа с флуоресцентной меткой (Eu<sup>3+</sup>). Кроме того, проводя разделение белков сыворотки крови на фракции с помощью метода гель-фильтрации, мы показали, что одна из полученных пар антител (пара 20-23) способна избирательно взаимодействовать с HMW-формой адипонектина, в то время как другая пара антител (пара 36-27) узнает все три олигомерные формы адипонектина. Используя полученные пары антител, мы провели предварительные эксперименты по определению уровня адипонектина в крови здоровых людей и больных диабетом второго типа. Нами показана корреляция уровня HMW-формы адипонектина с данным заболеванием.

Полученные нами результаты говорят о возможности использования данных пар моноклональных антител в качестве эффективного инструмента для исследования различных молекулярных механизмов воздействия адипонектина на ткани-мишени, а также принципиальную возможность их применения для клинических исследований инсулинорезистентности и диабета второго типа.

## Генерация супероксидного радикала цитохромом P-450 в микросомной фракции печени предварительно облученных опухоленосителей

**Кеца О.В.**

*к.б.н., ассистент*

*Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича, Черновцы, Украина*

*E-mail: ksen808@mail.ru*

Воздействие на организм ионизирующего излучения сопровождается инициацией свободнорадикальных процессов. Активация процессов окисления биомолекул вследствие облучения может стать причиной нарушения детоксикационной функции печени и развития злокачественных новообразований в организме. Известно, что компоненты монооксигеназной системы могут генерировать супероксидный радикал ( $O_2^-$ ). Максимальная генерация  $O_2^-$  главным образом наблюдается непосредственно на цитохроме P-450.

Цель работы – исследование влияния предварительного действия ионизирующего излучения на генерацию  $O_2^-$  цитохромом P-450 в микросомной фракции печени крыс-опухоленосителей. В результате проведенных исследований обнаружено, что развитие в организме карциномы Герена приводит к отклонениям от типовой стехиометрии монооксигеназных реакций. Так, в динамике роста опухоли наблюдается повышение генерации  $O_2^-$  цитохромом P-450 в микросомной фракции печени крыс-опухоленосителей, которая в логарифмическую и стационарную фазы онкогенеза превышает показатели контроля в 3 и 4,2 раза соответственно. Вероятно, стадии интенсивного роста и метастазирования карциномы Герена сопровождаются усиленной продукцией токсинов опухолью и выбросом продуктов ее метаболизма в кров, уровень которых, очевидно, превышает возможности детоксикационной системы печени. Трансплантация карциномы Герена предварительно облученным крысам приводит к повышению в 2,8 раза генерации  $O_2^-$  цитохромом P-450 в микросомной фракции печени на латентной стадии онкогенеза по сравнению с необлученными опухоленосителями. Усиленная генерация  $O_2^-$  может приводить к окислительной модификации белков, и, как следствие, к инаktivации ферментов детоксикационной системы печени. В стационарный период опухолевого роста уровень генерации  $O_2^-$  цитохромом P-450 в микросомной фракции печени не отличается от показателей необлученных опухоленосителей.

Таким образом, предварительное действие ионизирующего излучения приводит к усилению генерации  $O_2^-$  цитохромом P-450 в микросомной фракции печени крыс на начальных этапах развития опухоли. В стационарную фазу онкогенеза влияние предварительного облучения нивелируется, и развитие опухоли в организме приобретает доминирующего значения.

## Участие белков Ga13, LARG и RhoA в регуляции конвергентного растяжения клеток на ранних этапах гаструляции у *Xenopus laevis*

Кирюхин Дмитрий Олегович

аспирант

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

E-mail: [dmitry.kiryukhin@gmail.com](mailto:dmitry.kiryukhin@gmail.com)

Малые GTPазы семейства Rho (Rho, Cdc42, Rac) являются важными регуляторами перестройки актинового цитоскелета, процессов полимеризации микротрубочек, генной экспрессии, регулируют активность ряда ферментов. За счет участия во многих сигнальных каскадах, Rho-GTPазы контролируют клеточный цикл, подвижность и полярность клеток. Они взаимодействуют с эффекторными белками, когда находятся в активной, GTP-связанной форме. Гидролиз GTP переводит GTPазу в неактивное состояние. Одними из регуляторов перехода между неактивной и активной формами являются факторы обмена гуаниловых нуклеотидов (GEF), которые катализируют обмен GDP на GTP, активируя белок. Активация ряда GEF (LARG, p115Rho-GEF, PDZ-RhoGEF) происходит за счет взаимодействия с  $\alpha$ -субъединицами гетеротримерных G-белков. Такие GEF имеют в своем составе RGS-домен (regulator of G-protein signaling).

В нашей лаборатории были получены гены, кодирующие малую GTPазу RhoA, фактор обмена гуаниловых нуклеотидов LARG и  $\alpha$ -субъединицу гетеротримерного G-белка семейства Ga13 у *Xenopus laevis*. Было показано, что пространственно-временная картина экспрессии этих генов совпадает. Изменение степени их экспрессии влияет на подвижность клеток при гаструляции. Из литературных данных известно, что Ga13 способен активировать RhoA через LARG. Поэтому было сделано предположение, что наблюдаемые эффекты вызваны изменением количества активной формы RhoA. Относительное количество активной формы RhoA определяли методом аффинной преципитации с химерным белком, состоящим из RhoA-связывающего домена белка ротекина (взаимодействует только с активной формой RhoA), слитого с глутатион-S-трансферазой, с последующим электрофоретическим анализом и иммуноблоттингом с антителами против RhoA. Чтобы изучить, способен ли xLARG активировать xRhoA *in vivo*, мы инъецировали мРНК xLARG в зиготу *X. laevis* и определяли, как изменяется количество активной формы xRhoA на стадии развития 10,5. Было показано, что инъекции мРНК xLARG значительно увеличивают количество активной формы xRhoA. Степень ответа зависит от количества инъецированной мРНК. Кроме того, с помощью антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов подавляли экспрессию эндогенного xLARG. Мы обнаружили, что при этом количество активной формы xRhoA падает ниже контрольного уровня. Был сделан вывод, что xLARG принимает участие в активации xRhoA. Так как xLARG имеет RGS-домен, можно предположить, что при усилении экспрессии xGa13 будет происходить активация xRhoA, опосредованная xLARG. Мы инъецировали мРНК xGa13 на стадии зиготы и показали, что при этом на стадии 10,5 значительно увеличивается количество активной формы xRhoA. Характер ответа пропорционален количеству инъецированной мРНК. Чтобы проверить, влияет ли xLARG на передачу сигнала от xGa13 к xRhoA, мы инъецировали мРНК xGa13 совместно с антисмысловыми морфолиновыми олигонуклеотидами к мРНК xLARG. Мы показали, что при этом активации xRhoA не происходит. Это может свидетельствовать о том, что активация xRhoA через xGa13 осуществляется с помощью xLARG. Таким образом, наши данные позволяют предположить участие сигнального каскада xGa13 – xLARG – xRhoA в регуляции морфогенетических движений при гаструляции у *X. laevis*. Автор выражает благодарность Н.Н. Лучинской, Л. А. Шустиковой и А. В. Белявскому.

## **Сигнальный механизм образования пептидов в эритроцитах человека**

**Кленов Р.О., Кленова Н.А.**

*аспирант / сотрудник, д.б.н., профессор*

*ГОУ ВПО Самарский государственный университет, Самара, Россия*

*E-mail: rklenov@yandex.ru*

Способность эритроцитарных клеток к производству биологически активных пептидных соединений, источником которых служат молекулы гемоглобина открыта относительно недавно [1]. Известно, что расщепление гемоглобина осуществляет примембранный комплекс протеолитических ферментов. Однако механизмы активации данного комплекса ферментов и условия генерации пептидных соединений остаются до конца не выясненными.

Целью данного исследования стало изучение механизма образования пептидных соединений в различных по возрасту эритроцитарных фракциях человека в условиях кратковременной активации и блокады (обзиданом)  $\beta$ -адренарцепции. Результаты показали, что при кратковременном действии адреналина (АД) и обзидана (ОБ) в физиологической концентрации, и в концентрации, превышающей физиологическую в 10 раз, фракция молодых эритроцитов содержала большее количество пептидных соединений. Пробы с АД отличались от контрольных и обзидановых проб достоверно более высоким содержанием пептидов. Тенденция к увеличению содержания пептидов имела также в пробах совместного присутствия АД и ОБ. Фракция старых эритроцитов показала сходную тенденцию изменений содержания пептидных молекул, хотя общее количество пептидных соединений было ниже, чем во фракции молодых эритроцитов [2,3]. Для подтверждения происхождения данных пептидных соединений была проведена ионообменная хроматография пептидов в сравнении с пептидной фракцией, полученной при действии пепсина на гемоглобин в течение различных отрезков времени. Хроматограммы показали соответствие изучаемых пептидных соединений продуктам протеолиза гемоглобина [2,4].

Таким образом, примембранный комплекс протеолитических ферментов может активироваться в присутствии сигнальных молекул через аденилатциклазную систему. Кроме того, скорость образования пептидных соединений зависит от концентрации лиганда, от состояния мембраны и энергоресурса клеток.

### **Литература**

1. Карелин А.А., Филиппов М.М., Яцкин О.Н. Протеолитическая деградация гемоглобина в эритроцитах приводит к образованию биологически активных пептидов // *Биоорганическая химия*. 1998. Т.24. №4. С.271-281.
2. Кленова Н.А., Кленов Р.О. Механизм образования пептидных соединений в эритроцитах человека // *Естествознание и гуманизм*. Сборник научных трудов. – Томск. 2006. Т.3. №4. С.16-17.
3. Кленова Н.А., Кленов Р.О. Механизмы генерации пептидов эритроцитами человека // *Вест. СамГУ. Ест.науч. серия. Биология*. №7 (47). 2006. С.75-79.
4. Кленов Р.О., Кленова Н.А. Изучение механизма образования пептидных соединений эритроцитами человека / *Фундаментальные и прикладные исследования в системе образования*. Сборник научных трудов по материалам 5-й Международной научно-практической конференции. – Тамбов: Изд-во Першина Р.В., 2007. – С. 109-111.



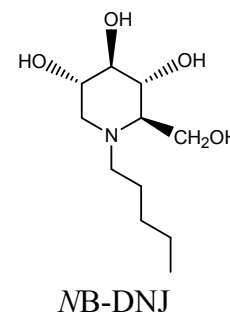
**Биологическая активность новых классов алкилированных иминосугаров****Кукушкин Николай Вадимович**

студент

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: kukushkin@ji9535.spb.edu

Иминосугара представляют собой мимикрирующие под моносахариды гетероциклические соединения, в которых атом кислорода в цикле замещён атомом азота. В последнее десятилетие колоссальное внимание уделяется производным иминосугаров в связи с их способностью ингибировать определённые клеточные ферменты. К ингибируемым производными иминосугаров ферментам относятся, с одной стороны, ЭПР- $\alpha$ -глюкозидазы I и II. Способность иминосугаров и их производных ингибировать эти ферменты имеет потенциал для разработки ряда противовирусных препаратов, а также, по некоторым данным, для терапии муковисцидоза, сахарного диабета, в ряде случаев – онкологических заболеваний. С другой стороны, *N*-алкилированные производные иминосугаров являются ингибиторами церамид-специфической гликозилтрансферазы (ЦГТ), ключевого фермента синтеза гликолипидов. Такое свойство этих соединений позволяет использовать их для терапии болезней накопления гликолипидов по принципу «депривации субстрата». В настоящее время препараты на основе «классического» алкилированного иминосугара *N*-бутилдеоксиоиримицина (NB-DNJ) широко применяются для лечения синдрома Гоше. В связи с потенциалом иминосугаров как лекарственных препаратов широкого спектра действия перспективным направлением представляется поиск и разработка более эффективных и селективных аналогов таких соединений, как NB-DNJ. В представленной работе исследовалась биологическая активность трёх новых типов алкилированных иминосугаров:



***N*-пентилидоноиримицин (NP-IDJ)**, отличающийся от NB-DNJ положением заместителя в пятом положении гетероцикла. С использованием культур лимфоцитов человека *in vitro* показано, что соединение обладает активностью против ЦГТ, однако не ингибирует ЭПР- $\alpha$ -глюкозидазы. Такое свойство соединения обуславливает возможность его применения в медицине для терапии болезней накопления гликолипидов при отсутствии ряда побочных эффектов, характерных для NB-DNJ.

**ККАА-DNJ**, представляющий собой NB-DNJ, связанный с пептидной меткой «лизин-лизин-аланин-аланин», являющейся сигналом удержания в ЭПР. Введение ККАА-метки в углеводородный радикал иминосугара в принципе может повысить сродство соединения к ЭПР, обеспечив направленный транспорт алкилированного иминосугара в полость цистерн органоида. К настоящему времени не удалось достичь удовлетворительных показателей активности ККАА-DNJ против  $\alpha$ -глюкозидаз. В докладе обсуждаются возможные причины возникающих затруднений и перспективы дальнейших исследований соединения.

**Группа *N*-алкилированных семичленных иминосугаров**, различающихся по наличию гидроксильной группы у заместителя в шестом положении и по пространственному расположению этого заместителя. Ранее в экспериментах с изолированными ферментами было показано, что эти соединения являются ингибиторами маннозидаз. Такой ранее не известный тип активности *N*-алкилированных иминосугаров был подтверждён в экспериментах с культурами лимфоцитов человека. Кроме того, были получены неожиданные данные о влиянии геометрии заместителей на биологическую активность данного типа соединений. Полученные результаты обсуждаются в докладе.

## Влияние 2-гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрина на тепловую денатурацию и агрегацию глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы

из скелетных мышц кролика<sup>1</sup>

*Малолеткина Ольга Игоревна*

*студент*

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, Россия*

*E-mail: slovisha@mail.ru*

Неправильный фолдинг и агрегация белков сопровождаются образованием нерастворимых внутриклеточных структур, приводящих к повреждению и гибели клеток. Изучение механизма агрегации белков и механизмов, предотвращающих агрегацию, наряду с фундаментальным значением, имеет существенную практическую важность для биотехнологии в связи с агрегацией рекомбинантных белков, образующих тельца включения, и для медицины в связи с существованием так называемых конформационных (дегенеративных и нейродегенеративных) болезней, обусловленных агрегацией белков. Для подавления агрегации белков используются низкомолекулярные соединения, такие как циклодекстрины и их производные. Циклодекстрины (ЦД) – природные циклические олигосахариды. ЦД, включающие 7 остатков глюкозы, обозначают как  $\beta$ -ЦД. Целью настоящей работы является изучение механизма тепловой денатурации и агрегации глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из скелетных мышц кролика в присутствии 2-гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрина (ГПЦД). Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД; КФ 1.2.1.12) – гомотетрамерный фермент, катализирующий реакцию превращения глицеральдегид-3-фосфата в 1,3-бисфосфоглицерат. Тепловую денатурацию изучали методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) при скорости нагрева 1К/мин. Тепловая денатурация имеет необратимый характер и протекает по диссоциативному механизму, что типично для олигомерных белков. Повышение концентрации ГПЦД приводит к сдвигу максимума на профиле ДСК в сторону более низких температур. Следовательно, ГПЦД уменьшает стабильность ГАФД, связываясь с интермедиатами разворачивания белка. Для изучения механизма тепловой агрегации ГАФД был использован метод динамического лазерного светорассеяния, позволяющий детектировать агрегаты ГАФД и определять размеры частиц. Процесс агрегации ГАФД включает стадию образования стартовых агрегатов и последующее слипание стартовых агрегатов и агрегатов более высокого порядка. Агрегация ГАФД происходит в кинетическом режиме, при котором скорость агрегации лимитируется диффузией взаимодействующих частиц, т.е. каждое столкновение приводит к слипанию частиц. Кинетическими параметрами, характеризующими процесс агрегации, являются длительность стадии, приводящей к образованию стартовых агрегатов, ( $t_0$ ) и гидродинамический радиус стартовых агрегатов ( $R_{h,0}$ ). При повышении концентрации ГПЦД (0–100мг/мл) происходит последовательное уменьшение значения параметра  $t_0$  (8,2–2,7 мин) и увеличение параметра  $R_{h,0}$  (49–111 нм). Диффузионно-контролируемый режим агрегации сохраняется и в присутствии ГПЦД. Обнаруженная в настоящей работе стимуляция агрегации ГАФД высокими концентрациями ГПЦД оказалась неожиданной, поскольку многими исследователями было продемонстрировано подавление агрегации белков циклодекстринами и их производными. Причиной столь необычного характера влияния ГПЦД на агрегацию ГАФД является взаимодействие ГПЦД с интермедиатами разворачивания молекулы фермента при тепловой денатурации, что приводит к увеличению радиуса стартовых агрегатов и более раннему их появлению в системе.

<sup>1</sup> Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках грантов РФФИ (гранты № 08-04-00666-а и 06-04-39008-ГФЕН\_а).

## Ингибитор трипсина из гречихи – представитель нового семейства ингибиторов сериновых протеаз

Опарин П.Б.<sup>1</sup>, Василевский А.А.<sup>2</sup>, Мусолямов А.Х.<sup>2</sup>, Дунаевский Я.Е.<sup>1</sup>,  
Белозерский М.А.<sup>1</sup>, Гришин Е.В.<sup>2</sup>, Егоров Ц.А.<sup>2</sup>  
студент

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, <sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

В растениях ингибиторы протеолитических ферментов, в том числе сериновых протеаз, выполняют целый ряд жизненно-важных функций, таких как регуляция активности эндогенных ферментов и защита от патогенов и растительноядных животных. Представляется перспективным использование ингибиторов протеаз в биотехнологии растений с целью получения устойчивых к болезням и вредителям сельскохозяйственных культур.

Ранее из семян гречихи *Fagopyrum esculentum* методами экстракции и ионообменной хроматографии были получены компоненты, обладающие ингибиторной активностью в отношении ряда сериновых протеаз. В рамках настоящей работы методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) был очищен пептид BWI-2с, ингибирующий бычий трипсин. С использованием методов N-концевого секвенирования по Эдману, масс-спектрометрии и селективной фрагментации полипептидной цепи по остаткам метионина установлена полная аминокислотная последовательность BWI-2с из 41 аминокислотного остатка. Этот пептид относится к новому семейству ингибиторов сериновых протеаз, наиболее характерная черта которых – наличие четырех консервативных остатков цистеина, образующих две внутримолекулярные дисульфидные связи. Гомологами BWI-2с являются ингибиторы трипсина BWI-2а и 2b, также выделенные из семян гречихи. Кроме того, обнаруживается сходство аминокислотной последовательности BWI-2с с рядом пептидов растительного происхождения, выполняющих различные функции.

Для проведения всесторонних структурно-функциональных исследований нового ингибитора был разработан метод получения его рекомбинантного аналога в бактериальной системе экспрессии. Был синтезирован ген BWI-2с и сконструирован вектор, кодирующий пептид в составе химерного белка с тиоредоксином. Гибридный белок также содержал последовательность, обеспечивающую возможность выделения с помощью аффинной хроматографии и сайт для селективного расщепления энтерокиназой. Получен штамм *Escherichia coli* – продуцент химерного белка, индукция экспрессии соответствующего гена осуществлялась добавлением в среду изопропил-β-D-тиогалактопиранозида. Очищенный методом аффинной хроматографии белок подвергался ферментативному гидролизу, целевой пептид выделялся методом ОФ-ВЭЖХ, выход составил 5 мг BWI-2с с литра бактериальной культуры. По данным N-концевого секвенирования, масс-спектрометрии и ОФ-ВЭЖХ рекомбинантный пептид эквивалентен природному. Анализ активности в отношении бычьего трипсина также подтвердил его соответствие нативному BWI-2с.

Результатом работы служит расширение ассортимента известных ингибиторов сериновых протеаз. Предполагается использование рекомбинантного пептида BWI-2с для установления его пространственной структуры.

## Исследование транскетолазной реакции с бромпируватом в качестве субстрата-донора

*Прокофьева Мария Михайловна<sup>1</sup>, Мешалкина Людмила Евгеньевна<sup>2</sup>, Кочетов Герман Александрович<sup>3</sup>*

*аспирант<sup>1</sup>, к.б.н., с.н.с.<sup>2</sup>, д.б.н., в.н.с., профессор<sup>3</sup>*

*Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова<sup>1</sup>, НИИ ФХБ им. М.А. Белозерского, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия<sup>2,3</sup>*

*murikamar@gmail.com<sup>1</sup>*

Транскетолаза (седогептулозо-7-фосфат: D-глицеральдегид-3-фосфат гликольальдегидтрансфераза, КФ 2.2.1.1), тиаминдифосфат-зависимый фермент, катализирует реакцию переноса двухуглеродного фрагмента с кетозы (субстрат-донор) на альдозу (субстрат-акцептор). Известно, что у транскетолазы очень широкая субстратная специфичность, что позволило предложить этот фермент для использования в органическом синтезе. В качестве субстрата-донора могут выступать как кетозы, удовлетворяющие стерическим требованиям фермента, так и нетипичный субстрат гидроксипируват, реакция с которым необратима. Оптические свойства фермента изменяются при связывании тиаминдифосфата и субстратов. При использовании в качестве субстрата-акцептора гликолевого альдегида, в результате транскетолазной реакции с гидроксипируватом образуется эритроулоза, оптически активное соединение. Благодаря этому возможно наблюдать за ходом реакции методом кругового дихроизма. В нашей работе мы исследовали транскетолазную реакцию с использованием в качестве субстрата-донора галогенированного производного гидроксипирувата, бромпирувата, сравнивая активность фермента с бромпируватом и с гидроксипируватом. Эта реакция интересно тем, что в случае, если бромпируват является непосредственным субстратом транскетолазной реакции, в результате возможно получить галогенированные сахара. Сродство субстратов к ферменту определяли в системе с искусственным акцептором электронов феррицианидом. Для сравнения механизма транскетолазной реакции с бромпируватом и с гидроксипируватом использовали аналог кофактора, 4'-метил-тиаминдифосфат.

В проведенных опытах было установлено, что спектры продуктов транскетолазной реакции с гидроксипируватом и с бромпируватом различны, при том, что сродство субстратов к ферменту примерно равное. Молярный адсорбционный коэффициент продукта реакции с бромпируватом отличается от такового в реакции с гидроксипируватом, что указывает на то, что в результате транскетолазной реакции с бромпируватом образуется иное соединение, чем в результате реакции с гидроксипируватом. Механизм реакции с бромпируватом отличается от механизма реакции с гидроксипируватом. Показано, что транскетолазная реакция с бромпируватом замедляется во времени, и субстрат расходуется не полностью, количество сохраняющегося в пробе субстрата зависит от начальной концентрации. В случае с гидроксипируватом реакция идет до полного исчерпания субстрата. Ранее считалось, что бромпируват не является непосредственным субстратом транскетолазы, а превращается в гидроксипируват в ходе реакции. Наши опыты позволяют нам утверждать, что это не так, и транскетолаза работает именно с бромпируватом.

## **Влияние тироксина и мерказолила на активность лизосомальных протеиназ в органах песцов**

***Рендаков Н.Л.***

*научный сотрудник, кандидат биологических наук*

*Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия*

*E-mail: nlrend@mail.ru*

Тиреоидные гормоны (ТГ) влияют на рост, развитие, дифференцировку тканей и репарацию. Воздействие тиреоидных гормонов на эти процессы связано в первую очередь с их влиянием на обмен белков. В литературе имеются сведения о влиянии ТГ на активность протеиназ - ферментов, осуществляющих полный или ограниченный распад белка в клетке. Функция протеиназ заключается не только в деструкции белков, но и в реакциях ограниченного протеолиза в качестве инструмента переключения биохимических реакций и физиологических процессов. ТГ оказывают влияние на активность катепсинов – протеолитических ферментов лизосом. Катепсины, являясь эндопептидазами, принимают участие в катаболизме белков на ранних стадиях их деградации, подготавливая их для дальнейшего гидролиза при участии экзопептидаз. Следует отметить, что роль ТГ в регуляции протеолиза у млекопитающих, в том числе у песцов, изучена недостаточно.

Цель данной работы заключалась в изучении влияния различных доз гормона тироксина и тиреостатического препарата мерказолила на активность катепсинов В и D и содержание белка в лизосомальной фракции печени 5-месячных песцов. В опыте 1 было исследовано 30 животных, которые были разделены на три равные группы – контрольную и две опытных. Песцы первой опытной группы получали мерказолил в количестве 5 мг на голову, во второй группе песцам давали тироксин по 50 мкг. В опыте 2 количество исследованных животных осталось прежним, а дозы препаратов были удвоены. Значимость межгрупповых различий оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. В опыте 1 введение тироксина привело к повышению удельной активности катепсина D повысилась на 28% по сравнению с контролем. Активность катепсина D в опыте 2 при введении мерказолила снизилась на 33%. Введение тироксина в опыте 2 привело к снижению активности катепсина D на 31%, а удельной активности - на 30%. Изменений массы тела у экспериментальных животных в опыте 1 обнаружено не было. В опыте 2 введение мерказолила вызвало увеличение массы животных на 5% по сравнению с контролем. Увеличение массы тела можно объяснить тем, что мерказолил вызывает гипотиреоидное состояние, характеризующееся снижением физической активности и основного обмена, положительным азотистым балансом, утолщением кожи, задержкой в ней воды и повышением содержания гликопротеидов. В проведенных нами исследованиях дозозависимый эффект препаратов был выявлен лишь в изменении массы тела животных. Установлена максимальная активность катепсина D в лизосомах селезенки, почек и печени, катепсина В - в лизосомах селезенки, печени и скелетных мышц. Активность катепсина В в лизосомах печени и почек значительно повышается при введении мерказолила с перерывами. В печени и почках введение тироксина привело к усилению катаболических процессов, что проявилось в повышении удельной активности катепсина D и снижении содержания белков в лизосомальных фракциях этих органов. В лизосомах сердца и мышц удельная активность катепсина D находилась в прямой зависимости от концентрации тироксина в сыворотке крови, что указывает на важную роль ТГ в регуляции протеолиза в этих тканях. Введение тироксина и мерказолила приводило к снижению содержания  $\alpha$ -глобулинов в сыворотке крови, при этом в большей степени этот эффект был характерен для тироксина.

**Развитие апоптоза в ткани коры головного мозга по каспаз-зависимому или каспаз-независимому пути определяется уровнем глюкозы**

*Селин Алексей Анатольевич, Лобышева Наталья Валентиновна*

*студент, аспирант*

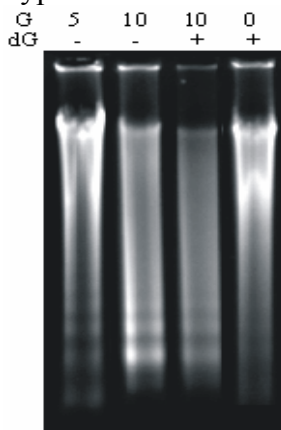
*Российский Государственный Медицинский Университет, Московский государственный университет им. Ломоносова, Москва, Россия*

*e-mail: [selin-a-a@mail.ru](mailto:selin-a-a@mail.ru)*

Постоянный приток глюкозы и кислорода к нейронам необходим для их нормального функционирования. В условии ишемии головного мозга снижение энергетических субстратов приводит к гибели нервных клеток.

Цель работы – установить существует ли связь между уровнем глюкозы в ткани и механизмом развития апоптоза. При исследовании механизмов развития апоптоза срезов коры головного мозга крысы, переживающих в условиях аноксии при различном содержании глюкозы в среде инкубации, было установлено: а) при высоком содержании глюкозы в среде (10мМ) в срезах протекал каспаз-зависимый тип апоптоза. б) при среднем содержании глюкозы в среде (5мМ) в срезах протекал каспаз-независимый тип апоптоза. в) при полном подавлении гликолиза (добавление 10 мМ дезокси-глюкозы) в срезах протекал некроз. Тип клеточной гибели определялся с помощью электрофореза ДНК, выделенной из срезов.

В различных условиях в ткани коры головного мозга может развиваться как каспаз-зависимый так каспаз-независимый апоптоз. Одним из факторов определяющих механизм развития апоптоза является уровень глюкозы в ткани.



**Рис.** Электрофорез ДНК. Срезы коры головного мозга переживали в условиях аноксии 24 часа с разным содержанием глюкозы и дезокси-глюкозы. G – глюкоза (мМ), dG – дезокси-глюкоза (20 мМ).

Табл.

Гомогенат, полученный из ткани коры гол. мозга.	Активность каспазы 3, нмоль АМС/мин
Интактная ткань (контроль)	68 ± 30
Ткань после индукции апоптоза при 5 мМ глюкозы	120 ± 30
Ткань после индукции апоптоза при 10 мМ глюкозы	1270 ± 60

Данные представлены в формате среднее арифметическое ± среднее квадратичное отклонение из трех независимых экспериментов

Авторы выражают признательность научному руководителю, д.б.н., профессору Л.С. Ягужинскому и к.б.н. А.А. Тоньшину за помощь в подготовке тезисов.

## Изучение тепловой денатурации бычьего сывороточного альбумина

**Семенюк Павел Игоревич**

*студент*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

*E-mail: pashech@list.ru*

Изучение тепловой денатурации позволяет пролить свет на факторы, определяющие устойчивость нативной формы белка и таким образом установить связь между его структурой и стабильностью. Считается также, что это может помочь понять механизмы сворачивания (фолдинга) белков.

Бычий сывороточный альбумин (БСА) – широко используемый и достаточно хорошо изученный с биохимической точки зрения белок. Известно, что он состоит из трех гомологичных доменов, но при низких значениях pH «разворачивается» и при нагревании денатурирует при температуре около 60°C, но более или менее четкой модели денатурации до сих пор предложено не было. Целью данной работы было моделирование процесса тепловой денатурации БСА и изучение влияния pH на конкретные стадии процесса.

Для изучения термоденатурации БСА были использованы методы дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), динамического лазерного светорассеивания (ДЛС) и кругового дихроизма (КД). Обнаружено, что БСА в зависимости от концентрации находится в двух формах, что проявляется как увеличение термостабильности более чем на 5°C при увеличении концентрации образца от 1 мг/мл до 3 мг/мл. Напротив, для каждой из форм значимой зависимости от концентрации не наблюдается.

В литературе упоминается наличие обратимой и необратимой стадий плавления БСА, однако получить точное приближение экспериментальных кривых теоретическими не удалось. Тем не менее, на основании данных ДСК и КД предложена более сложная модель денатурации БСА, включающая одну обратимую и необратимые стадии, для которых вычислены кинетические параметры. Изучено влияние pH на механизм и соответствующие параметры процесса денатурации.

### Литература

1. Любарев А.Е., Курганов Б.И. (2000) Изучение необратимой тепловой денатурации белков методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Успехи биологической химии, т. 40, с. 43 – 84.
2. Lyubarev A.E., Kurganov B.I., Burlakova A.A., Orlov V.N. (1998) Irreversible thermal denaturation of uridine phosphorylase from *Escherichia coli* K-12. Biophysical Chemistry, vol. 70, p. 247 – 248.
3. Friedli G.-L. (1996) Interaction of deamidated soluble wheat protein (SWP) with other food proteins and metals. A thesis for the award of Doctor of Philosophy.

## Сравнение структуры и физико-химических свойств белка 14-3-3 $\zeta$ и его точечных мутантов, имитирующих фосфорилирование

Случанко Николай Николаевич, Черник Иван Сергеевич

студент, младший научный сотрудник

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: [nns@live.ru](mailto:nns@live.ru)

В семейство 14-3-3 входят семь близкородственных белков, широко распространенных в клетках эукариот и способных образовывать устойчивые гомо- или гетеродимеры. Белки 14-3-3 являются универсальными адаптерными белками и способны взаимодействовать с более чем 200 различными белками-мишенями. При этом 14-3-3 преимущественно взаимодействуют с белками, содержащими фосфорилированные остатки серина или треонина в определенных консенсусных последовательностях. Выступая в качестве универсального адаптера, белки 14-3-3 принимают участие в передаче сигнала, регуляции апоптоза и клеточного цикла. Активность белков 14-3-3 может регулироваться путем фосфорилирования остатков Ser58, Ser184 и Thr232, однако влияние указанных модификаций на структуру и свойства 14-3-3 остается малоизученным. В связи с экспериментальными сложностями получения полностью фосфорилированных белков было проведено мутирование указанных остатков и получены мутантные белки S58E, S184E, T232E и S58E/S184E/T232E, имитирующие фосфорилирование. По данным кругового дихроизма в далекой ультрафиолетовой области мутация S58E слабо влияет на вторичную структуру 14-3-3, однако вызывает 15-20% увеличение триптофановой флуоресценции белка и усиливает его способность связывать гидрофобный зонд бис-АНС. Мутация S58E, имитирующая фосфорилирование 14-3-3, сильно повышает чувствительность белка к протеолизу. Точечные мутации S184E и T232E не оказывают существенного влияния на вторичную и третичную структуру 14-3-3 $\zeta$ , его чувствительность к действию протеаз, а также на его флуоресцентные и гидрофобные свойства. По данным гель-фильтрации и аналитического ультрацентрифугирования гидродинамические свойства S184E и T232E мало отличаются от свойств белка дикого типа, в то время как мутанты S58E и S58E/S184E/T232E при низкой концентрации белка обладают значительно меньшим радиусом Стокса и коэффициентом седиментации, чем белок дикого типа. Это может означать, что мутация S58E увеличивает вероятность диссоциации димеров 14-3-3. Действительно, при электрофорезе в отсутствие денатурирующих агентов электрофоретическая подвижность мутантов S58E и S58E/S184E/T232E была заметно выше подвижности белка дикого типа или его S184E и T232E мутантов. Химическое «сшивание» диметилсуберимидатом устраняет различия в электрофоретической подвижности исследуемых белков, что может быть обусловлено предотвращением диссоциации димеров 14-3-3. Таким образом, мутация S58E, имитирующая фосфорилирование 14-3-3 $\zeta$  по остатку серина-58, приводит к существенным изменениям физико-химических свойств белка. Указанные изменения могут модулировать взаимодействие 14-3-3 с различными белками-партнерами и, возможно, скорость деградации 14-3-3 в условиях *in vivo*.

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



**Введение гидроксильных групп в поли-N-этил-4-винилпиридиниевый катион как способ повышения эффективности подавления термоагрегации белков синтетическими полиэлектролитами**

**Стогов Сергей Владимирович**

*аспирант*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

*E-mail: stogoffster@gmail.com*

Недавно было установлено, что синтетические полиэлектролиты способны предотвращать термоагрегацию белков в водных и водно-солевых средах. Так, термоагрегация олигомерного фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД, рI 8,0, КФ 1.2.1.12) подавлялась введением противоположно заряженных высокомолекулярных полиионов, в частности, поли-N-этил-4-винилпиридиниевого катиона (ПЭВП) при  $pH > 8,0$  за счет образования растворимых белок/полиэлектролитных комплексов. Этот результат может представлять не только фундаментальный, но и практический интерес, поскольку ГАФД принимает активное участие в развитии нейродегенеративных заболеваний, во многом обусловленных агрегацией белков. Важность поиска средств борьбы с подобными заболеваниями определяет актуальность модельных исследований, призванных выработать критерии для направленного синтеза лекарственных средств.

Мы обнаружили, что введение гидроксильных групп в синтетический полиэлектролит может существенно повышать его способность подавлять термоагрегацию белка. Этот вывод следует из данных по термоагрегации ГАФД в присутствии различных поликатионов - ПЭВП катиона, не имеющего гидроксильных групп в цепи, и его гидроксильного аналога ПЭВП-ОН. Образец ПЭВП-ОН катиона получали алкилированием поли-4-винилпиридина этиленбромгидрином (оба поликатиона синтезированы на кафедре ВМС химического факультета МГУ и предоставлены проф. Изумрудовым В.А). Степень полимеризации поликатионов ПЭВП и ПЭВП-ОН была одинакова и составляла 1600 звеньев, степень алкилирования (доля заряженных звеньев в цепи) обоих поликатионов превышала 93%. В слабощелочных средах ( $pH 8,0 \div 9,0$ ) ПЭВП-ОН катион предотвращал термоагрегацию ГАФД заметно эффективнее, чем ПЭВП катион. Причем эта способность ПЭВП-ОН катиона оставалась столь же высокой и практически неизменной даже в нейтральных средах ( $pH 7,0 \div 7,5$ ), где присутствие ПЭВП катиона не оказывало никакого влияния на термоагрегацию белка. Благотворное воздействие ПЭВП-ОН катиона на белок разумно объяснить дополнительной стабилизацией белок/полиэлектролитного комплекса образующимися водородными связями между поликатионом и ГАФД, что подтверждается более высокой устойчивостью этого комплекса к вводимой соли (NaCl), которая оказывала разрушающее воздействие на комплекс ПЭВП/ГАФД. Инкубация ГАФД с обоими поликатионами при комнатной температуре не оказывала влияния на активность фермента, а их присутствие при термоинактивации ГАФД приводило лишь к небольшому снижению активности по сравнению с контролем.

Полученные данные свидетельствуют о плодотворности использования заряженных цепей с ОН группами (например, модифицированных полисахаридов) для подавления термоагрегации белков.

Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта РФФИ № 05-04-48955-а.

Автор выражает признательность профессору, д.б.н. Муронцу В.И. и профессору Изумрудову В.А. за помощь в подготовке тезисов.

## **Изучение взаимодействия промежуточных филаментов с митохондриями**

**Тюрин-Кузьмин Пётр Алексеевич**

*студент*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

*E-mail: [tyurinkuzmin.p@gmail.com](mailto:tyurinkuzmin.p@gmail.com)*

Митохондрии играют важную роль в физиологии клетки. Для нормального функционирования необходимо их правильное распределение в клетке, которое обеспечивается цитоскелетом. Распределение митохондрий достигается в результате транспорта по микротрубочкам и актиновым филаментам и “заякоривания” на элементах цитоскелета. По-видимому, в этом заякоривании принимают участие промежуточные филаменты (ПФ).

Ранее, в нашей лаборатории было показано, что нарушение ПФ в клетках приводит к увеличению подвижности митохондрий. В фибробластах линии MFT-16, которые не содержат главного белка ПФ виментина, подвижность митохондрий выше, чем в контрольных клетках MFT-6, содержащей виментиновые ПФ. Если в безвиментиновых клетках MFT-16 восстановить сеть ПФ при помощи экзогенного виментина человека, то подвижность митохондрий снижается до уровня, характерного для контрольных клеток. Мы предположили, что снижение подвижности митохондрий вызвано их взаимодействием с виментином, и поставили задачу определить, какая часть молекулы этого белка участвует во взаимодействии. Для этого для восстановления в клетках ПФ мы использовали мутантные формы виментина. Мы воспользовались тем фактом, что в N- и C-концевых доменах виментина содержатся участки, удаление которых не нарушает сборку филаментов, и решили проверить, не содержат ли эти участки места связывания с митохондриями. О связывании митохондрий с ПФ мы судили по их подвижности при помощи видеомикроскопии живых клеток. Мы нашли участок в середине N-конца молекулы виментина, удаление которого приводит к тому, что ПФ построенные из такого виментина, не влияют на подвижность митохондрий, как будто ПФ в клетке нет. При удалении других участков молекулы виментина восстановленные ПФ снижали подвижность митохондрий до уровня, характерного для контрольных клеток. Также, при замене в найденной последовательности одной из аминокислот (пролин-56 на аргинин) виментин теряет способность связывать митохондрии. То есть, для взаимодействия с митохондриями, по-видимому, важна структура этого участка молекулы виментина.

Таким образом, мы нашли участок на N-конце молекулы виментина, который отвечает за связывание с митохондриями.

## Изменение ионного баланса в каллусных тканях мягкой пшеницы под действием токсичных метаболитов фитопатогенных грибов

**Федотова Надежда Сергеевна**

Младший научный сотрудник

Лаборатория мониторинга АО «Биомедпрепарат-инжиниринговый центр

e-mail: [nadyamikhnova@mail.ru](mailto:nadyamikhnova@mail.ru)

Обезвоживание клетки в растворе соли приводит к отставанию цитоплазмы от клеточных стенок. Такое явление называют плазмолизом. В проведенных нами исследованиях были выявлены различные варианты плазмолиза, возникающие в растительных клетках под действием токсичных метаболитов фитопатогенных грибов – культуральных фильтратов. Наблюдали варианты колпачкового плазмолиза в различной степени проявления, в зависимости от концентрации культурального фильтрата (КФ). В клетках растений нет никакой изолированной фракции прочно связанной воды, не поддающейся обмену. Плазмолиз в клетке наступает из-за слабой проницаемости тонопласта, а колпачки плазмы образуются вследствие набухания ее от проникших через плазмалемму ионов  $K^+$  в мезоплазму. Еще одним важным ионом, влияющим на состояние клетки, является  $Ca^{2+}$ . В наших исследованиях изучали изменение ионного баланса под воздействием токсичных метаболитов грибов в проростках пшеницы, полученных в растворах КФ гриба *Fusarium graminearum* штамма F14 и в каллусных тканях, культивируемых на средах с различными концентрациями КФ. Метод определения  $Ca^{2+}$  - титриметрический. Основан на способности комплексона III образовывать в щелочной среде в интервале pH 12-13 комплексные соединения с  $Ca^{2+}$  сиренево цвета. Ионы  $K^+$  определяли гравиметрическим методом. Метод основан на способности  $K^+$  с хлористым барием образовывать садок желтого цвета. Под действием КФ наблюдали снижение концентрации  $Ca^{2+}$  и увеличение  $K^+$  в проростках различных сортов мягкой пшеницы по сравнению с контрольным вариантом. В качестве контроля использовали проростки мягкой пшеницы выращенные в дистиллированной воде. Причем, у более устойчивого сорта наблюдали более высокую величину соотношения этих двух ионов. В каллусных тканях на селективных средах наблюдалось снижение концентрации  $Ca^{2+}$  с 0,08 мг/г до 0,02 мг/г при повышении концентрации КФ в среде от 0 до 30%. Количество  $K^+$  при повышении концентраций КФ увеличивалось. Также проведено определение ионов в растениях-регенерантах, культивируемых на среде для регенерации с различным сочетанием экзогенных фитогормонов. В данном случае наблюдали вариабельность количества ионов в клетках в зависимости от гормонального состава среды. Содержание  $Ca^{2+}$  при культивировании растений-регенерантов, полученных на одной и той же среде – МС+30% КФ F.g. варьировало от 0,01 до 0,11 мг/г. Известно, что Са повышает устойчивость растений к различным стрессам. Он как вторичный посредник воспринимает информацию первичного сигнала (КФ) и регулирует биохимические процессы. Значительная часть  $Ca^{2+}$  содержится в клеточных стенках растений (в форме пектатов, карбонатов, сульфатов) и в вакуолях (в форме оксалата). Под влиянием КФ фитопатогенных грибов происходит воздействие на клеточную стенку, концентрация  $Ca^{2+}$  в цитоплазме клеток возрастает, а затем происходит связывание  $Ca^{2+}$  кальмодулином, который связывается с зависимыми от него ферментами и активирует белки. Следовательно, клетки растений и каллусные клетки пшеницы располагают механизмами для поддержания определенного уровня свободных  $Ca^{2+}$  в цитозоле и функционирования  $Ca^{2+}$  в качестве вторичного посредника в регуляции метаболизма. Однако, при высоких концентрациях КФ происходит резкое уменьшение ионов кальция в клетке, происходит гибель значительной части каллусных тканей.

## Влияние дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* на нейтрофилы периферической крови мышей *in vivo*

Феклина Марина Сергеевна, Каменек Д.В., Юнусова Э.К.

аспирант, старший преподаватель, студентка

Ульяновский государственный университет, Ульяновск, Россия

E-mail: [morskaya81@list.ru](mailto:morskaya81@list.ru)

В настоящее время широкое применение в сельском хозяйстве находят дельта-эндотоксинсодержащие препараты, созданные для регуляции численности насекомых-вредителей растений на основе спорообразующей бактерии *Bacillus thuringiensis*. *B.thuringiensis* является естественным компонентом микрофлоры почв и, следовательно, ее применения в защитных мероприятиях, существенно не нарушает видовую структуру биоценозов. Имеется достаточно данных, которые показывают, что препараты обладают антибактериальным, инсектицидным и фунгицидным действием. В основе этого действия лежит свойство дельта-эндотоксина разобщать процессы дыхания и окислительного фосфорилирования. В связи с широким распространением эндотоксинсодержащих препаратов особо актуальным является изучение влияния данного эндотоксина на теплокровных животных.

Целью исследования явилось изучение его влияния на клетки периферической крови мышей и в частности на активность ферментов лизосом нейтрофилов; комплекс лизосомальных катионных белков, миелопероксидазу. Исследования *in vivo* проводили на здоровых беспородных белых мышах – самках, средний вес которых составлял 30 граммов, возраст 6 месяцев. В каждом варианте опыта использовали по 10 животных. В опытах *in vivo* мышам перорально вводили токсин в дозах 0,025г/кг, 0,05г/кг, 0,1г/кг. Забор крови осуществляли из хвостовой вены мышей. Степень активности миелопероксидазы и катионных белков оценивали по среднему цитохимическому коэффициенту (СЦК) и выражали в единицах активности (ea). Под воздействием дельта-эндотоксина *B.thuringiensis* в опытах *in vivo* происходило увеличение показателя миелопероксидазной активности. Наименьшие значения миелопероксидазы нейтрофилов отмечали в первые сутки эксперимента при дозе 0,025г/кг, через четыре недели показатель увеличивался в два раза. При дозе дельта-эндотоксина 0,05г/кг увеличение достигало 1,5 раза. При дозе 0,01г/кг активность миелопероксидазы к концу месяца эксперимента наблюдается небольшое уменьшение показателя (на 30%), что может быть связано со значительной конечной дозой препарата. Дельта-эндотоксина вызывает некоторое увеличение показателя активности лизосомально-катионных белков нейтрофилов во всех опытных группах мышей по сравнению с контрольной начиная с первых суток эксперимента. Наименьшие значения активности отмечены в первых сутках эксперимента, через 4 недели увеличение достигло 30% при дозе 0,025 г/кг и 60% при дозе 0,05г/кг. При применении значительной дозы препарата (0,1 г/кг) отмечали повышение значений только на 5%, что подтверждает ранее сделанные выводы об угнетающем действии больших доз дельта-эндотоксина. Таким образом, эндотоксин в концентрации до 0,1г/кг не обладает цитотоксическим действием. По-видимому, под его влиянием возможно лишь некоторое стимулирование лизосомально-катионных белков и миелопероксидазы нейтрофилов, что, очевидно, связано с неспецифической реакцией клеток на чужеродный белок.

## Плюроник L-64 усиливает накопление катионного циклоимидного производного хлорина р6 в раковых клетках

Честнова Анастасия Владимировна,<sup>\*1,2</sup> Игнатова Анастасия Александровна<sup>2</sup>,  
Мионов Андрей Федорович<sup>1</sup>, Феофанов Алексей Валерьевич<sup>2</sup>

\*Студент

Московская государственная академия тонкой химической  
технологии им. М.В.Ломоносова<sup>1</sup>, Институт биоорганической химии  
им. М.М.Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия<sup>2</sup>  
E-mail: chestnova86@rambler.ru

Фотодинамическая терапия является одним из новых перспективных и быстроразвивающихся подходов к лечению рака. Метод основан на избирательном накоплении фотосенсибилизаторов (ФС) в раковых клетках с последующим облучением опухоли светом с длиной волны, соответствующей полосе длинноволнового поглощения ФС. При светоиндуцированной активации ФС происходит генерация активных форм кислорода, вызывающих гибель раковых клеток. В качестве высокоактивных ФС изучаются соединения различных классов, в том числе, производные порфиринов. При разработке гидрофобных ФС, способных проникать через мембрану клетки, важной задачей является поиск оптимальных солюбилизаторов, обеспечивающих, с одной стороны, высокую растворимость ФС в биологических средах, а с другой стороны, эффективное проникновение и накопление ФС в раковых клетках.

Проведенное нами исследование одного из катионных циклоимидных производных хлорина р6 (ЦИХЛ-К), показало, что с традиционно используемым для данных соединений солюбилизатором, кремофором EL (CrEL), проникновение ЦИХЛ-К в раковые клетки очень мало. Нами обнаружено, что плюроник L-64 способствует значительному усилению накопления ЦИХЛ-К (но не других исследованных производных) в клетках аденокарциномы легкого человека A549 (Рис.1). Коэффициент накопления ЦИХЛ-К в клетках (т.е. отношение средней цитоплазматической концентрации ЦИХЛ-К к его концентрации во внешней среде) при использовании L-64 в 70 раз больше, чем в случае CrEL. С учетом длинноволнового поглощения ( $\lambda_{\text{макс}}=701$  нм), значительной фотостабильности и высокого квантового выхода генерации синглетного кислорода ( $\Phi=0,45$ ) ЦИХЛ-К в комбинации с L-64 может служить основой для разработки эффективного ФС для фотодинамической терапии рака.

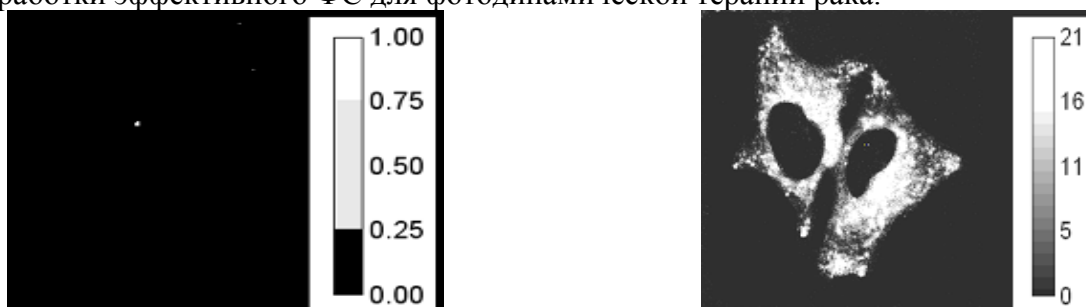


Рис. 1 Накопление и распределение ЦИХЛ-К в клетках A549 при использовании CrEL (слева) и плюроника L-64 (справа). Клетки инкубировали с ЦИХЛ-К (0,7 мкМ) 3 ч.

**Участие митохондрий в миоглобин-индуцированном окислительном стрессе в клетках почки**

**Чупыркина Анастасия Андреевна, Зоров Д.Б., Плотников Е.Ю.**

*студент*

*Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

*E-mail: [bonny\\_blue@bk.ru](mailto:bonny_blue@bk.ru)*

Одной из причин острой почечной недостаточности (ОПН) является острый некроз мышц – рабдомиолиз. Высвободившийся при этом миоглобин откладывается в канальцах почки и приводит к их дисфункции. Считается, что одной из причин ОПН является не только обструкция канальцев и ухудшение тока первичной мочи, но и окислительный стресс, индуцированный окисленной формой миоглобина – метмиоглобином. В данной работе мы исследовали развитие окислительного и нитрозильного стресса в клетках почки и функционирование митохондрий при рабдомиолизе.

Анализ крови крыс показал, что при развитии рабдомиолиза происходит значительное увеличение в крови активности ферментов, маркеров разрушения ткани. Острая уремия и азотемия, спровоцированные рабдомиолизом, достигали своего пика на 1-2 день. Однако средняя концентрация глюкозы в крови возрастала вплоть до 13 суток, что говорит о развитии хронической почечной недостаточности. Было показано, что при рабдомиолизе на первые сутки происходит падение дыхательного контроля почечных митохондрий – до 25 % по сравнению с контролем. При этом в митохондриях почки было отмечено повышение уровня МДА более чем вдвое. Кроме того, в сыворотке крови при миоглобинурии наблюдается пятикратное повышение концентрации нитрита, что указывает на развитие нитрозильного стресса. Одновременно в сыворотке крови уже через 9 часов после индукции миоглобинурии наблюдается снижение тотальной антиоксидантной активности, которое сохраняется и через 24 часа. Влияние различных концентраций миоглобина на митохондрии было исследовано в системе *in vitro*. Обнаружено, что инкубация изолированных митохондрий почки с миоглобином приводит нарушению окислительного фосфорилирования, очевидно из-за окисления мембранных липидов. О повреждении митохондрий и развитии гибели клеток почки говорило также появление в крови цитохрома с, что по данным некоторых авторов свидетельствует о гибели клеток почки по апоптотическому пути.

Таким образом, мы обнаружили, что явления функциональной почечной недостаточности при миоглобинурии напрямую связаны с развитием окислительного и нитрозильного стресса. Более того, основным участником в развитии этих явлений являются митохондрии клеток почки, и именно их повреждение может провоцировать дальнейшую гибель клеток и дисфункцию всего органа.

**Влияние  $\text{Ca}^{2+}$  на активность транскетолазы****Юршев Владимир Александрович**

аспирант

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия**e-mail: yurshevva@mail.ru*

Транскетолаза, тиаминдифосфат-зависимый фермент, катализирующий реакцию расщепления кетозы (субстрата-донора) с последующим переносом образующегося остатка гликолевого альдегида на альдозу (субстрат-акцептор). Транскетолаза – это гомодимер с двумя активными центрами, которым для проявления каталитической активности требуется, наряду с коферментом, тиаминдифосфатом, наличие ионов двухвалентных металлов, таких, как  $\text{Ca}^{2+}$  или  $\text{Mg}^{2+}$ . Активные центры характеризуются одинаковой каталитической активностью. Двухвалентные катионы необходимы для связывания кофермента с транскетолазой, выполняя функцию мостика между пирофосфатным остатком тиаминдифосфата и апобелком. Вопрос об их необходимости для взаимодействия субстратов с ферментом, или собственно для катализа, до последнего времени оставался открытым. Изучению этого вопроса и была посвящена наша работа. Для этого мы реконструировали холотранскетолазу и определили ее каталитическую активность в отсутствие и в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ . Оказалось, что во втором случае она, примерно, в полтора раза выше, чем в первом. Для выяснения вопроса о том, на активность какого из двух активных центров влияет  $\text{Ca}^{2+}$ , мы получили две формы транскетолазы, в каждой из которых функционировал только один из двух активных центров. Повышение активности этих форм фермента в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  было одинаковым и не отличалось от такового, показанного для холофермента. Влияние  $\text{Ca}^{2+}$  направлено, по всей видимости, на повышение собственно каталитической активности транскетолазы, а не на сродство субстратов к ферменту, которые использовались в насыщающей концентрации.

Работа поддержана РФФИ (грант 06-04-48395). Автор выражает признательность профессору, Кочетову Г. А. за помощь в подготовке тезисов.