

Изучение α -гарпининов, группы антифунгальных пептидов растений

Беркут Антонина Анатольевна^{1,2} (Опарин Петр Борисович², Василевский Александр Александрович²)

¹Московский физико-технический институт, ²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия.

AntoninaBerkut@gmail.com

Из арсенала средств, с помощью которых растение защищается от вторжения патогена, особое внимание привлекают защитные пептиды, в частности антимикробные пептиды (АМП). В настоящее время по наличию уникальных цистеиновых мотивов, определяющих пространственную укладку, АМП растений подразделяют на несколько групп. Данная работа посвящена группе α -гарпининов, открытой и активно исследующейся в ИБХ РАН. Для представителей этой группы характерен цистеиновый мотив Cys-Хаа₃-Cys и пространственная укладка, представленная двумя антипараллельными α -спиралями, соединенными двумя дисульфидными связями.

Из ряда сорняков *Triticum kiharae*, *Echinochloa crus-galli* и *Stellaria media* были выделены антифунгальные пептиды, названные соответственно Tk-Amp-X2, Ec-Amp-1 и Sm-Amp-C4, цистеиновый мотив которых позволил отнести их к группе α -гарпининов. Для исследования их антифунгальной активности пептиды были наработаны в бактериальной системе экспрессии с выходом ~7 мг, ~2 мг и ~5 мг с 1 л культуры *Escherichia coli*. Была установлена идентичность полученных рекомбинантных и природных пептидов. Тестирование биологической активности показало, что рекомбинантные Tk-Amp-X2, Ec-Amp-1 и Sm-Amp-C4 активны в отношении ряда фитопатогенных грибов в микромолярных концентрациях. На основании характера связывания флуоресцентно меченого Ec-Amp-1 со спорами гриба *Fusarium solani* был предположен двухстадийный механизм его антифунгального действия, согласно которому пептид сначала связывается с оболочкой гриба, а затем проникает и концентрируется внутри клеток. В результате изучения первой стадии этого механизма было показано, что антифунгальные α -гарпинины связываются с хитином и 1,3- β -глюканом – основными полисахаридами клеточной стенки грибов.

Исследование α -гарпининов является перспективным, т.к. они могут стать основой для разработки пестицидов и антибиотиков нового поколения.

Работа поддержана РФФИ (грант № 11-04-00190) и Минобрнауки РФ (Госконтракт № 16.740.11.0424).

Анализ экспрессии HSPB8 и его «цистеинового мутанта» в клетках линии HEK293 и hTERT-RPE

Быков Юрий Сергеевич

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

eripogium@gmail.com

Малые белки теплового шока (HSPB) участвуют во многих клеточных процессах и защищают клетку от различных неблагоприятных воздействий. Наиболее подробно изученный малый белок теплового шока – HSPB1 – содержит единственный остаток цистеина (Cys137), расположенный в α -кристаллиновом домене в области контакта двух мономеров. Структурные особенности взаимодействия разных представителей семейства малых белков теплового шока человека (в том числе и HSPB8) довольно слабо изучены. В связи с тем, что межсубъединичные взаимодействия в составе олигомеров играют важную роль в функционировании HSPB, представляется желательным получение точечных мутантов, содержащих в своей структуре

остаток цистеина в области межсубъединичных контактов. С этой целью был получен так называемый цистеиновый мутант HSPB8, в котором все эндогенные остатки цистеина были заменены на остатки серина и, одновременно с этим, введен единственный остаток цистеина в положение, гомологичное Cys137 HSPB1.

Целью данной работы было получение молекулярно-генетических конструкторов для экспрессии HSPB8 «дикого типа» (HSPB8WT) и его «цистеинового мутанта» (HSPB8Cys) в эукариотической системе и анализ их экспрессии и внутриклеточной локализации в клетках линии HEK293 и hTERT-RPE.

Кодирующие последовательности HSPB8WT и HSPB8Cys клонировали из прокариотической плазмиды pET23 в эукариотический вектор pcDNA6 myc-His A. Полученными конструкторами трансфицировали клетки линии HEK293 и hTERT-RPE. Клетки линии HEK293 лизировали, содержание HSPB8 анализировали методом Western blotting и ИФА. Клетки линии hTERT-RPE фиксировали для определения локализации HSPB8 методом иммуноцитохимии и окрашивали антителами, специфичными к HSPB8, конъюгированными с FITC.

В нетрансфицированных клетках HEK293 методом Western blotting не обнаружено эндогенного HSPB8, в то время как в трансфицированных клетках удается определить значительные количества исследуемого белка. В клетках линии hTERT-RPE методом иммуноцитохимии обнаружена экспрессия эндогенного HSPB8. Однако трансфицированные клетки имеют более яркую окраску, что говорит о том, что происходит экспрессия HSPB8 с полученных в данной работе молекулярно-генетических конструкторов. Установлено, что в клетках этой линии как HSPB8WT, так и HSPB8Cys распределены диффузно в цитоплазме и ядре.

Получение высокоочищенных рекомбинантных белков CYP2C9*1, CYP2C9*2 и CYP2C9*3

Гайдукевич Ирина Витальевна

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.

ihaidukevich@gmail.com

Цитохром CYP2C9 является одним из важнейших представителей 2C подсемейства цитохромов P450 человека, и его содержание составляет ~20% от общего количества цитохромов в печени. Этот фермент метаболизирует примерно 20% наиболее используемых лекарственных препаратов (>120), в том числе препаратов, имеющих узкий терапевтический индекс (варфарин, толбутамид, фенитоин). В гене *CYP2C9* на сегодняшний день описано около 35 полиморфизмов. Среди европейской популяции наиболее распространенными являются 2 полиморфных варианта, приводящие к образованию фермента с измененной активностью (по отношению к некоторым лекарственным препаратам) вследствие аминокислотной замены: CYP2C9*2 (Arg144Cys) и CYP2C9*3 (Ile359Leu). Изменение активности данного фермента ведет к изменению фармакокинетики лекарственных препаратов (субстратов CYP2C9).

Наиболее удачной моделью изучения метаболизма субстратов CYP2C9 различными полиморфными формами данного фермента, а также для оценки вклада CYP2C9 в метаболизм новых лекарственных препаратов, является реконструированная *in vitro* система, содержащая высокоочищенные рекомбинантные белки.

Целью данной работы было получение высокоочищенных препаратов рекомбинантных белков CYP2C9*1 (дикий тип), CYP2C9*2 и CYP2C9*3. Для этого ген *CYP2C9* человека был клонирован в экспрессионную плазмиду pCW, проведен мутагенез с целью получения природных форм CYP2C9*2 (Arg144Cys) и CYP2C9*3 (Ile359Leu). Были оптимизированы условия гетерологической экспрессии в клетках *E.coli*, выделения и очистки этих белков. В результате получены высокоочищенные препараты активных рекомбинантных белков CYP2C9*1, CYP2C9*2 и CYP2C9*3, а также проведена оценка их физико-химических и каталитических свойств.

Таким образом, в результате проделанной работы был разработан метод получения высокоочищенных рекомбинантных белков CYP2C9*1, CYP2C9*2 и CYP2C9*3. Данные

препараты белков могут быть использованы в *in vitro* системах для тестирования новых лекарственных препаратов.

Применение флуоресцентных химер для изучения гетероолигомерных комплексов малых белков теплового шока человека

Дацкевич Петр Николаевич (Мымриков Евгений Викторович)

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
кафедра биохимии, Москва, Россия.*

datsbio@gmail.com

Малые белки теплового шока (sHsp) широко распространены и выполняют функции, связанные с поддержанием белкового гомеостаза, регуляции процессов апоптоза, пролиферации, сворачивания белков и др. У человека обнаружено 10 представителей семейства малых белков теплового шока, многие из которых экспрессируются совместно. Формирование гетероолигомерных комплексов может существенно влиять на функции sHsp, поэтому изучение образования и свойств таких комплексов является важной задачей.

В нашей работе мы исследовали химерные белки, состоящие из 4 повсеместно экспрессируемых малых белков теплового шока человека (HspB1, HspB5, HspB6, HspB8) и улучшенных цианового (eCFP) или желтого (eYFP) флуоресцентных белков. Размеры образующихся гетероолигомеров определяли методом гель-хроматографии. За процессом комплексообразования наблюдали по изменениям интенсивности и анизотропии флуоресценции флуоресцентных белков, входящих в состав химер.

Методом гель-фильтрации установлено, что sHsp в составе химер образуют комплексы с теми же партнерами, что и малые белки теплового шока дикого типа. HspB1 и HspB6 дикого типа образовывали два типа гетероолигомерных комплексов с молекулярными массами 100 и 300 кДа, а химеры этих белков образовывали только гетерокомплексы с молекулярной массой 270 кДа. Химеры, содержащие HspB5 и HspB6, также как и белки дикого типа, образовывали только один тип гетероолигомеров. Используя метод флуоресцентной спектроскопии, мы смогли исследовать кинетику образования гетероолигомеров химерных белков в реальном времени, а также подтвердить данные, полученные при гель-фильтрации. Установлено, что скорость комплексообразования зависит от температуры и природы взаимодействующих белков. Используя метод анизотропии флуоресценции, мы подтвердили способность HspB1/HspB6, HspB5/HspB6 и HspB1/HspB5 образовывать гетероолигомерные комплексы. Однако ни при каких условиях мы не смогли обнаружить гетероолигомерные комплексы, сформированные при участии HspB8.

Таким образом, установлено, что химеры с флуоресцентными белками могут быть использованы для исследования образования гетероолигомеров малых белков теплового шока, при этом избирательность взаимодействия не зависит от прикрепления флуоресцентных белков. В то же время размеры комплексов, образуемых белками дикого типа и их химерами, довольно сильно различаются. Это ставит под сомнение успешность использования флуоресцентных химер для локализации гетероолигомерных комплексов внутри клетки.

Свободнорадикальные процессы в слизистой оболочке желудка крыс при длительном гипоацидном состоянии

Двореценко Екатерина Александровна¹ (Сенин Сергей Андреевич²)

Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко,

УНЦ «Институт биологии», Киев, Украина.

k21037@gmail.com

Среди патологий желудочно-кишечного тракта важное место занимают гипоацидные состояния. Длительная гипохлоргидрия приводит к гипергастринемии и развитию атрофии и метаплазии слизистой оболочки желудка (СОЖ). Ранним, универсальным механизмом повреждения тканей является активация свободнорадикальных процессов, приводящая к развитию в клетке окислительного стресса.

Целью наших исследований было изучить интенсивность свободнорадикальных процессов в СОЖ крыс при длительном угнетении секреции гидрохлоридной кислоты.

Исследования проводили на белых нелинейных половозрелых крысах-самцах. Гипоацидное состояние моделировали внутрибрюшинным (в/б) введением 14 мг/кг омепразола 1 раз в сутки на протяжении 28 дней. В качестве контроля использовали крыс, которым 28 дней вводили в/б 0,2 мл воды для инъекций. После экстракции липидов хлороформ-метанольной смесью, снимали спектры функциональных групп липидов на инфракрасном Фурье-спектрометре. Содержание диеновых конъюгатов (ДК) определяли в гептан-изопропанольном экстракте спектрофотометрическим методом, шиффовых оснований (ШО) – флуориметрическим методом, ТБК-активных соединений (ТБК-АС) – по реакции с тиобарбитуровой кислотой. Содержание простагландинов (ПГ) определяли методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии после их предварительной экстракции из СОЖ в кислой среде этилацетатом.

После длительного угнетения секреции гидрохлоридной кислоты омепразолом, структурная организация липидов СОЖ изменялась: увеличивалось содержание гидроксильных групп – в 5 раз; альдегидных групп – в 6 раз, транс-изомеров – в 2 раза, при этом снижалось количество карбонильных групп – в 3 раза, фосфатных групп – в 1,4 раза и цис-изомеров – в 3,5 раза относительно контроля. Установлено, что при длительной гипохлоридрии в СОЖ содержание продуктов ПОЛ увеличивалось: ДК – в 3,5 раза, ТБК-АС – в 4,6 раза и ШО – в 3,1 раза относительно контроля. При гипоацидном состоянии в СОЖ увеличивалось содержание ПГЕ₂ – в 3 раза, ПГФ_{2 α} – в 2 раза и 8-изо-ПГФ_{2 α} – в 6 раз по сравнению с контролем.

Таким образом, на фоне длительного угнетения желудочной секреции гидрохлоридной кислоты в СОЖ крыс активируются свободнорадикальные процессы, о чем свидетельствует увеличение гидроксильных, альдегидных групп и транс-изомеров, продуктов перекисного окисления липидов и 8-изо-ПГФ_{2 α} . Возрастание ПГЕ₂ и ПГФ_{2 α} в СОЖ при гипоацидном состоянии может свидетельствовать о вовлечении этих эйкозаноидов в процессы, связанные с развитием гастроканцерогенеза.

Влияние карнозина на процессы окислительного стресса, апоптотической и некротической смерти в тимоцитах, вызванные действием различных концентраций уабаина на Na/K-АТФазу

Дергалёв Александр Андреевич (Кулебякин Константин Юрьевич)

Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова,

биологический факультет, кафедра биохимии, Москва, Россия.

alexanderdergalioff@gmail.com, konstantin-kuleb@mail.ru

Известно, что в результате ингибирования Na/K-АТФазы уабаином, кардиотоническим стероидом с высоким сродством к ферменту, наблюдается аккумуляция свободных радикалов в клетках и активация сигнальных каскадов, управляющих их жизнеспособностью. Тимоциты экспрессируют два типа Na/K-АТФазы, каталитическая (α) субъединица в которых представлена изоформами с высоким и низким сродством к уабаину. Для изучения участия этих типов Na/K-АТФазы в сигнальных реакциях тимоцитов, а также влияния на эти процессы природного антиоксиданта карнозина, и было предпринято данное исследование. Исследование проводилось на тимоцитах, выделенных из крыс линии Wistar Kyoto. В работе использовали метод проточной цитометрии для определения уровня свободнорадикальных соединений в клетке, а также для определения количества клеток, претерпевающих процесс апоптотической или некротической смерти. Было установлено, что высокая концентрация уабаина вызывают устойчивое во времени увеличение уровня свободнорадикальных соединений в тимоцитах, в то время как низкие его концентрации — краткосрочный, исчезающий со временем рост данного показателя, что позволяет предположить участие этих свободных радикалов в клеточном сигналинге в роли вторичных мессенджеров. Показано, что карнозин предотвращает рост уровня свободных радикалов под действием уабаина. Также было показано, что низкая концентрация уабаина вызывает увеличение количества апоптотических клеток, тогда как высокие концентрация этого соединения индуцирует как апоптотическую, так и некротическую

смерть. Карнозин в обоих случаях снижает уровень клеточной смертности. Полученные данные позволяют предположить, что действие убаина на убаин-чувствительную форму Na/K-АТФазы запускает процесс клеточного сигналинга, приводящий к индукции апоптоза, тогда как ингибирование убаин-резистентной формы фермента приводит к развитию окислительного стресса, вызывающего некротическую смерть клетки. Авторы выражают благодарность Александру Александровичу Болдыреву за ценные советы и замечания, сделанные в ходе данной работы.

Получение рекомбинантного N-концевого фрагмента человеческого IGFBP-4 и изучение его иммунохимических свойств

Ермакова Юлия Геннадьевна (Кравченко Дмитрий Сергеевич)

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

ermakova.iylia@yandex.ru

IGFBP-4 относится к группе белков, связывающих инсулиноподобные факторы роста I и II, и является специфичным субстратом для протеазы PAPP-A (Pappalysin-1), которая активируется в нестабильных атеросклеротических бляшках. PAPP-A расщепляет IGFBP-4 по единственному участку протеолиза между остатками Met135 и Lys136. Предполагается, что в нестабильных атеросклеротических бляшках повышается активность PAPP-A, что может приводить к появлению в крови фрагментов IGFBP-4. Количественное определение содержания фрагментов IGFBP-4 в крови возможно при наличии калибратора – очищенного препарата протеолитических фрагментов белка. Для этого целесообразно получать рекомбинантные белки в экспрессионных системах, которыми в большинстве случаев являются культуры эукариотических и бактериальных клеток. При этом рекомбинантные белки должны обладать иммунохимическими свойствами, максимально похожими на свойства нативных белков.

Целью работы было получение N-концевого фрагмента IGFBP-4 (N-IGFBP-4) в эукариотической (клетки линии HEK293f) и прокариотической (*E.coli* штамм BL21(DE3) pLysS) системах экспрессии и изучение его биохимических и иммунохимических свойств. Белок экспрессировали в генетических конструкциях на основе эписомальной (pCER4) и интегральной (pCDNA3.1/Hygro(+)) плазмид, несущих ген N-IGFBP-4. Конструкции отличались наличием встроенной последовательности, кодирующей различные сигнальные пептиды (два искусственных и один нативный), которые обеспечивают секрецию IGFBP-4 во внеклеточную среду. Наличие N-IGFBP4 в среде было проанализировано методом ФИА «сэндвич»-типа с помощью пары антител, специфически узнающих этот белок. Показано, что в случае использования нативного сигнального пептида наблюдается наивысший уровень экспрессии белка. Изучена динамика экспрессии белка, а также проведена оценка стабильности рекомбинантного эукариотического N-IGFBP-4 в культуральной среде.

Методом аффинной хроматографии рекомбинантный N-IGFBP-4 выделен из кондиционированной культуральной среды клеток HEK293, а также из лизата бактерий. Чистоту выделенного препарата оценивали методом электрофореза по Леммли. Иммунохимические свойства рекомбинантных белков были изучены различными методами иммунохимического анализа и методом Western blotting.

Цинк-связывающий домен бета-амилоида человека и крысы в молекулярном механизме болезни Альцгеймера

Куликова Александра Александровна

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия.

Kulikovaaa@gmail.com

Болезнь Альцгеймера (БА) связывают с аномальным процессом внеклеточного накопления насыщенного ионами металлов, в частности ионами цинка, бета-амилоида (A β). Первые шестнадцать аминокислотных остатков A β формируют его металл-связывающий домен

и играют критическую роль в процессе патогенной цинк-зависимой олигомеризации Аβ. Крысы и мышцы устойчивы к БА. Ключевым фактором резистентности этих грызунов к БА может быть наличие трех аминокислотных замен (R5G, Y10F, H13R) в металл-связывающем домене Аβ.

В рамках данной работы были определены термодинамические параметры связывания Zn^{2+} с фрагментами Аβ человека и с мутантами Аβ(1-16) человека и крысы в физиологических условиях с помощью метода изотермической калориметрии титрования (ИКТ).

Установлено, что фрагмент 6-14 Аβ человека формирует его минимальный Zn^{2+} -связывающий сайт, в котором ион Zn^{2+} координируется аминокислотными остатками His6, Glu11, His13 и His14. Кроме того, тетрапептид Аβ(11-14) формирует димеры, в которых фрагменты Аβ связаны посредством иона цинка. Таким образом, регион EVNH Аβ может служить лекарственной мишенью, направленное блокирование которой будет препятствовать Zn^{2+} -зависимой агрегации Аβ.

Кроме того, была показана цинк-индуцируемая димеризация фрагмента Аβ(1-16) крысы. Ион цинка координируется His6 и His14 двух пептидных цепей Аβ(1-16). Таким образом, было установлено различие в характере координации ионов цинка человеческим и крысиным металл-связывающим доменом Аβ, которое может служить одним из объяснений устойчивости крыс к БА.

АТФазная активность мембранного транспортера, белка множественной лекарственной устойчивости MRP7

Малофеева Екатерина Викторовна¹ (А.Н. Фаттахова¹, Е. Норпер-Борге²)

¹ *Казанский Федеральный (Приволжский) университет
Казань, ул. Университетская 18, Россия, 420111*

² *Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA, 19111
Katrin537@yandex.ru*

В настоящее время множественная лекарственная устойчивость (МЛУ), способность клеток становится нечувствительными к химиотерапии, является одной из немаловажных проблем в онкологии и биологии. Механизмов проявления МЛУ существует несколько, одним из таких является повышенная экспрессия генов, ответственных за кодирование АТФ-зависимых белков-транспортеров, которые так и принято называть – белки множественной лекарственной устойчивости. На данный момент основной задачей в этом направлении является поиск веществ, способных ингибировать активность данных белков.

MRP7 является седьмым членом данного семейства и остается наименее изученным белком. Основной целью данной работы является изучение биохимических особенностей MRP7 с целью использования этих данных для построения полной картины о механизме действия данного белка, что в дальнейшем станет основой для поиска веществ-ингибиторов активности MRP7.

Для изучения биохимической активности белка была использована мембранная фракция клеток насекомых *HiFive* с повышенной экспрессией MRP7, полученной при трансфекции с MRP7-бацилловирусом. С помощью АТФазного анализа нами было показано, что эстрадиол, глюкуронид и лейкотриен С₄, являющиеся субстратами для MRP1, оказывают стимулирующий эффект на MRP7 активность, увеличивая ее на 35% и 45%, соответственно. Также тамоксифен, использующийся в лечении рака молочной железы, мастопатии, рака почки и меланомы, стимулирует активность MRP7 на 37%. Однако глутатион, субстрат MRP1, ингибирует активность MRP7 при концентрации 7μМ. Ранее, было установлено, что MRP7 *in vitro* придает устойчивость клеткам к некоторым противоопухолевым веществам и нуклеотидным аналогам. В данной работе мы показали, что MRP7-АТФазная активность возрастает на 24% для доцетаксела, на 31% для цитозин арабинозида, на 15% для паклитаксела и на 24% для эпотилона В, но для цисплатины активность уменьшается. С целью определения влияния комбинации субстрат-противоопухолевое вещество на активность MRP7 был поставлен опыт, в котором обнаружено, что лейкотриен стимулирующая MRP7-АТФазная активность синергически возрастает при добавлении эпотилона В, однако цисплатина и цитозин арабинозид снижают АТФазную активность при тех же условиях.

Таким образом, данный тест может быть использован в качестве быстрого скрининга модуляторов АТФазной активности белка для поиска ингибиторов транспортеров MRP семейства.

Влияние мелатонина на антиоксидантный статус крыс, перенесших пренатальную гипергомоцистеинемию

Морозова Антонина Юрьевна

НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН, Санкт-Петербург, Россия.

amor2703@yandex.ru

Исследования последних лет показали, что гипергомоцистеинемия приводит к нарушению свободно-радикальных процессов, что сопровождается окислительным стрессом. Обнаружено, что мелатонин является антиоксидантом и способен связывать свободные радикалы, включая образующиеся при перекисном окислении липидов гидроксильные радикалы. Целью нашего исследования было оценить влияние мелатонина на антиоксидантный статус в мозжечке крыс, родившихся в условиях пренатальной гипергомоцистеинемии. В ходе исследования была использована модель пренатальной гипергомоцистеинемии на крысах, беременность которых протекала в условиях пищевой нагрузки метионином. Затем самкам, родившимся от данных животных, в возрасте 1,5- 2,5 мес. вводили мелатонин (1 мг/кг массы) внутрибрюшинно в течение 4 дней, после чего животных декапитировали, извлекали мозг и выделяли на льду мозжечок головного мозга. Активность системы антиоксидантной защиты оценивали, определяя уровень общей антиоксидантной активности (АОА) и активность антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы (ГП). Для определения АОА (в усл. ед.) использовали хемилюминесцентную реакцию рибофлавина с перекисью водорода в присутствии двухвалентного железа, измеряя светосумму в течение 2 мин при 37°C. Активность ГП определяли по методу Моина В.М. (1986). В результате исследования показано, что величина общей АОА достоверно снижается у группы животных, подвергнутых пренатальной гипергомоцистеинемии по сравнению с контрольной группой ($0,227 \pm 0,016$ усл. ед.; $0,299 \pm 0,027$ усл. ед.), что может указывать на развитие окислительного стресса. После введения мелатонина АОА увеличивается в 1,2 раза. Аналогичные изменения наблюдались в изменении активности ГП. У крыс, перенесших пренатальную гипергомоцистеинемию, активность ГП в 1,4 раза ниже, чем у контрольной группы. Введение мелатонина способствовало увеличению активности ГП в 1,2 раза по сравнению с активностью ГП крыс, перенесших пренатальную гипергомоцистеинемию.

Таким образом, введение мелатонина способствует нормализации общего оксидантного статуса у потомства крыс, перенесших гипергомоцистеинемию.

Автор выражает благодарность д.б.н., проф. А.В. Арутюняну и д.б.н. В.М. Прокопенко за помощь в проделанной работе и подготовке тезисов.

Получение мутантных форм рекомбинантных scFv-фрагментов антител hcTnIMabs, специфичных к тропонину I сердца человека, и исследование их иммунохимических свойств

Румянцев Константин Алексеевич (Сусоров Денис Сергеевич)

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, биологический факультет,

кафедра биохимии, Москва, Россия.

konstalrum@gmail.com

Сердечная изоформа тропонина I (сTnI) используется в клинической практике как высокоспецифичный маркер сердечно-сосудистых заболеваний. Моноклональные антитела hcTnIMabs с высокой аффинностью распознают сTnI в различных диагностических системах. Для повышения чувствительности и специфичности диагностических систем возможно использование рекомбинантных одноцепочечных вариабельных фрагментов антител (scFv). Для модификации аффинности и специфичности последовательности scFv изменяют с использованием генно-инженерных методов. Теоретические исследования, проведенные в

лаборатории иммунохимии с помощью методов компьютерного моделирования, показали, что мутантные формы scFv hcTnIMabs mut1 (Y27D_Y54F) и mut2 (A26T_Q28K_S29V_I30N_Y35H_S55R_I56L_S57R_I160L_W231Y_A233T_Y234D), могут обладать улучшенной аффинностью по сравнению с scFv hcTnIMabs дикого типа (WT).

Чтобы проверить это предположение, в данной работе были получены рекомбинантные scFv моноклональных антител hcTnIMabs WT и двух мутантных форм (mut1 и mut2) в экспрессионной системе *E.coli*, и исследованы некоторые их свойства. Методом поверхностного плазмонного резонанса были измерены константы аффинности (K_{Aff}) scFv WT, mut1 и mut2. Было показано, что наибольшей K_{Aff} обладают scFv hcTnIMabs WT ($K_{Aff}^{WT}=3,7 \cdot 10^6 M^{-1} > K_{Aff}^{mut1}=1,3 \cdot 10^6 M^{-1} > K_{Aff}^{mut2}=0,3 \cdot 10^6 M^{-1}$). Далее, были получены конъюгаты scFv hcTnIMabs с биотином и европием. Методом флуороиммуноанализа с временным разрешением (ФИА) был проведен сравнительный анализ активности scFv hcTnIMabs WT, mut1 и mut2. Подобраны оптимальные концентрации для проведения ФИА с использованием scFv hcTnIMabs. Было показано, что для проведения ФИА предпочтительнее использовать биотинилированные scFv hcTnIMabs. При сравнении свойств мутантных форм scFv hcTnIMabs mut1 и mut2 с ScFv hcTnIMabs WT было показано, что scFv hcTnIMabs WT обладают самой высокой K_{Aff} и наилучшей чувствительностью определения антигена.

Таким образом, проведенные нами исследования позволяют сделать вывод, что в использованных нами вариантах иммунохимического анализа мутантные формы рекомбинантных scFv hcTnIMabs mut1 и mut2 не обладают улучшенными иммунохимическими свойствами по сравнению с scFv hcTnIMabs «дикого» типа, и этот вопрос требует дальнейших исследований с использованием других иммунохимических подходов.

Использование флавин-связывающего белка miniSOG в качестве генетически кодируемого фотосенсибилизатора на модели культур клеток млекопитающих

Рюмина Алина Павловна¹ (Серебровская Екатерина Олеговна²)

¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биохимии, ²Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А.

Овчинникова РАН, лаборатория биофотоники, Москва, Россия.

ryumina-07@mail.ru, katyaakts@gmail.com

Онкологические заболевания чрезвычайно разнообразны и затрагивают глубинные механизмы жизнедеятельности клетки. Поиск эффективных и щадящих методов лечения ведется по разным направлениям. Одним из них является фотодинамическая терапия (ФДТ) - новый многообещающий способ лечения рака, который использует комбинацию химических фотосенсибилизаторов и видимого света и вызывает клеточную смерть в опухолевых клетках. В связи с этим в работе изучается фототоксичность генетически кодируемого фотосенсибилизатора miniSOG (Singlet Oxygen Generator), флавопротеина, полученного генно-инженерными методами из LOV-домена (light, oxygen, and voltage) рецептора синего света фототропина II *Arabidopsis thaliana*. При возбуждении синим светом (448 нм) miniSOG генерирует синглетный кислород, что и определяет его фототоксичность для эукариотических клеток. Один из аспектов ФДТ, а именно, влияние субклеточной локализации фотосенсибилизатора на эффективность и механизм клеточной гибели, трудно поддается изучению, поскольку большинство фотосенсибилизаторов преимущественно накапливаются сразу в нескольких клеточных компартментах. MiniSOG удобен для решения такой задачи, поскольку в составе гибридных белков обеспечивает высокую эффективность нацеливания в определенные клеточные компартменты. Для определения наибольшего фототоксического эффекта фотосенсибилизатора методом лентивирусной трансдукции были получены клетки линии HeLa Kyoto, стабильно экспрессирующие miniSOG в ядерной, митохондриальной и мембранной локализациях. Фототоксичность определялась методами проточной цитофлуориметрии, МТТ-теста, широкопольной флуоресцентной микроскопии. К настоящему времени получены данные, позволяющие утверждать, что наибольший фототоксический эффект вызывает miniSOG в мембранной локализации (по данным проточной цитофлуориметрии после однократного облучения в течение 1,5 часов при интенсивности

облучения 55 мВт/см² гибель клеток составляет более 90%). С помощью флуоресцентно меченого белка XRCC1 (X-Ray Cross-Complementing factor 1) была показана активация репарации ДНК в клетках, содержащих miniSOG в ядерной локализации, после кратковременного облучения. Данный факт связан с тем, что синглетный кислород, генерируемый фотосенсибилизатором, вызывает повреждения ДНК. Также была исследована зависимость степени падения и скорости восстановления флуоресценции белка miniSOG от концентрации рибофлавина в среде для культивирования.

Таким образом, было показано, что miniSOG способен длительное время стабильно экспрессироваться в эукариотических клетках. При облучении он индуцирует повреждения ДНК и эффективно снижает жизнеспособность клеток в культуре.

Опыт применения в Армении современных технологий определения HER-2/neu при раке молочной железы

Тадевосян Карине Манвеловна

*Российско-Армянский (славянский) Университет, медико-биологический факультет, Ереван, Республика Армения.
tadevosyankar@mail.ru*

Рак молочной железы (РМЖ) занимает ведущее место в структуре онкологической заболеваемости и смертности женского населения как в развитых, так и в развивающихся странах. В последнее время во всем мире наблюдается неуклонный рост заболеваемости РМЖ, что связано не только с реальным увеличением числа заболевших, но и с совершенствованием методов ранней диагностики РМЖ, а также с повышением информированности населения о данном заболевании.

Целью исследования являлось определение рецепторов к HER-2/neu, что играет решающую роль в выборе терапии новейшими противоопухолевыми препаратами. Одним из таких является Герцептин (трастузумаб). Он открыл новый раздел в современном лечении злокачественных опухолей – таргетную терапию (таргет - мишень), которая позволяет прицельно уничтожать только опухолевые клетки.

В течение 2011 г в Центре Медицинской генетики и первичной охраны здоровья 400 женщинам с диагнозом РМЖ были определены рецепторы к HER2/neu иммуногистохимическим методом (ИГХ). В качестве материала исследования использовались срезы (препараты), приготовленные из опухолевой ткани молочной железы, удаленной хирургическим путем или полученной в результате прицельной игольчатой биопсии.

Наше исследование выявило 332 (83%) HER-2/neu-негативных, 68 (17%) HER-2/neu-позитивных случаев и 24 (6%) HER-2/neu 2+, что говорит о необходимости проведения уточняющего генетического исследования. Из 24 женщин к нам обратились только 12. Им было проведено молекулярно-генетическое исследование методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), что показало: 3 (25%) из них являлись HER-2/neu-позитивными и 9 (75%) HER-2/neu-негативными.

Данное молекулярно-генетическое исследование проводилось в Армении впервые. Оно показало, что в результате ИГХ-окрашивания HER-2/neu 2+ положительный HER2/neu статус был подтвержден всего в 25% случаев. Таким образом, лечение 75% таких больных Герцептином было бы неэффективным, а это имеет большое значение в правильной организации лечения больных, имея в виду высокую стоимость указанного препарата.

Response of piscine metallothioneins on the effect of metal-contained nanomaterials

Falfushynskaia Halina Ivanovna, Turta Olga Alexandrovna, Grytsai Irina Ivanovna

Ternopil National Pedagogical University, Ternopil, Ukraine.

halynka.f@gmail.com, www.biochemlab.tnpu.edu.ua

Although nanomaterials (NMs) offer potentially invaluable societal benefits such as drug targeting and *in vivo* biomedical imaging, they may also pose bio-risks. Since metallothioneins (MTs), cysteine-rich intracellular proteins, are potential molecular target for metal-containing NM and

oxyradical scavengers, the key goal of this study was to elucidate the effect of Co- and Zn-NMs on the functions of piscine MTs.

Fish *Carassius auratus gibelio* was loaded by waterborne Co^{2+} (50 $\mu\text{g/L}$), Zn^{2+} (100 $\mu\text{g/L}$), correspondent concentrations of Co-NM and Zn-NM or polymeric substance (derivative on N-vinylpyrrolidone) during 14 days. MTs were identified by size-exclusive (Sephadex-50) and ion-exchange (DEAE-cellulose) chromatography and from electrophoresis. Concentrations of MT-related metals (MT-Me), thiols (MT-SH) and constitutive piscine MT form (immunoassay ELISA) were determined. Oxidative stress response (from redox index of glutathione and oxyradical formation), DNA strand breaks, apoptotic (caspase-3) activity and lysosome membrane stability were analyzed to assess the severity of lesions in loaded fish.

The decrease of the concentration of MT immunoreactive form jointly with increase of MT-Me was shown in all treated groups demonstrating stress-related activation of inducible MT form. Multifactorial analysis approved the similarity of effects for each metal and correspondent Me-NM. Co and Co-NM provoked the elevation of MT-SH and MT-Co concentrations and activated caspase-3 in the liver. Severity of Co and Co-NM toxicity was shown. On the other hand, Zn and Zn-NM decreased MT-SH and caspase-3 activity. The stress-related function of MTs was best revealed under the effect of Zn-NM. So, despite the general manifestation of induction of MTs, the imbalance of MTs functions can realize the selective stress-related response in fish from two areas.

This work has been granted by the National Academy of Science of Ukraine (Project #34-11) and, partially, by West-Ukrainian BioMedical Research Center.

Физико-химические и кинетические свойства адсорбированной на клеточной стенке β -глюкозидазы растений гороха

Фатуллаева Айнур Садулла кызы

Воронежский Государственный Педагогический Университет, Воронеж, Россия.

Aynur_Fatullaeva@mail.ru

β -Глюкозидазы (КФ 3.2.1.21), катализируют гидролиз β -гликозидной связи в β -D-арил- и олигоглюкопиранозидах растительных клеток, в связи с чем они вовлекаются в модификацию матрикса их клеточных стенок, а также в метаболизм вторичных соединений. В проростках гороха наряду с цитоплазматической были обнаружены связанные с клеточной стенкой адсорбированная и ионосвязанная молекулярные формы β -глюкозидазы, которые отличались по pH- и температурному оптимуму от его цитоплазматической формы. В работе исследовали термостабильность, субстратную специфичность и кинетические параметры (pK_1 и pK_2 , ΔH) адсорбированной на клеточной стенке β -глюкозидазы. Фермент выделяли из фракций клеточных стенок 10-дневных проростков гороха (Рамонский 77), очищали путем высаливания сульфатом аммония и гель-хроматографии на G-25. Был получен высокоочищенный ферментативный препарат адсорбированной β -глюкозидазы с удельной активностью 303,1 Е/мг. При анализе зависимости активности фермента от величины pH среды мы определили значения pK ионогенных групп белка, участвующих в акте катализа. Они составили 4,4 (pK_1) и 5,7 (pK_2). Рассчитанные по уравнению Вант-Гоффа величины ΔH реакции оказались равными 5,6 кДж·моль⁻¹ и 39,5 кДж·моль⁻¹, что подтверждает присутствие в активном центре фермента карбоксильной группы глутаминовой или аспарагиновой кислот, а также имидазольной группы гистидина. При определении термостабильности было показано, что максимальную активность фермент проявлял при +37°C. Повышение температуры до +60°C снижало его активность через 3 часа на 40%, что свидетельствует о не слишком высокой термостабильности фермента. При использовании различных дисахаридов и арилглюкопиранозидов в среде инкубации фермента было отмечено, что β -глюкозидаза проявляла наибольшее сродство к целлобиозе (K_m 0,98 мМ), изосукцинимид β -D-гликозиду (K_m 0,32 мМ), p-НФГ (K_m 0,82 мМ), но с меньшей скоростью расщепляла салицин (K_m 4,17 мМ), гентиобиозу (K_m 3,14 мМ) и УДФ-глюкозу (K_m 2,39 мМ). Кинетика реакций в присутствии всех анализируемых субстратов подчинялась уравнению Михаэлиса-Ментен. Полученные результаты расширяют наши представления о механизме катализа и свойствах адсорбированной на клеточной стенке β -глюкозидазы растений гороха.

Клонирование и экспрессия гена *bft-2 Bacteroides fragilis* в *Escherichia coli*

Харлампиева Дарья Дмитриевна (Манувера Валентин Александрович, Подгорный Олег Владимирович)

ФГБУН НИИ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия.

harlampieva_d@mail.ru

Персистенция энтеропатогенных штаммов *Bacteroides fragilis* в кишечнике человека ассоциирована с возникновением колитов и развитием колоректального рака. Фактором вирулентности этих штаммов является секретируемая во внешнюю среду металлопротеаза (BFT, или фрагилизин). В природных условиях фрагилизин синтезируется в виде препробелка, затем от него отщепляется лидерный пептид и продомен. Зрелый белок, представленный каталитическим доменом, *Bacteroides fragilis* секретирует во внешнюю среду. В литературе имеются данные о выделении, очистке и характеристике BFT-1 и BFT-3, в то время как подобные сведения о BFT-2 отсутствуют. Цель данной работы – получение каталитически активного BFT-2 при экспрессии кодирующего его гена в *E.coli*. Последовательности, кодирующие профрагилизин и каталитический домен фрагилизина, были клонированы в составе векторов для регулируемой экспрессии в *E.coli*. Выделены и очищены рекомбинантные каталитический домен фрагилизина-2 и профрагилизин-2. Разработана схема получения активного фрагилизина-2 путем ограниченного трипсинолиза пробелка. При помощи секвенирования по Эдману показано, что N-концевая последовательность белка, составляющего мажорную фракцию после проведения ограниченного трипсинолиза профрагилизина, соответствует N-концевой последовательности природного аналога (AVPSEP). Выявлено, что протеолитической активностью в отношении желатина обладает только фрагилизин-2, полученный из пробелка. Также продемонстрировано нарушение клеточных контактов в культуре клеток HT-29 при воздействии на них фрагилизина-2, полученного из пробелка, в то время как при обработке HT-29 рекомбинантным каталитическим доменом такой эффект не наблюдался. Таким же эффектом обладает вырабатываемый *Bacteroides fragilis* фрагилизин, расщепляя E-кадгерин и нарушая контакты между колоноцитами. При инкубировании HT-29 с пробелком нарушение клеточных контактов происходило на более поздних сроках, чем в случае с активной формой, полученной протеолизом пробелка. Таким образом, разработан способ получения активного фрагилизина-2 в *E.coli*. Предполагается, что продомен играет роль в процессах фолдинга фрагилизина-2, а также в регуляции его активности.

Высокоэффективная ренатурация гидрофобного белка с большим количеством дисульфидных связей за счет иммобилизации на металло-аффинной смоле

Шарапова Ольга Андреевна (Юркова Мария Сергеевна, Северин Сергей Евгеньевич, Северин Евгений Сергеевич, Федоров Алексей Николаевич)

Курчатовский Центр конвергентных нано-, био-, инфо-, когнитивных наук и технологий,
Москва, Россия.

sharapova_o@hotmail.com

Эффективная ренатурация рекомбинантных белков, продуцируемых в клетках *Escherichia coli* (*E. coli*) в виде телец включения (т.е. в агрегированной форме), до сих пор является сложной экспериментальной проблемой. Это особенно верно в отношении больших гидрофобных белков с большим количеством дисульфидных связей. При этом бактериальная система экспрессии на сегодняшний день является одной из самых широко используемых в лабораторной практике. В целом отсутствие универсальных эффективных подходов к ренатурации рекомбинантных белков во многом ограничивает спектр белков, используемых в прикладных и фундаментальных исследованиях. Целью данной работы была разработка высокоэффективной и простой методики ренатурации гидрофобного белка с большим количеством дисульфидных связей. В качестве модельного белка был использован рекомбинантный C-концевой фрагмент альфа-фетопротейна человека (rAFP3D), который имеет молекулярную массу 26 кДа, содержит 6 дисульфидных связей, достаточно гидрофобен и экспрессировался в виде телец включения в клетках *E. coli*. Была разработана методика

ренатурации данного белка, иммобилизованного на металло-аффинной Ni смоле за счет последовательности из 7 остатков гистидина на С-конце белка. При попытке ренатурировать rAFP3D, иммобилизованный на металло-аффинной агарозной матрице, весь белок необратимо связывался с ней и не элюировался даже в денатурирующих условиях. В качестве альтернативы была использована смола на основе более инертного материала - силикагеля. При этом выход ренатурированного белка увеличился до ~100% с чистотой не менее 98%. Такая эффективность впервые продемонстрирована для белка с указанными характеристиками, т.е. сложного для ренатурации. При сравнении разработанной методики с ренатурацией того же белка с помощью стандартно используемой методики разбавления, продуктивность (отражает затраченные материалы и время) первой была на два порядка выше. При этом не требовалось проводить каких-либо дальнейших процедур очистки белка. Использование смолы на основе силикагеля для ренатурации иммобилизованных белков может значительно улучшить и упростить проведение процедур ренатурации гидрофобных белков с большим количеством дисульфидных связей.

Взаимодействие маннозо-связывающего лектина с миелопероксидазой человека

Шехова Елена Александровна (Филимонов Владимир Борисович)

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.

kulikovochka88@mail.ru

Миелопероксидаза (МПО) является гликопротеином и содержит олигосахаридные компоненты, оканчивающиеся остатками маннозы, что нехарактерно для большинства гликопротеинов млекопитающих. Структура маннозо-связывающего лектина (МСЛ) включает коллагено-подобный домен, а из литературы известно, что МПО образует комплекс с коллагеновыми фибриллами и с C1q компонентом комплемента, который также содержит коллагено-подобный домен. Таким образом, потенциально возможно взаимодействие МПО и МСЛ как углевод-лектиновой, так и белок-белковой природы. Такой комплекс может играть важную роль в реакциях врожденного иммунитета, совмещая рецепторные и эффекторные функции в физически единой структуре. Хроматографическими методами препарат МСЛ был получен в функционально активном состоянии. При помощи градиентного электрофореза без детергентов при нейтральном значении pH показано, что МСЛ и МПО образуют комплекс, независимо от наличия в среде ионов кальция. Присутствие в среде маннанов приводит к изменению электрофоретической подвижности комплексов МПО с различными белками (МСЛ и ЦП). Пероксидазную активность миелопероксидазы изучали методом Клебанова. Как оказалось, при инкубации МПО с МСЛ в присутствии ЭДТА происходит увеличение пероксидазной активности МПО при различных значениях pH (pH 7,4; pH 5), кроме того МСЛ частично отменяет ингибирующее действие ЦП на пероксидазную активность МПО. Результаты данной работы подтвердили наше предположение о формировании комплекса между МСЛ и МПО *in vitro* в условиях, характеризующихся физиологическими значениями pH и ионной силы. Вместе с тем, было показано, что образование комплекса не зависит от наличия в среде ионов кальция. Это означает, что взаимодействие углевод-связывающих доменов МСЛ с олигосахаридными компонентами МПО не является необходимым для формирования комплекса между данными белками. Наши результаты также свидетельствуют о возможности взаимодействия МПО с коллагено-подобным доменом МСЛ, которое индуцирует конформационные изменения в молекуле фермента, приводящие к увеличению его ферментативной активности, однако дополнительные взаимодействия МПО и МСЛ через олигосахаридные цепочки и углевод-распознающие домены могут блокировать такие трансформации.