

ПОДСЕКЦИЯ «БИОХИМИЯ»

Устные доклады

Биологическая активность хлоротоксин-подобных пептидов из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus*

^{1,2} *Арзамасов Александр Алексеевич*, ² *Сачкова М.Ю.*, ² *Ковальчук С.И.*, ² *Игнатова А.А.*,
² *Василевский А.А.*

¹ МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12; ² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, modeus-x@hotmail.com

Глиомы являются наиболее распространенным типом злокачественных опухолей, развивающихся в центральной нервной системе. Помимо чрезвычайно высокой смертоносности, они характеризуются высокой устойчивостью к радио- и химиотерапии. В связи с этим особый интерес вызывает поиск агентов, селективно связывающихся с клетками глиом. Одним из таких агентов является пептид из яда скорпиона *Leiurus quinquestriatus* – хлоротоксин (СТХ). Он обладает мощным паралитическим эффектом на насекомых, но не вызывает такового у млекопитающих.

В рамках данной работы был осуществлен поиск гомологов СТХ в яде скорпиона *Mesobuthus eupeus*, а также в библиотеке кДНК из его ядовитых желез. С помощью комбинации методов гель-фильтрации и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) из яда были выделены пептиды I4, I5A, MeuCITx и MeuCITx-1. I5A и MeuCITx-1 (35-36 остатков, 4 дисульфидные связи) были получены путем твердофазного химического синтеза с последующими окислением тиольных групп и очисткой с помощью ОФ-ВЭЖХ. Соответствие структуры химически синтезированных пептидов нативной доказывали комбинацией нескольких методов: алкилирования сульфгидрильных групп, масс-спектрометрии, ОФ-ВЭЖХ, тестирования инсектицидной активности. Было показано, что I5A и MeuCITx-1 вызывают паралич у насекомых аналогично СТХ. Данные токсины не оказывают цитотоксического и цитостатического действия на различные культуры клеток млекопитающих. Для выявления возможного противоопухолевого эффекта было проведено исследование ингибирующей активности I5A и MeuCITx-1 на подвижность различных линий клеток глиомы.

Результаты данной работы в дальнейшем могут быть использованы для создания новых противоопухолевых препаратов.

Работа поддержана РФФИ (грант № 12-04-01813), стипендией Президента РФ и программой МКБ Президиума РАН.

Получение полноразмерного рекомбинантного антитела в культуре клеток млекопитающих и исследование его иммунохимических и биохимических свойств

Бекетова Елена Владимировна

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия, elena-v-beketova@yandex.ru

Моноклональные антитела широко используются в научно-исследовательских, диагностических и терапевтических целях. Использование подходов генной инженерии позволяет получать рекомбинантные антитела и вносить различные изменения в их первичную белковую последовательность. В связи с наличием сложных посттрансляционных модификаций получение полноразмерных антител возможно только в эукариотических клеточных культурах.

Одним из подходов для экспрессии рекомбинантных белков является стабильная трансфекция, в ходе которой происходит интеграция рекДНК в геном клеток-продуцентов. Как правило, при стабильной трансфекции популяцию продуцентов далее клонируют для получения стабильной клеточной линии. Целью нашей работы было получение полноразмерного рекомбинантного химерного антитела гесTnI11, обладающего специфичностью к сердечной изоформе тропонина I, а также изучение некоторых его свойств.

Ранее нами была создана молекулярно-генетическая конструкция для экспрессии гесTnI11, содержащая кДНК тяжелой и легкой цепи антитела, селективных маркеров дигидрофолатредуктазы и EGFP. После трансфекции клеток линии CHO-DG44 была проведена селекция клеток, содержащих рекДНК. В ходе нашей работы полученный стабильный пул был сортирован по интенсивности флуоресценции EGFP с помощью клеточного сортера FACSAria III. Затем выбрали условия для клонирования пула методом лимитирующего разведения. Полученные клоны характеризовали с точки зрения продукции гесTnI11. Очистку антитела из кондиционированной среды проводили методом аффинной хроматографии на белок G-сефарозе. Содержание гесTnI11 определяли методом прямого иммуоферментного анализа (ИФА). Методами ИФА и электрофореза по Лэммли сравнивали свойства гесTnI11 и TnI11, полученного из В-клеточной гибридомы.

Было показано, что содержание гесTnI11 в среде сортированного по EGFP пула в 50 раз превышает несортированный пул, таким образом, экспрессия антитела пропорциональна экспрессии флуоресцентного маркера. В результате проточной сортировки при клонировании возрастало как общее число клонов-продуцентов, так и доля продуцентов с высоким уровнем экспрессии. Наибольшей эффективности клонирования удалось достигнуть при использовании среды ExCell-CHO Cloning medium с добавлением 10% кондиционированной среды. Наилучшими средами для экспрессии гесTnI11 одним из полученных клонов были CHO-S-SFMII, CD CHO и PowerCHO-2. Методом аффинной хроматографии получили высокоочищенный препарат гесTnI11, экспрессированный одним из клонов в ходе стабильной трансфекции. Иммуохимическая активность рекомбинантного и нативного антител оказались сходны.

Митохондриальная Ca^{2+} -индуцированная пора нового типа: механизм образования и возможная роль при патологиях

Белослудцева Наталья Валерьевна, Миронова Галина Дмитриевна

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия,
natago_imagination@rambler.ru.*

Ранее мы обнаружили, что добавление к митохондриям невысоких концентраций длинноцепочечных насыщенных жирных кислот (главным образом, пальмитиновой (ПК)) и Ca^{2+} приводит к открытию во внутренней мембране органелл неспецифической поры нового типа. Установлено, что эта пора не регулируется известными модуляторами «классической» митохондриальной поры (mitochondrial permeability transition pore, РТР), способна самопроизвольно закрываться в течение короткого времени, и, вероятно, имеет липидную природу.

В настоящей работе исследована возможность образования пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированной поры (ПСаП) в митохондриях печени крысы в условиях накопления эндогенных свободных жирных кислот вследствие активации Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы A_2 . Индукция неспецифической проницаемости внутренней митохондриальной мембраны

осуществлялась путем нагрузки митохондрий ионами Sr^{2+} , которые способны вызывать открытие ПСаП, но не РТР поры. Показано, что после аккумуляции митохондриями ионов Sr^{2+} (1.2-1.4 мМ) наблюдаются процессы массивного выброса ионов Sr^{2+} и K^+ из органелл, падение мембранного потенциала и высокоамплитудное митохондриальное набухание, которые не ингибируются известным блокатором РТР поры – циклоспорином А. Методом газовой хроматографии было установлено, что эти изменения сопровождаются увеличением уровня свободных жирных кислот в митохондриях (содержание ПК увеличивалось с 3.19 ± 0.01 до 3.54 ± 0.26 , стеариновой кислоты - с 2.39 ± 0.39 до 3.14 ± 0.47 мкг/мг белка). Ингибиторы Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы А₂ - аристороховая кислота, арахидонил трифторметилкетон и трифторперазин - частично задерживают Sr^{2+} -индуцированный выброс ионов Sr^{2+} и K^+ , а также ингибируют падение мембранного потенциала и набухание митохондрий.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при патологических условиях (нарушения ионного гомеостаза клетки, окислительный стресс и др.) в митохондриях происходит активация фосфолипазы А₂, накопление свободных жирных кислот (в том числе, пальмитиновой), и, как следствие, образование липидной поры, индуцированной жирной кислотой и Ca^{2+} . Это, в свою очередь, может приводить к высокоамплитудному набуханию органелл и выбросу проапоптотических белков, что служит индикатором участия описанного каскада событий в механизме апоптотической гибели клеток.

Работа поддержана стипендией Президента РФ (СП-2697.2013.4) и грантом РФФИ №12-04-00430-а.

Получение рекомбинантного иммунотоксина на основе каталитического и транслокационного доменов дифтерийного токсина, слитных с иммунодоминантной последовательностью миелин олигодендроцитарного гликопротеида

^{1,2}*Белый Александр Юрьевич, ²Степанов Алексей Вячеславович, ²Белозуров Алексей Анатольевич*

¹*МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия; ²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия, xbelyi@yandex.ru*

Рассеянный склероз (РС) – это хроническое нейродегенеративное заболевание аутоиммунной природы, характеризующееся разрушением миелиновой оболочки нервных волокон головного и спинного мозга, что ведёт к постепенной утрате функций центральной нервной системы. РС представляет собой острую медико-социальную проблему, поскольку, как правило, поражает лиц молодого и среднего возраста. Проблема лечения РС остается далекой от разрешения, на сегодняшний день существуют лекарственные препараты, способные лишь замедлить течение заболевания. В основном терапию РС проводят иммуносупрессорными препаратами, которые обладают рядом недостатков, связанных с неспецифическим действием на всю иммунную систему. В данной работе был разработан подход для более специфичной и эффективной элиминации аутореактивных В-клеток. Разрабатываемый препарат состоит из двух функциональных частей – участка миелин олигодендроцитарного гликопротеина (МОГ) (обеспечивает адресную доставку к клеткам-мишеням) и экзотоксина *Corynebacterium diphtheriae* (вызывает гибель клеток).

В процессе работы были получены конструкции, состоящие из каталитического и транслокационного домена дифтерийного токсина, связанного с участком МОГ (иммунодоминантным фрагментом) через глицин-сериновый линкер. Для продукции белка в *E.coli* данные конструкции были клонированы в экспрессионные векторы рЕТ-28 (Novagen) и рMAL-c5X (NEB).

Уровень продукции белка составил 0,2 мг/л и 30 мг/л, соответственно. Для подтверждения наличия на С-конце рекомбинантной молекулы МОГ-пептида, был проведён вестерн-блот анализ гибридизации образцов с анти-МОГ антителами. После дополнительных стадий очистки с помощью ионообменной и гель-фильтрационной хроматографии, для анализа уровня активности дифтерийного токсина, была проведена транскрипция/трансляция *in vitro*. При концентрации токсина в 200 нМ, наблюдалось ингибирование трансляции на уровне более 95% по сравнению с контролем.

Созданный препарат иммунотоксина имеет высокую активность *in vitro*, а также содержит эпитоп специфического связывания с патологическими лимфоцитами, ответственными за развитие РС. Логическим продолжением данной работы будет проверка эффективности действия иммунотоксина *in vivo* на мышах с развитым экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом.

Авторы выражают глубокую благодарность заведующему лаборатории биокатализа ИБХ РАН профессору, чл.-корр. РАН А.Г. Габирову, под руководством которого была выполнена работа. Работа была поддержана грантом РФФИ 12-04-01609-а «Разработка подходов к терапии РС путем селективной элиминации аутореактивных В-клеток».

Исследование некоторых иммунохимических свойств рекомбинантного С-реактивного белка собаки (canCRP) и получение моноклональных антител к нему

Богомолва Агнесса Петровна, Стафеев Юрий Сергеевич

МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, agnessochka@yandex.ru

С-реактивный белок (CRP) относится к белкам острой фазы воспаления (APP – acute phase proteins). Подобно другим белкам этой группы CRP является частью системы врожденного иммунитета: он активирует систему комплемента и удаляет чужеродные микроорганизмы путем их опсонизации. Концентрация CRP зависит от степени воспалительного процесса у млекопитающих, поэтому в клинической практике CRP используют как маркер инфекционных и воспалительных заболеваний человека и животных. Целью нашей работы было исследование иммунохимических свойств рекомбинантного CRP собаки (canCRP), полученного в бакуловирусной экспрессионной системе, и сравнение их с нативным белком, выделенным из асцитной жидкости собак. Отдельной задачей являлось получение моноклональных антител к canCRP для дальнейших разработок диагностических тест-систем на их основе.

Рекомбинантный canCRP был получен в бакуловирусной экспрессионной системе. Качественную оценку наличия canCRP в ростовой среде проводили методом электрофореза по Лэммли, а также методом Вестерн-блоттинга. Концентрацию canCRP определяли методом иммуноферментного анализа «сэндвич»-типа (ИФА). Очистку рекомбинантного canCRP проводили методом аффинной хроматографии и гель-фильтрации. Моноклональные антитела к canCRP получали методом гибридизации спленоцитов иммунизированных мышей с клетками миеломы линии Sp2/0.

Методами Вестерн-блоттинга и ИФА было показано наличие canCRP в культуральной среде после заражения клеток линии Sf9 вирусом, несущим ген canCRP. Электрофоретическая подвижность рекомбинантного canCRP совпала с таковой у нативного белка, выделенного из асцитной жидкости собак: после проведения электрофореза по Лэммли белок был представлен в виде двух полос с молекулярной массой примерно 25 и 23 кДа. Методом Вестерн-блоттинга было показано, что поликлональные антитела, специфичные к canCRP, узнают рекомбинантный белок так же, как и нативный.

Для получения гибридом, продуцирующих специфичные к *capCRP* моноклональные антитела, мышей иммунизировали очищенным препаратом *capCRP*, выделенным из асцитной жидкости собаки, после чего проводили гибридизацию спленоцитов мыши и клеток миеломы линии *sp2/0*. Методом непрямого ИФА определяли наличие в культуральной среде мышинных антител, специфичных к *capCRP*. Проводили реклонирование гибридом, продуцирующих *capCRP*-специфичные антитела, с целью получения клеток-продуцентов моноклональных антител.

Участие мТОР комплекса в импорте рибосомальных белков в ядро клеток млекопитающих

Жылкибаев Асылбек Айтанулы

*Евразийский национальный университет им Л.Н. Гумилева, Астана, Казахстан,
askokshe@mail.ru*

Ядерный перенос макромолекул через оболочку ядра является очень сложным процессом. Рибосомальные белки, транскрипционные факторы и множество других функциональных белков различной молекулярной массы активно переносятся из ядра в цитоплазму и обратно. Многие белки, участвующие в функции ядра, синтезируются в цитоплазме и переносятся в ядро через импорт ядерных белков. Некоторые из этих белков транспортируются обратно в цитоплазму с помощью механизма экспорта ядерных белков. Разделение функции ядра и цитоплазмы, где активатор отделен от цели активации, является важнейшим способом регуляции внутриклеточных процессов роста и развития клетки.

Транспорт осуществляется через ядерные поры, которые служат туннелем между цитоплазмой и ядром. Поток макромолекул контролируется комплексом ядерных пор, пронизывающих ядерную оболочку клетки. В транспорте участвуют функционально значимые белки транспортины (импортины и экспортины). Импортины/кариоферины участвуют в импорте, экспортины участвуют экспорте веществ. Ядерно–цитоплазматическое передвижение рибосомальных белков необходимо для подготовки и сборки малой и большой субчастицы рибосом. Известно, что мТОР (*mTOR-mammalian target of rapamycine*) – серин/треониновая протеинкиназа, которая регулирует анаболические процессы, рост клеток и биогенез рибосом. Биогенез рибосом – это процесс управляемый импортом рибосомальных белков в ядро для сборки рибосом, также экспортом рибосомных субчастиц в цитоплазму. Целью данной работы было установить роль мТОР комплекса в импорте рибосомальных белков в ядро клеток млекопитающих.

Методами иммунопреципитации и иммуноблоттинга нами было установлено влияние киназной активности мТОР комплекса на импортины- $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 7$. При иммунопреципитации импортинов и ингибировании киназной активности мТОР комплекса с помощью препаратов *pp242* и *Торина-1* транспорт рибосомальных белков *rpS3*, *rpL7*, *rpL26* резко снижался по сравнению с контролем. Также при изучении интервала времени ингибирования в разное время, начиная от 15 мин до 6 часов, оптимальным оказалась 1 часовая обработка препаратом. Это обусловлено высокой динамикой процесса. Данными параметрами выявлялось ингибирование транспорта рибосомальных белков.

Таким образом, мы определили, что импорт и аккумуляция в ядре рибосомальных белков *rpS3*, *rpL7*, *rpL26* зависит от мТОР комплекса. Протеинкиназная активность мТОР комплекса опосредована импортиновыми белками и регулирует транспорт исследованных рибосомальных белков. Эти данные могут свидетельствовать о мТОР-зависимом передвижении рибосомальных белков в ядро, что может играть немаловажную роль в регуляции биогенеза рибосом.

Научные руководители – Академик НАН РК Р.И. Берсимбаев, доктор Д. Сарбасов.

Получение химерного рекомбинантного антитела против интерлейкина 17 человека

Ильина Екатерина Николаевна

МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия,

Ekaterina.iljina.7@yandex.ru

Интерлейкин 17 (ИЛ-17), выделяемый субпопуляцией Th17 лимфоцитов, является одним из важнейших цитокинов и необходим для защиты от бактериальных и грибковых инфекций. Было установлено, что субпопуляция лимфоцитов Th17 и продуцируемые ими цитокины обуславливают развитие воспалительного процесса при различных аутоиммунных заболеваниях, таких как ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника, псориаз. Наблюдающаяся в местах воспаления гиперэкспрессия ИЛ-17 сопровождается усилением воспалительного процесса за счет совместного действия ИЛ-17 и других цитокинов. Таким образом, ИЛ-17 является перспективной мишенью для направленной терапии различных аутоиммунных заболеваний человека.

Данная работа направлена на получение химерного рекомбинантного Fab-фрагмента антитела против ИЛ-17. В результате иммунизации мышей линии BALB/c была получена панель из 6 моноклональных антител (мАТ) против рекомбинантного человеческого ИЛ-17А. Был проведен иммунохимический анализ полученных моноклональных антител, включающий в себя определение равновесных констант диссоциации, изотипирование и исследование взаимодействия различных пар мАТ в сэндвич-ИФА.

На основании полученных данных и результатов определения нейтрализующей активности с помощью индукции ИЛ-6 из панели мАТ была отобрана гибридома А2, продуцирующая мАТ, обладающих наибольшей аффинностью. Из клеток гибридомы была выделена тотальная РНК, наработана кДНК, получены фрагменты ДНК и установлены аминокислотные последовательности вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей. Соответствие полученных последовательностей исходному мАТ А2 было подтверждено с помощью анализа фрагментов триптического гидролиза мАТ А2 методом время-пролетной масс-спектрометрии с ионизацией MALDI.

Для последующей химеризации и экспрессии Fab-фрагмента антитела в клетках *E. coli* был сконструирован бицистронный экспрессионный вектор на основе плазмиды рТгс. Полученный экспрессионный вектор был использован для биосинтеза рекомбинантного Fab-фрагмента в клетках *E. coli* BL21(DE3). Очистка рекомбинантного белка проводилась с помощью металлоаффинной хроматографии и последующей гель-фильтрации. После выделения и очистки рекомбинантного Fab-фрагмента антитела была определена его аффинность с помощью метода конкурентного иммуноферментного анализа, которая соответствует значению К_д, полученному для исходного мышинового мАТ.

Репарирование 8-оксогуанина в контексте метилированного CpG динуклеотида 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой человека

Касымов Рустем Достарович

Институт Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН, Новосибирск,

Россия, rusty@211.ru

Метилирование ДНК - основная эпигенетическая модификация в геномах всех известных позвоночных, которая лежит в основе таких важных биологических процессов, как регуляция

экспрессии генов, структуры ДНК и контроль мобильных элементов. Мишенями для эпигенетического метилирования в геноме человека, в результате которого образуется 5-метилцитозин, служат CpG динуклеотиды. Гуанин в этом контексте может быть легко окислен до 8-оксогуанина, главного окислительного повреждения ДНК, которое репарируется специальной системой эксцизионной репарации оснований (ЭРО), центральным элементом которой у эукариот является 8-оксогуанин-ДНК-N-гликозилаза (OGG1). Процессы метилирования и эксцизионной репарации оснований довольно полно описаны в современной литературе в отдельности, однако эффективность репарации окислительных повреждений в условиях метилированной ДНК остается слабо изученной.

Целью данной работы стала характеристика процесса репарации 8-оксогуанина в контексте метилированного CpG динуклеотида проводилась в условиях кинетики одного оборота, кинетики фазы всплеска и реконструирования полного цикла процесса эксцизионной репарации оснований *in vitro*.

В ходе исследования было показано, что метилирование по соседнему относительно 8-оксогуанина цитозину снижает константу скорости стадии выщепления поврежденного основания почти в два раза, тогда как метилирование по комплементарной цепи не оказывает существенного влияния на данную стадию. Метилирование цитозина в комплементарной цепи, наоборот, снижает константу скорости стадии высвобождения в два раза, тогда как метилирование по соседнему от повреждения цитозина не затрагивает данную стадию. Для полиморфного варианта OGG1-S326C константа скорости стадии выщепления поврежденного основания снижена на порядок относительно аналогичного показателя для фермента дикого типа. С другой стороны, константа скорости стадии высвобождения ДНК-продукта сравнима для обеих форм фермента. Следует также отметить увеличение примерно в 2–3 раза значения константы поврежденного основания для OGG1-S326C при переходе к субстратам, метилированным по комплементарной цепи.

Также было установлено, что метилирование значительно снижает стимуляцию OGG1 ферментом APX1, что может сказываться на протекании всего процесса ЭРО.

В ходе реконституции процесса ЭРО выяснилось, что репарация 8-оксогуанина в условиях метилированного субстрата происходит эффективно для всех субстратов, кроме субстрата содержащего 5-метилцитозин в соседнем относительно 8-оксогуанина положении, где поврежденное основание выщепляется не полностью.

Таким образом, метилирование цитозина с 5' стороны относительно 8-оксогуанина может снижать эффективность репарации данного основания, что частично может объяснить почему не только цитозин, но еще и гуанин является точкой мутации в CpG динуклеотидах. Метилирование по цитозину негативно воздействует на возможность APX1 стимулировать OGG1. Более того, экзонуклеазная активность APX1 позволяет удалить 5-метилцитозин с 5' стороны от 8-оксогуанина, что показывает на возможный путь ДНК деметилирования, спаренного с репарацией окислительных повреждений.

Кондиционный генетический нокдаун соматического цитохрома с мыши в костномозговых макрофагах

Кисляков Илья Викторович, Шилов Е.С.

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия,
ilyakislyakov@yandex.ru*

Цитохром С – важнейший компонент митохондриальной дыхательной цепи в эукариотических клетках, который также участвует в утилизации активных форм кислорода (АФК), активирует белок Araf-1 при запуске внутреннего пути апоптоза. Полное удаление гена

соматического цитохрома С летально для самих мышей, однако позволяет получать и исследовать первичные клеточные культуры. В настоящей работе использована первая описанная в литературе модель кондиционного генетического нокдауна соматического цитохрома С.

Мы исследовали *in vitro* последствия кондиционного нокдауна цитохрома С в первичных культурах костномозговых макрофагов, используя ранее предложенную генетическую модель: в состав измененного локуса входит аллель дикого типа и мутантная аллель с предшествующей стоп-кассетой. Используя скрещивания мышей линии-предшественницы с носителями тканеспецифичной Cre-рекомбиназы, вырезающей аллель дикого типа, мы получили культуры макрофагов с глубоким нокдауном (10-кратное снижение экспрессии) цитохрома С. Эффективность модели была подтверждена методом ПЦР в реальном времени, а также внутриклеточным окрашиванием макрофагов на цитохром С. Также в ходе анализа были проведены специфические окрашивания на маркеры дифференцировки макрофагов *in vitro* и внутриклеточный уровень активных форм кислорода, а также определено потребление клетками кислорода.

По результатам работы не было выявлено различий *in vitro* в клеточности, дифференцировке и жизнеспособности культур нормальных и цитохром С – дефицитных макрофагов. Дыхательная активность нормальных и цитохром-дефицитных клеток оказалась сопоставима как в норме, так и на фоне разобщителя окислительного фосфорилирования (СССР). Также макрофаги различных генотипов не имели достоверных различий в уровне внутриклеточных спонтанно образованных активных форм кислорода (АФК) и в фагоцитарном индексе, определенном с использованием меченых клеток *E. coli*.

В заключение необходимо отметить, что, несмотря на снижение уровня экспрессии количества белка на 90%, функции дыхания и утилизации клетками спонтанно генерируемых АФК на уровне отдельных цитохром-дефицитных макрофагов остаются интактными. Полученные данные указывают на избыточность обычного количества цитохрома С в клетках иммунной системы и значительный «запас прочности» их дыхательной цепи.

Изучение междоменных взаимодействий в миозиновой головке при помощи флуоресцентно меченых легких цепей миозина

Логвинова Дарья Сергеевна

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, Российская Федерация;
itshideandseek@gmail.com*

Изолированная миозиновая головка (субфрагмент 1 миозина, S1) состоит из двух главных доменов – моторного и регуляторного. Работа головки в качестве «молекулярного мотора» обеспечивается поворотом регуляторного домена относительно моторного в процессе АТРазной реакции. Согласно предсказаниям, такой поворот может сопровождаться взаимодействием между моторным доменом и «существенной» легкой цепью (ELC), ассоциированной с регуляторным доменом. В пользу такого предположения свидетельствуют данные, недавно полученные методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК): было показано, что образование комплексов S1-ADP-V_i, S1-ADP-AlF₄⁻ и S1-ADP-BeF_x (стабильных аналогов ключевых интермедиатов АТРазной реакции S1 – S1^{**}-ADP-P_i и S1^{*}-АТР) приводит к значительному повышению термостабильности обоих доменов S1. Это, однако, было показано лишь косвенным путем, при сопоставлении данных ДСК с температурными зависимостями флуоресценции остатков триптофана, расположенных в моторном домене S1, но отсутствующих в регуляторном домене. Целью настоящей работы

являлось получение экспериментальных подтверждений взаимодействия ELC в регуляторном домене S1 с моторным доменом. Для этого был получен препарат S1, в котором собственные легкие цепи были замещены на ELC, флуоресцентно меченые (метка 1,5-IAEDANS) по единственному остатку цистеина (Cys180). При измерениях температурных зависимостей флуоресценции метки, присоединенной к ELC в регуляторном домене S1, оказалось, что в отсутствие нуклеотидов изменения ее флуоресцентных параметров почти не отличаются от изменений триптофановой флуоресценции (полупереход при $\sim 48^\circ\text{C}$), отражающих тепловую денатурацию моторного домена S1. Это можно объяснить литературными данными о том, что в этих условиях С-концевая область ELC, где находится флуоресцентная метка, взаимодействует с моторным доменом S1. Напротив, в тройных комплексах S1-ADP- V_i , S1-ADP- AlF_4^- и S1-ADP- BeF_x изменения флуоресцентных параметров метки происходили при более низких температурах, чем изменения триптофановой флуоресценции, но при этом – в том температурном диапазоне (полупереход при $53\text{--}54^\circ\text{C}$), где по данным ДСК денатурирует регуляторный домен S1 (т.е. при температуре на 10°C выше, чем в отсутствие нуклеотидов). Таким образом, использование в экспериментах по тепловой денатурации S1 флуоресцентно меченых ELC представляет собой новый перспективный подход для изучения междоменных взаимодействий, происходящих в S1 в процессе АТФазной реакции.

Работа поддержана грантом РФФИ № 12-04-00411.

Исследование пространственной структуры и мембранной активности токсина Nm-3 из яда паука *Heriades melloteei*

^{1,2}Мышкин Михаил Юрьевич, ²Парамонов А.С., ²Шенкарев З.О., ²Кульбацкий Д.С.,
²Люкманова Е.Н., ^{1,2}Беркут А.А., ²Василевский А.А., ²Арсеньев А.С.

*1*Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Россия; *2*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Природные токсины являются удобным инструментом для исследования механизмов работы мембранных рецепторов и потенциалочувствительных ионных каналов. Токсины также могут выступать в качестве прообразов новых инсектицидов, анальгетиков, а также препаратов, нацеленных на лечение расстройств сердечно-сосудистой и нервной систем организма.

Токсин Nm-3 из яда паука *Heriades melloteei* является блокатором Na^+ каналов семейства Na_v и, вероятно, взаимодействует с рецепторным сайтом 4, расположенным на потенциалочувствительном домене (ПЧД) второй псевдосубъединицы этих каналов. Токсин состоит из 35 аминокислотных остатков, обладает массой 3.5 кДа и суммарным зарядом +4.

В работе методом ЯМР-спектроскопии определена пространственная структура токсина в водном растворе при pH 5.0 и температуре 35°C . Молекула Nm-3 включает в себя β -шпильку, стабилизирована тремя дисульфидными связями в топологии цистинового узла, а также обладает амфифильными свойствами. Гидрофобный кластер на поверхности Nm-3 (остатки Trp11, Phe12, Trp16, Ile27, Tyr25) окружен кольцом положительно заряженных групп (N-конец и остатки Lys24, Lys28, Arg29, Lys32).

ЯМР эксперименты по связыванию токсина с моноламеллярными липидными везикулами выявили его мембранную активность. Было показано, что он взаимодействует с электростатически нейтральными липидами (POPC), а также с отрицательно заряженной смесью липидов (POPC/DOPG) даже в присутствии соли (150 mM NaCl), экранирующей электростатическое взаимодействие. С нейтральными липидами токсин взаимодействовал

заметно слабее. Вероятно, токсин связывается с липидами и со стороны бислоя действует на Na^+ каналы, т.е. использует механизм «мембранного катализа».

В среде на основе цвиттерионных детергентов DPC/LDAO наблюдалось специфическое взаимодействие токсина с рекомбинантным ПЧД 2-й псевдосубъединицы канала $\text{Na}_v1.4$ человека.

Регуляция внутриклеточного метаболизма клеток аденокарциномы молочной железы с помощью нового гетероциклического соединения ТХ-14

НгуенТхиНямТханг

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия,
nhatthang1012@gmail.com*

Известно, что в опухолевых клетках наблюдается метаболический сдвиг от митохондриального окислительного фосфорилирования к гликолизу, даже в присутствии кислорода. Поскольку митохондрии активно вовлечены в метаболические, сигнальные, апоптотические пути, то сочетание митохондриальной супрессии и гликолитического пути метаболизма позволяет опухолевым клеткам подавлять эндогенные механизмы гибели клеток и способствовать их быстрому распространению. В рамках настоящего исследования предложен принципиально новый подход к сдвигу внутриклеточного метаболизма опухолевых клеток в сторону нормальных клеток, впоследствии приводящий к естественной их гибели.

Клетки аденокарциномы молочной железы MCF-7 выращивали в среде α -MEM, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 50 мкг/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамина и 10 мкг/мл (IC₂₅) исследуемого соединения ТХ-14 в условиях 37°C в CO₂-инкубаторе с 5%-ным содержанием CO₂. На седьмые сутки инкубации наблюдали изменение морфологии клеток MCF-7/ТХ-14, которые становились вытянутыми, ровной формы, с четко оформленным ядром. После 21-25 дней инкубации опухолевые клетки MCF-7/ТХ-14 погибали. При этом в ходе инкубации на 3, 7, 10, 15 и 20 сутки инкубации проводили скрининг метаболической активности клеток MCF-7/ТХ-14 относительно контрольных клеток, не подвергавшихся действию исследуемого соединения. С 1-10 суток инкубации с ТХ-14 в клетках MCF-7 достоверно снижается уровень активности лактатдегидрогеназы, содержание лактата и АТФ при неизменяющемся уровне глюкозы и пирувата. Известно, что эффект Варбурга является отличительной чертой опухолевых клеток, а высокие уровни лактата, воздействуя на опухоль-ассоциированные фибробласты, приводят к выработке гиалуронана – благоприятной среды для миграции клеток и появлению метастазов. Результаты исследования показывают ослабление эффекта Варбурга. Кроме того, понижение уровня АТФ при сохранении жизнеспособности опухолевых клеток согласно механизму отрицательной обратной связи может привести к активации цикла Кребса. С целью выяснения влияния ТХ-14 на данный процесс проверяли уровни ацетил-СоА, который начинает возрастать на 7 сутки инкубации, и уровень оксалоацетата, возрастающего на десятые сутки инкубации. На всем периоде инкубации клеток MCF-7 с ТХ-14 наблюдается достоверное снижение уровня активных форм кислорода и одновременное увеличение митохондриального потенциала.

Таким образом, проведенные исследования позволяют предложить способ регуляции метаболизма опухолевых клеток, что представляет значительный интерес для разработок в области химиотерапии злокачественных новообразований.

Влияние точечных мутаций G84R и L99M на структуру и свойства малого белка теплового шока HspB1

Нефёдова Виктория Викторовна, Судницына Мария Викторовна

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия,
viktoriya-neff@mail.ru*

Наследственные нейродегенеративные заболевания (нейропатии) периферической нервной системы представляют собой обширную группу патологий, которые приводят к снижению мышечной подвижности вследствие нарушений в моторных и сенсорных нейронах. Одна из форм нейропатии (болезнь Шарко-Мари-Ту) коррелирует с точечными мутациями G84R и L99M малого белка теплового шока HspB1 человека, относящегося к семейству АТФ-независимых шаперонов, играющих важную роль в поддержании клеточного гомеостаза. Целью данной работы был анализ структуры и свойств точечных мутантов G84R и L99M HspB1, экспрессия которых сопровождается развитием болезни Шарко-Мари-Ту.

HspB1 дикого типа образует крупные стабильные олигомеры с кажущейся молекулярной массой 560 кДа и коэффициентом седиментации 19,9-20,6 s. Точечные мутации G84R и L99M приводят к образованию более крупных (до 600 кДа), но менее стабильных частиц, склонных к диссоциации до малых олигомеров с молекулярной массой ~ 70 кДа. Коэффициенты седиментации олигомеров, формируемых точечными мутантами G84R и L99M, составляют 26,3 s и 22,8 s соответственно. HspB1 дикого типа обладает шапероноподобной активностью, т.е. способен предотвращать агрегацию денатурированных белков-субстратов. Измеренная *in vitro* шапероноподобная активность точечных мутантов G84R и L99M существенно меньше аналогичной активности белка дикого типа. Под действием различных неблагоприятных факторов HspB1 дикого типа подвергается фосфорилированию по трем остаткам (Ser15, Ser78, Ser82), при этом фосфорилирование приводит к диссоциации крупных олигомеров до димеров или тетрамеров. Установлено, что точечные мутации G84R и L99M не влияют на степень фосфорилирования HspB1 под действием активированной MAPKAP2 киназы, максимальная степень фосфорилирования HspB1 и его точечных мутантов составляет ~3 моль фосфата на моль белка. После включения 0,6 моль фосфата на моль белка, белок дикого типа представлен олигомерами разного размера, кажущиеся молекулярные массы которых составляют от 100 до 560 кДа. Включение 0,6 моля фосфата на моль мутантных белков G84R и L99M приводит к полной диссоциации крупных олигомеров и накоплению малых олигомеров с кажущейся молекулярной массой ~ 100 кДа. HspB1 дикого типа образует гетероолигомеры с другим малым белком теплового шока человека HspB6. При этом образуются гетероолигомеры двух типов с кажущимися молекулярными массами 100 и 300 кДа. Мутанты G84R и L99M также способны образовывать гетероолигомерные комплексы с HspB6, однако в этом случае удается обнаружить только малые гетероолигомеры с кажущейся молекулярной массой ~ 100 кДа. Сделан вывод, что точечные мутации аминокислотных остатков Gly 84 и Leu 99 влияют на олигомерное состояние и свойства HspB1. Повышенная склонность к диссоциации нефосфорилированных и фосфорилированных мутантных форм HspB1 может быть одной из причин возникновения нейропатии Шарко-Мари-Ту.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 13-04-00015).

Участие факторов СРЕВ в комплексной регуляции сперматогенеза

Носов Георгий Андреевич

*МГУ имени М. В. Ломоносова, Институт Молекулярной Генетики РАН, Москва, Россия,
nosov-georgy@rambler.ru*

Цитоплазматическое полиаденилирование – один из ключевых путей регуляции экспрессии в гаметогенезе, эмбриогенезе, функционировании клеток иммунной и нервной системы. Для запуска цитоплазматического полиаденилирования необходимо наличие элементов цитоплазматического полиаденилирования (СРЕ) в мРНК. Эти регуляторные элементы связывают белки СРЕВ. У *Drosophila melanogaster* присутствуют 2 СРЕВ: Orb и Orb2, при этом последний участвует исключительно в сперматогенезе и не вовлечен в регуляцию оогенеза. Также Orb2 обнаружен в мозге, где он формирует амилоидные агрегаты.

В нашей работе изучали функционирование Orb2 на различных стадиях сперматогенеза. Используя иммунофлуоресцентное окрашивание специфическими антителами и конфокальную микроскопию было проанализировано внутриклеточное распределение Orb2 на различных стадиях сперматогенеза. Также методами конфокальной микроскопии и Western-blot анализа были проанализированы композиция и внутриклеточное распределение белков – маркеров клеточного цикла в семенниках мух дикого типа и различных мутантов по Orb2. Изучалось возможное образование амилоидов Orb2 в семенниках.

В ходе исследования было показано, что в сперматоцитах Orb2 располагается в герминальных гранулах, где он совместно локализуется с РНК-хеликазой Vasa и другими белками, участвующими в рiРНК-опосредованном сайленсинге. Тем не менее, потеря Orb2 не приводит к нарушению рiРНК-сайленсинга и разрушению герминальных гранул. При потере Orb2 происходит арест мейоза, примерно 60% цист блокируется в G2-фазе, однако 40% вступают в мейоз, но не входят в метафазу. Также нарушение экспрессии Orb2 приводит к накоплению циклинов, что может быть одной из причин ареста мейоза в G2-фазе. Мы связываем это с нарушением системы убиквитинилирования и деградации циклинов.

Таким образом, в данной работе изучена внутриклеточная локализация Orb2 в сперматоцитах *Drosophila*, исследовано участие Orb2 в регуляции мейоза в семенниках. Обнаружено накопление циклинов в сперматоцитах при отсутствии Orb2. В экстрактах семенников обнаружены амилоидные агрегаты Orb2.

Оценка вклада монооксигеназ в канцерогенную активацию бензо (а) пирен-7,8-диола в опухолевой клеточной линии А549

Панибрат Олеся Владимировна, Сыса А.Г., Бабенко А.С., Шабуня П.С., Фатыхова С.А., Киселев П.А.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь, panisestra@tut.by

Бензо (а) пирен-7,8-диол представляет собой проканцерогенное производное бензо (а) пирена, полициклического ароматического углеводорода, содержащегося в табачном дыме. Реакция его активации может реализовываться тремя различными способами: пероксидазной и монооксигеназной активностью изоэнзимов цитохрома Р-450 (СУР), а также ферментами семейства альдо-кето редуктаз. В ходе реакции, катализируемой изоформами цитохрома Р450 СУР 1А1 и СУР 1В1, образуются два диолэпоксида, один из которых, диолэпоксид-2, является абсолютным канцерогеном. Цитохромы Р450 обладают свойством субстратной индукции, т.е. некоторые ксенобиотики вызывают усиление экспрессии генов тех СУР, которые их окисляют.

В данной работе был оценен вклад монооксигеназ в активацию бензо (а) пирен-7,8-диола под действием индуктора-20-метилхолантрена и без него, на примере клеточной линии А549

(аденокарцинома легкого человека). Монооксигеназную реакцию запускали добавлением 1 мМ NADPH. Анализ продуктов реакции эпоксицирования бензо (а) пирен-7,8-диола проводили с помощью ВЭЖХ. Также был оценен уровень экспрессии генов *CYP 1A1* и *CYP 1B1* в интактных клетках и под действием индуктора.

Вклад монооксигеназного процесса в условиях эксперимента в клетках A549 составляет лишь 13%, что в принципе согласуется с относительно низким уровнем конститутивной экспрессии *CYP1A1* и *CYP1B1*. При экспонировании клеток действию 20-метилхолантрена – полициклического ароматического углеводорода, также входящего в состав табачного дыма: монооксигеназная составляющая в канцерогенной активации 7,8-бензо(а)пирен-диола достигает уже 25%. Причем практически 90% приходится на долю «полного» канцерогена – диолэпоксида-2.

Это позволяет полагать, что попадание в организм не одного, а целого пула полициклических ароматических углеводородов может существенным образом влиять не только на уровень, но и на направление канцерогенной активации отдельных представителей полициклических ароматических соединений.

Конструирование рекомбинантного тропонинового ИТС-комплекса сердца человека и изучение его биохимических и иммунохимических свойств

Сурина Мария Александровна, Тверской Артем Михайлович

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия,
surina.mary@gmail.com*

Тропониновый комплекс – белок тонких филаментов поперечнополосатой и сердечной мускулатуры – состоит из трех субъединиц – тропонинов I, T и C. Сердечные изоформы тропонинов I и T являются маркерами заболеваний, связанных с некрозом тканей сердечной мышцы, в частности – инфаркта миокарда. В настоящее время в качестве калибратора в диагностических системах преимущественно используется нативный тропониновый комплекс, выделенный из сердечной мышцы человека. Альтернативой ему может служить более доступный рекомбинантный белок. Целью работы было конструирование, исследование протеолитической деградации в сыворотке и сравнение иммунохимических свойств рекомбинантного и нативного (выделенного из сердечной мышцы человека) тропониновых комплексов.

Эффективность сборки тройного комплекса подтверждали с использованием методов гель-фильтрации и иммунопреципитации. Фракции белков после проведения гель-фильтрации анализировали методом непрямого флуороиммунного анализа (ФИА). Динамику деградации нативного и рекомбинантного комплексов в крови изучали в модельной системе, инкубируя комплексы в сыворотке крови лошади. Инкубацию проводили при 37⁰С в течение 0, 1, 2, 4, 8 часов. Пробы анализировали методом непрямого ФИА.

Основной белковый пик после проведения гель-фильтрации по молекулярной массе соответствовал тройному ИТС-комплексу. По данным иммунохимических исследований в соответствующих фракциях содержались все три компонента комплекса, связанные друг с другом. Методом непрямого ФИА было показано, что полученный рекомбинантный тропониновый комплекс по иммунохимическим свойствам близок к нативному белку. При инкубации нативного и рекомбинантного комплексов в сыворотке тропонин T подвергается частичному протеолизу. Также была отмечена быстрая деградация N- и C-концевых участков тропонина I. Тропонин C практически не подвергается протеолизу. Согласно результатам

непрямого ФИА, протеолитическая деградация белков нативного и рекомбинантного комплексов имеет сходную динамику.

В ходе выполнения работы было показано, что рекомбинантный и нативный тропониновые комплексы имеют одинаковые иммунохимические и биохимические особенности. Результаты работы позволяют заключить, что полученный рекомбинантный комплекс может быть использован вместо нативного белка в качестве калибратора в диагностических системах.

Анализ пространственного распределения метаболитов относительно центральной сагиттальной оси хрусталика человека

Тамара Семён Олегович

Международный томографический центр СО РАН, Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия, stamara323@gmail.com

Хрусталик представляет собой уникальную ткань благодаря структуре составляющих его клеток: однослойного эпителия передней стенки хрусталика, который делится на протяжении всей жизни, и клеток более глубоких слоев, теряющих органеллы и ядра для обеспечения прозрачности ткани. В результате потери клетками структур, необходимых для питания хрусталика и производства незаменимых метаболитов, единственным возможным источником может быть их поставка извне. В настоящее время нет четкого понимания, каким именно образом происходит питание и транспорт метаболитов во внутренние слои хрусталика.

Исследование было проведено с использованием сочетания методов: масс-спектрометрического, а также высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В результате данной работы впервые было определено пространственное распределение двадцати основных метаболитов вдоль центральной сагиттальной оси хрусталика человека. В этот список входят различные аминокислоты, антиоксиданты и УФ-фильтры. Для большинства соединений наблюдается равномерное распределение в исследуемом направлении. Однако, GSH - антиоксидант хрусталика, препятствующий возникновению белковых сшивок, - демонстрирует постепенное падение концентрации к задней стенке хрусталика человека. Один из основных УФ-фильтров, АНВG, располагается преимущественно в ядре хрусталика, тогда как ближе к стенкам хрусталика его концентрация существенно падает.

Равномерное распределение большей части метаболитов в исследуемом направлении может являться нормальным состоянием для здорового хрусталика. Можно заключить, что насыщение анализируемой области основными метаболитами успевает восполнить их медленное расщепление. Постепенное падение концентрации GSH к задней стенке хрусталика свидетельствует о том, что данный метаболит поставляется в толщу хрусталика за счет свободной диффузии из эпителиальных клеток передней стенки, где он и синтезируется. Дальнейшие работы в данном направлении будут включать в себя исследование пространственного распределения метаболитов хрусталика в зависимости от зрелости катаракты, что поможет пролить свет на метаболические процессы, происходящие в хрусталике в ходе его развития, а также в процессе появления катаракты.

Работа поддержана грантами РФФИ 14-03-00027, 14-03-00453, 14-03-31189.

Влияние межмономерной дисульфидной связи на свойства малого белка теплового шока HspB1 человека

Чалова Анна Сергеевна, Судницына Мария Викторовна

*МГУ имени М. В. Ломоносова, Биологический факультет, Россия, Москва,
annaschalova@mail.ru*

HspB1 человека является одним из представителей семейства малых белков теплового шока. Этот белок экспрессируется практически во всех тканях человека и играет важную роль в поддержании клеточного гомеостаза, предотвращая агрегацию частично денатурированных белков, защищая клетку от окислительного стресса и участвуя в регуляции процессов пролиферации, апоптоза и многих других ключевых клеточных процессов. Окислительный стресс может сопровождаться окислением единственного остатка цистеина (Cys137) HspB1, что приводит к образованию «сшитых» дисульфидной связью димеров. Влияние дисульфидной связи на структуру и свойства HspB1 не было подробно изучено, поэтому целью данной работы было сравнение свойств полностью восстановленного и окисленного HspB1.

Рекомбинантный HspB1 был экспрессирован в клетках *E. coli* штамма BL 21 и очищен с помощью фракционирования сульфатом аммония, ионообменной хроматографии и гель-фильтрации. Мягкое окисление SH-групп проводили с помощью диализа против буфера, не содержащего восстановителя. Введение дисульфидной связи не влияет на олигомерное состояние HspB1 при комнатной температуре. По данным гель-фильтрации при комнатной температуре как окисленный, так и восстановленный HspB1 образует крупные олигомеры с кажущейся молекулярной массой ~560 кДа. В этих условиях спектры триптофановой флуоресценции окисленного и восстановленного белка не отличаются друг от друга. Нагревание восстановленного HspB1 сопровождается кооперативным изменением триптофановой флуоресценции с температурой полуперехода ~70° С, в то же время окисленный HspB1 не претерпевает кооперативных изменений структуры, регистрируемых методом собственной триптофановой флуоресценции. Изменения триптофановой флуоресценции окисленного белка полностью обратимы, в то время как изменения триптофановой флуоресценции восстановленного белка могут быть обращены только частично. Повышение температуры сопровождается самоассоциацией олигомеров как окисленного, так и восстановленного HspB1, однако по данным динамического лазерного рассеяния (DLS) и гель-фильтрации, восстановленный HspB1 образует более крупные ассоциаты, чем окисленный белок. Индуцированное повышением температуры изменение олигомерного состояния окисленного HspB1 практически полностью обратимо, в то время как изменение олигомерного состояния восстановленного белка может быть обращено только частично. Представленные результаты свидетельствуют о том, что введение межмономерной дисульфидной связи увеличивает стабильность и уменьшает подвижность HspB1. В полном соответствии с этим предположением установлено, что шапероноподобная активность восстановленного HspB1 заметно выше аналогичной активности окисленного белка. Сделан вывод, что индуцированное окислительным стрессом формирование межмономерных дисульфидных мостиков оказывает существенное влияние на структуру и свойства HspB1. *Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 13-04-00015).*

Секретируемые протеазы микромицетов рода *Trichoderma*

Шамрайчук Ирина Леонидовна

МГУ имени М.В.Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского, Москва, Россия, irashamr@yandex.ru

Определение спектра энзиматической активности представителей рода *Trichoderma* важно не только при поиске биотехнологически значимых продуцентов гидролитических ферментов, но и для идентификации ключевых белковых компонентов, вовлеченных во взаимодействие микромицетов с фитопатогенными грибами и насекомыми. Одним из аспектов такого взаимодействия является секреция протеаз, характеризующих наряду с другими ферментами потенциал штаммов как биоконтрольных агентов. Проведенный в данной работе сравнительный анализ секреции протеаз и их ингибиторов микромицетами рода *Trichoderma* позволил выявить предположительные механизмы регуляции секреции и активности протеолитических ферментов у исследованных штаммов.

Общую протеолитическую активность определяли по гидролизу азоказеина, специфическую – по расщеплению п-нитроанилидных синтетических субстратов.

Согласно результатам исследования, общая протеолитическая активность микромицетов соответствовала 2,14 – 6,52 ед./г сухого мицелия в мин. При этом более высокую активность проявляли штаммы, приводившие к значительному понижению исходного значения рН среды (до рН 4,6) по сравнению со штаммами, характеризовавшимися значениями рН культуральной жидкости, близкими к нейтральному (рН 6,8–6,9). Среди изученных культур обнаружены продуценты аминопептидаз, трипсин-, химотрипсин-, субтилизин-подобных и цистеиновых протеаз. Отмечена корреляция между аминопептидазной, трипсин- и субтилизин-подобной активностью и значением рН культуральной жидкости штаммов: трипсин-подобные протеазы выявлены только у культур с пониженными значениями рН, культуры же с более высокими значениями рН проявляли только субтилизин-подобную и аминопептидазную активность. Тем не менее, ингибиторы трипсина выявлены у всех исследованных микромицетов. Невысокая ингибиторная активность по отношению к химотрипсину показана у штамма-продуцента химотрипсин-подобных протеаз. Ингибиторы папаина секретировали все использованные в работе штаммы, но наиболее высокая степень ингибирования фермента отмечена у штамма-продуцента цистеиновых протеаз.

Полученные данные указывают на возможный рН-зависимый механизм секреции протеаз, принадлежащих к различным классам и группам, у исследованных микромицетов рода *Trichoderma*. Предполагается, что в регуляции активности секретируемых протеаз могут принимать участие внеклеточные ингибиторы протеолитических ферментов.