



РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ОТДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК
СЕКЦИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ
НАУЧНЫЙ СОВЕТ РАН ПО БИОФИЗИКЕ
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ КЛЕТКИ РАН



ИНСТИТУТ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОФИЗИКИ РАН
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ РАН
ИНСТИТУТ ПРИКЛАДНОЙ ФИЗИКИ РАН
НИЖЕГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Н.И. ЛОБАЧЕВСКОГО
МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. М.В. ЛОМОНОСОВА

IV СЪЕЗД БИОФИЗИКОВ РОССИИ

20-26 августа 2012 г.
Нижний Новгород
Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского

Симпозиум I
«Физико-химические основы
функционирования биополимеров и клеток»

МАТЕРИАЛЫ ДОКЛАДОВ

Нижний Новгород - 2012

УДК 577.3

IV Съезд биофизиков России. Симпозиум IV «Новые тенденции и методы в биофизике». Материалы докладов. – Нижний Новгород, 2012. - 370 с.

В сборнике представлены материалы симпозиума I «Физико-химические основы функционирования биополимеров и клеток» IV Съезда биофизиков России. Основные направления работы симпозиума: структура и динамика белков и их комплексов; структура и динамика нуклеиновых кислот и их комплексов; биофизика клетки, мембранные процессы; механизмы трансформации энергии, биоэнергетика; биофизическое образование.

Сборник предназначен для биофизиков, биохимиков, молекулярных биологов, специалистов, работающих в различных областях физико-химической биологии. Он может быть также полезен для студентов и аспирантов, специализирующихся в данной отрасли знания.

Ответственный редактор: чл.-корр. РАН А.Б. Рубин

ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ:

Рубин А.Б., член-корр. РАН – сопредседатель
Чупрунов Е.В., профессор, ректор ННГУ – сопредседатель
Воденеев В.А., докт. биол. наук – зам. председателя
Иваницкий Г.Р., член-корр. РАН – зам. председателя
Фесенко Е.Е., член-корр. РАН – зам. председателя
Штранкфельд И.Г., канд. биол. наук – ответственный секретарь

Артюхов В.Г., проф., д.б.н.	Колчанов Н.А., акад. РАН
Бурлакова Е.Б., проф., д.б.н.	Комаров В.М., проф., д.б.н.
Вашанов Г.А., проф. д.б.н.	Крышталь О. А., чл.-корр. РАН, акад. НАН Украины
Владимиров Ю.А., акад. РАМН	Макаров А.А., акад. РАН
Волотовский И.Д., акад. НАН Белоруссии	Монаселидзе Д. Р., проф., д.ф.-м.н.
Гительзон И.И., акад. РАН	Намиот В.А., д.ф.-м.н.
Готтих Б.П., проф., д.х.н.	Никольский Н.Н., акад. РАН
Григорьев А.И., акад. РАН и РАМН	Островский М.А., акад. РАН
Гурбатов С.Н., проф., д.ф.-м.н.	Пирузян Л.А., акад. РАН
Гурский Г.В., чл.-корр. РАН	Ризниченко Г.Ю., проф., д.ф.-м.н.
Гусев Н.Б., чл.-корр. РАН	Розанов А.Ю., акад. РАН
Дегерменджи А.Г., акад. РАН	Савицкий А.П., проф., д.х.н.
Есипова Н.Г., к.ф.-м.н.	Твердислов В.А., проф., д.ф.-м.н.
Заалишвили М. М., акад. АН Грузии	Ткачук В.А., акад.РАН
Иванов В.Т., акад. РАН	Туманян В.Г., проф., д.ф.-м.н.
Карнаухов В.Н., к.б.н.	Чизмаджев Ю.А., чл.-корр. РАН
Кирпичников М.П., акад. РАН	Шувалов В.А., акад. РАН

ПРОГРАММНЫЙ КОМИТЕТ:

Рубин А.Б., член-корр. РАН – председатель
Есипова Н.Г., канд. физ.-мат. наук – зам. председателя

Антонов В.Ф., проф., д.б.н.	Подлубная З.А., проф., д.б.н.
Атауллаханов Ф.И., проф., д.б.н.	Ризниченко Г.Ю., проф., д.ф.-м.н.
Бурлакова Е.Б., проф., д.б.н.	Романовский Ю.М., проф., д.ф.-м.н.
Ванин А.Ф., проф., д.ф.-м.н.	Рощупкин Д.И., чл.-корр. РАМН
Вашанов Г.А., проф., д.б.н.	Семьянов А.В., проф., д.б.н.

Владимиров Ю.А., акад. РАН

Воденеев В.А., д.б.н.

Гельфанд М.С., проф. д.б.н.

Гречкин А.Н., акад. РАН

Загайнова Е.В., д.м.н.

Зинченко В.П., д.ф.-м.н.

Иваницкий Г.Р., чл.-корр. РАН

Казанцев В.Б., д.ф.-м.н.

Карнаухов В.Н., к.б.н.

Колесников С.С., проф., д.б.н.

Комарова Л.Ф.

Красавин Е.А., проф., д.б.н.

Крицкий М.С., проф., д.б.н.

Максимов Г.В., проф., д.б.н.

Мухина И.В., проф., д.б.н.

Намиот В.А., проф., д.ф.-м.н.

Сергеев А.М., чл.-корр. РАН

Слобожанина Е.И., чл.-корр. НАН Белоруссии

Соболев А.С., проф., д.б.н.

Твердислов В.А., проф., д.ф.-м.н.

Туманян В.Г., проф., д.ф.-м.н.

Фесенко Е.Е., чл.-корр. РАН

Финкельштейн А.В., проф., д.ф.-м.н.

Цатурян А.К., проф., д.ф.-м.н.

Черенкевич С.Н., акад. НАН Белоруссии

Чернавский Д.С., проф. д.ф.-м.н.

Шайтан К.В., проф., д.ф.-м.н.

Штранкфельд И.Г., к.б.н.

Ягужинский Л.С., проф., д.б.н.

Яминский И.В., проф., д.ф.-м.н.

Яхно В.Г., проф., д.ф.-м.н.

ЛОКАЛЬНЫЙ ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ:

Воденеев В.А., д.б.н. – председатель, зав. каф. биофизики

Веселов А.П., проф., д.б.н. – декан биологического ф-та

Загайнова Е.В., д.м.н. – зав. каф. биомедицины

Казанцев В.Б., д.ф.-м.н. – зав. каф. нейродинамики и нейробиологии

Абрамова Н.Н.

Акинчиц Е.К.

Балалаева И.В., к.б.н.

Глушаева Т.С.

Катичева Л.А.

Лебедева А. В.

Леканова Н.Ю.

Мысягин С.А., к.б.н.

Орлова А.Г., к.б.н.

Орлова О.В., к.б.н.

Половинкина Е.О., к.б.н.

Синицына Ю.В., к.б.н.

Сухов В.С., к.б.н.

Черкасова Е.И., к.б.н.

МАТЕРИАЛЫ ДОКЛАДОВ

**МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ШУБЫ ИЗ ФИБРИНА/ФИБРИНОГЕНА
НА ПОВЕРХНОСТИ ФОСФАТИДИЛСЕРИН-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ТРОМБОЦИТОВ****Mechanisms of fibrin/fibrinogen coat formation on the surface
of phosphatidylserine-expressing activated platelets****Абаева А.А.¹, Колядко В. Н.², Якименко А. О.², Котова Я. Н.¹, Атауллаханов Ф.И.^{1,2},
Пантелеев М.А.^{1,2}**

¹ – ФНБУ Центр теоретических проблем Физико-химической фармакологии РАН,
Россия, 119991, Москва, ул. Косыгина, д. 4

Тел.: +7(495)612-35-22, факс +7(495)612-88-70

² – ООО «Гемакор» Россия, 125167, Москва, 4-я улица 8 Марта, дом 3

Тел.: +7(495)258- 25-38

Физиологическая активация тромбоцитов ведет к образованию двух субпопуляций. Одна из которых характеризуется большим количеством фосфатидилсерина (ФС), плотным слоем α -гранулярных белков на внешней стороне мембраны и сниженной экспрессией активного гликопротеина 2b3a. Одним из главных вопросов является способность таких тромбоцитов удерживать на своей поверхности α -гранулярные белки. В настоящее время существуют две основные гипотезы-сшивка белков трансглутаминазами и образование фибринового слоя к которому адсорбируются другие α -гранулярные белки.

Целью данной работы было изучить механизм формирования шубы из фибриногена на поверхности ФС- положительных тромбоцитов. Для этого в работе были использованы методы проточной цитометрии и иммунофлуоресценции.

Показано, что ингибитор полимеризации фибрина GPRP доза - зависимо снижает количество фибрин(оген)а на поверхности ФС-положительных тромбоцитов при их активации тромбином с коллагенподобным пептидом или тромбином. Также добавление анцистрона, свертывающей фибрин протеиназы, в 4 раза увеличивает количество фибрин(оген)а на их поверхности. Добавление тканевой трансглутаминазы или активного фактора XIII при активации тромбоцитов конвульксином или конвульксином с SFLLRN в 5 раз увеличивает количество фибрин(оген)а на поверхности ФС-положительных тромбоцитов. Однако, добавление пан-трансглутаминазного ингибитора T101 не влияет на количество фибриногена на их поверхности.

Полученные данные свидетельствуют о ключевой роли полимеризации фибрина в процессе образования шубы. Так же продемонстрировано, что и трансглутаминазы способны пришивать фибриноген к ФС-положительных тромбоцитам, однако этот механизм, по всей видимости, не является физиологически важным.

Работа частично поддержана грантами РФФИ 10-01-91055, 11-04-00303, 11-04-12080, 12-04-00652-а, 12-04-00438-а и программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», «Интегративная физиология» и «Молекулярные механизмы физиологических функций».

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ГИДРОФОБНЫХ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗЫ МЕТОДАМИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ**Т. И. Авсиевич¹, М.А. Герасимова¹, Е. В. Немцева^{1,2}**¹ – Сибирский федеральный университет, 660049, Красноярск, пр. Свободный, 79² – Институт биофизики СО РАН, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50;
Тел.: +7(391)2062072; e-mail: tiavsievich@gmail.com

Для исследования поверхностных характеристик белков часто используют флуоресцентный зонд 1,8-АНС (1-анилинонафталин-8-сульфонат), способный при связывании с макромолекулой на порядок увеличивать квантовый выход флуоресценции. Для данного зонда возможны взаимодействия с макромолекулами как по гидрофобному, так и электростатическому механизму [1]. Целью данной работы являлось установить характеристики связывания 1,8-АНС с бактериальной люциферазой *Photobacterium leiognathi*.

Сайты связывания люциферазы исследовали методом флуориметрического титрования зондом 1,8-АНС. Регистрировали стационарные и время-разрешенные спектры флуоресценции смеси белка с зондом при варьировании концентрации последнего с помощью спектрофлуориметра Fluorolog-3-22.

Хроноскопические данные были проанализированы с помощью глобального анализа и показали наличие двух типов флуорофоров с коротким ($\tau_1=7.6$ ns) и длинным ($\tau_2=17.7$ ns) временем жизни. Эти времена могут характеризовать зонд, связанный с внешними и внутренними сайтами белка соответственно [2]. С учетом этого факта стационарная кривая титрования была разложена на две кривые, соответствующие двум типам сайтов связывания. Нелинейный анализ каждой из них позволил заключить, что на поверхности белка взаимодействие зонда с люциферазой характеризуется константой диссоциации $K_{d1}=32,4\pm 11,8$ μ M и числом сайтов связывания $n_1=2,08\pm 1,1$, внутри белка – $K_{d2}=4.3\pm 0.8$ μ M и $n_2=1,3\pm 0,1$.

Вклад электростатического эффекта во взаимодействие зонда с белком оценили по влиянию ионной силы среды (за счет варьирования концентрации NaCl) на флуоресценцию зонда в присутствии люциферазы. Поскольку влияние ионной силы среды оказалось незначительным, был сделан вывод, что гидрофобный механизм играет определяющую роль во взаимодействии 1,8-АНС с белком.

Анализ структуры гомологичной люциферазы *Vibrio harveyi* (3FGC) средствами Swiss-PdbViewer позволил выявить доступные растворителю области белка, образованные гидрофобными аминокислотами. Сопоставление первичной структуры люцифераз показало, что эти области сформированы консервативными аминокислотными остатками белков. Активный центр обладает наибольшей гидрофобной площадью за счет остатков *Leu109*, *Val255*, *Val173*, *Ala174*, *Gly108*, *Ile105*, *Ile195*, *Ala74* и *Ala75*, вероятно, он является одним из центров связывания.

Работа выполнена при поддержке гранта «Биолюминесцентные биотехнологии» (договор № 11.G34.31.0058, в рамках Постановления Правительства РФ № 220, 2010 г.) и программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

1. Collini M., D'Alfonso L., Baldini G. (2000), Protein Science 9:1968–1974.

2. Gasyimov, O. K., Abduragimov, A. R., Glasgow, B. J. (2007), Arch. Biochem. Biophys. 468,

КОНФОРМАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА АНТИМИКРОБНЫХ ТЕТРАПЕПТИДНЫХ АНАЛОГОВ ОВЕЧЬЕГО БАКТЕНЕЦИНА 5**Conformational particularities of antimicrobial tetrapeptide analogs of ovine bactenecine 5****Агаева Г.А., Годжаев Н.М.**

Бакинский государственный университет, Институт физических проблем,
AZ-1148, Баку, ул.З.Халилова, 23, Tel. (+994 412)5101822 ,
Fax (+994412)4983376, e-mail: gulshen@mail.ru

Как известно, антимикробные пептиды хоть и уступают антибиотикам по эффективности, но действуют намного быстрее и уничтожают бактерии, устойчивые к известным антибиотикам, что создает перспективы для их практического применения в качестве лекарственного препарата. Однако применять в клинике в качестве антибиотиков и антигрибковых средств можно только те пептиды, которые не вредят здоровым клеткам организма. Но большинство природных пептидов наряду с антимикробным обладают также гемолитическим действием, то есть разрушают эритроциты. Так возникает проблема создания таких искусственных аналогов природных антимикробных пептидов, которые бы обладали антибактериальной, но не имели гемолитической активности. В то же время для выяснения механизма биологического действия пептида необходимо знание его пространственной организации, чтобы определить его конформационно-функциональные взаимосвязи для создания более эффективных аналогов.

В настоящей работе методами молекулярной механики и динамики проведен сравнительный конформационный анализ серии антимикробных тетрапептидных аналогов молекулы овечьего бактенецина5 (OaVac5), синтезированных в работе [1]. Тетрапептиды содержат одинаковый N-концевой трипептид и различающийся C-концевой остаток: Phe-Arg-Pro-Xxx, где Xxx = Phe, Tyr, Met и Trp. Исследование антибактериальной активности этих тетрапептидов показало, что они воздействуют сильнее против грам-отрицательных бактерий, чем против грам-положительных бактерий. Как оказалось по силе воздействия против грам-отрицательных бактерий указанные тетрапептиды находятся в следующем соотношении Phe-Arg-Pro-Trp > Phe-Arg-Pro-Phe > Phe-Arg-Pro-Met ≥ Phe-Arg-Pro-Tyr и ни один из них не проявил существенную гемолитическую активность. По всей видимости своеобразии аминокислотной последовательности тетрапептидов проявляется в силе биологической активности молекул. В результате исследования были определены и сопоставлены энергетически предпочтительные конформационные состояния всех тетрапептидов, выявлены величины двугранных углов основной и боковых цепей, а также оценены энергетические вклады внутри и межостаточных взаимодействий во всех оптимальных конформациях молекул. Используя полученные геометрические и энергетические параметры оптимальных структур высокоактивных тетрапептидов были построены обобщенные визуальные пространственные модели биологически активных конформаций.

**ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ ТАХИКИНИНОВЫХ НЕЙРОПЕПТИДОВ,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ АМФИБИЙ.****Spatial structure of amphibian tachykinin neuropeptides****Агаева Г.А.**

Бакинский государственный университет, Институт физических проблем,
AZ-1148, Баку, ул.3.Халилова, 23, Tel. (+994 412)5101822, Fax (+994412)4983376,
e-mail: gulshen@mail.ru

Широкий спектр физиологических свойств тахикининов, возможность их более целенаправленного использования в качестве ценных лекарственных препаратов делает их объектом многочисленных исследований. Выяснено что, тахикинины играют важную роль в патогенезе бронхиальных, воспалительных и желудочно-кишечных болезней, а также приступов мигрени и эпилепсии. Известно что, тахикинины взаимодействуют с тремя различными типами рецепторов NK_1 , NK_2 и NK_3 . Предполагается что, эффективные и селективные агонисты и антагонисты рецепторов тахикининов могут иметь большой терапевтический потенциал для лечения многих хронических заболеваний. Тахикинины, выделенные из амфибий, также как тахикинины, выделенные у млекопитающих, характеризуются сходными аминокислотными последовательностями и физиологическими воздействиями. Все они в той или иной степени сродства взаимодействуют с рецепторами NK_1 , NK_2 и NK_3 . Сопоставление конформационных элементов тахикининов позволит выявить структурные особенности, необходимые для определения селективности конкретного типа рецептора.

В настоящей работе проведено сопоставление конформационных особенностей тахикининов, выделенных из амфибий, филломедузина, физаламина, эледиозина, кассинина и уперолеина на основе знания энергетически предпочтительных пространственных структур нейропептидов, определенных методами молекулярной механики применительно к среде, моделирующей мембранное окружение. Как показал расчет α -спиральный сегмент на середине и С-конце молекул. По видимому, в зависимости от окружающей среды эти пептиды могут принимать ту или иную гибкую конформацию. Методом молекулярной динамики была рассмотрена энергетика и кинетика взаимодействия отдельных функциональных групп, присутствующих в различных положениях пептидов и нарушение, получена информация о наиболее подвижных участках молекул, которая обеспечивает стереокомплементарность взаимодействующих поверхностей пептида и рецептора. Проведенное исследование показало, что определенные остатки, сосредоточенные в С-концевой части молекул являются структурно необходимыми для связывания с рецептором, обеспечивая селективность к NK_1 рецепторам. Попытки найти корреляцию между наблюдаемыми конформационными различиями и связывающими способностями, а также биологической активностью различных агонистов NK_1 рецепторов позволяют обсудить перспективы создания синтетических аналогов этих пептидов, пригодных для клинического использования.

КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЫ SCG- AST7

Conformational analysis of the molecules SCG -AST7

Агаева У.Т.

Бакинский Государственный Университет, Институт Проблем Физики
AZ-1148, Баку, ул. Ак. З.Халилова 23, Азербайджан
Tel. (+994412)510 18 22, Fax(+99412)498 33 76, E-mail: Eminzade_U@rambler.ru

Актуальные проблемы современной молекулярной физики и смежных с ними дисциплин связаны с установлением корреляций между биологическими и химическими свойствами пептидных молекул, обладающих уникальными способностями восстанавливать биосинтез белков и функциональную активность органов и тканей. Большую группу нейропептидов, выделяемых нейросекреторными клетками насекомых, образуют аллостатины, играющие ключевую роль в процессах онтогенеза насекомых. К настоящему времени этот класс нейропептидов идентифицирован в двух видах насекомых - тараканах "*Periplaneta Americana*", "*Diplophera punktata*" и чешуекрылых "*Manduca Sexta*". Все нейропептиды участвуют в гормональной регуляции указанных насекомых, ингибируя синтез и выделение ювенильных гормонов в процессе их метаморфоза. Нейропептиды, обладающие уникальной способностью регулировать процессы синтеза и выделения ювенильных гормонов у различных видов насекомых, относятся к числу объектов интенсивного исследования последнего десятилетия. Они играют ключевую роль в процессах онтогенеза насекомых, участвуют в нейротрансдукции и ингибировании перистальтического движения кишечника [1]. В работе методом теоретического конформационного анализа исследована структура и конформационные свойства одного из представителей семейства аллостатинов – шистостатина 7, содержащего в своей первичной структуре девять аминокислотных остатков: Glu10-Gly11-Arg12-Met13-Tyr14-Ser15-Phe16-Gly17-Leu18-NH2). Были определены низкоэнергетические конформации и соответствующие им энергии.

Используемые в работе полужемпирические потенциальные функции и их параметризация были взяты из работы [5]. Согласно полученным результатам имеет место сильной дифференциации структуры молекулы. Так например, в интервал энергии 0-7 ккал/моль относительной энергии попадают лишь шейпы ffefeefe, eeeeeefe, ffefeeff, eeefffee, eeefffee, efeefeee и eeeffffff. Глобальная конформация с $R_1B_2LR_3B_2B_1LB_3$ формой пептидной цепи (шейп ffefeefe) лишь на 2.26 ккал/моль и 3.16 ккал/моль уступает структурам свернутого типа с $R_1B_3LB_1R_1R_1B_2PR_3$ и $R_1B_2LR_3B_3R_2B_1PR_3$ формой, соответственно (шейпы ffeeffff и ffefefff), стабилизированной системой водородных связей Glu1(CO)...Arg3(NH), Met4(NH)...Tyr5(CO), Tyr5(CO)...Leu9(NH), Ser6(CO)...Phe7(NH), Phe7(NH)...Gly8(CO), Gly8(NH)...Leu9(CO) с длиной связью 2.02 Å, 2.92 Å, 2.88 Å, 2.05 Å, 2.22 Å, 2.72 Å, с энергией -1.15 ккал/моль, - 0.10 ккал/моль, -0.12 ккал/моль, - 1.08 ккал/моль, - 0.72 ккал/моль - 0.72 ккал/моль, - 0.18 ккал/моль.

1. Clark L., Lange A.B., Zhang J.R., Tobe S.S. The roles of Dippu-allatostatin in the modulation of hormone release in *Locusta migratoria* // *J.Insect.Physiol.*, 2008, v.54(6), p.949-958

ГРАМИЦИДИНОВЫЕ КАНАЛЫ КАК ИНДИКАТОРЫ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ**Gramicidin channels as indicators of the lipid bilayer physico-chemical state****Адельянов А. М.¹, Башкиров П. В.², Яковенко Л. В.¹**

¹ – МГУ им. М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы, ГСП-1, д. 1, стр. 2, физический факультет
Тел.: +7(495)939-30-07; факс: +7(495)932-88-20; e-mail: gorod_tumanov@yahoo.com

² – Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,
119071, Москва, Ленинский пр-т, 31, к. 5

Тел.: +7(495)954-72-16; e-mail: vandr@phyche.ac.ru

Изменение физико-химического состояния клеточной мембраны сопровождается большинством процессов жизнедеятельности клетки, в частности, ее реакции на внешние воздействия. Для определения взаимосвязи между внешними факторами и изменениями характеристик мембран требуется некий зонд, позволяющий судить о состоянии мембраны. В качестве такого зонда предлагается использовать относительно простые каналоформеры грамицидины – семейство антибиотиков, продуцируемых бактерией *B.brevis* [1,2]. В работе приведены результаты экспериментального исследования проводимости ионных каналов, образованных грамицидином D, который имеет молекулярную массу около 1,9 кДа и состоит из смеси линейных грамицидинов А, В и С, в искусственных бислойных липидных мембранах (БЛМ) определенного состава при добавлении мономеров грамицидина к растворам по обе стороны мембраны. Вольтамперные характеристики и флуктуации мембранного потенциала определяли методом пэтч-кламп. Положение и величину потенциальных барьеров для проникающих ионов в грамицидиновых каналах оценивали по вольтамперным характеристикам, а по корреляционным функциям для сопротивлений каналов в открытом состоянии – степень жесткости канала и влияние изменений состояния БЛМ на его свойства [3,4]. Приведены экспериментальные данные о влиянии тяжелой воды и температуры на указанные характеристики каналов.

1. Kelkar D.A., Chattopadhyay A. The gramicidin ion channel: A model membrane protein / *Biochim. et Biophys. Acta*, 2007. V. 1768, p. 2011–2025.

2. Antonenko Y.N. Large unselective pore in lipid bilayer membrane formed by positively charged peptides containing a sequence of gramicidin A. / *FEBS Lett.*, 2005. V. 579, p. 5247–5252.

3. Ермаков Ю.А. Биоэлектрохимия липидных мембран. / *Рос. хим. журн.*, 2005. Т.49. № 5. С. 114–121.

4. Намиот В.А., Яковенко Л.В., Ходоров Б.И. Реконструкция энергетических барьеров и их флуктуаций в модели ооинонного канала. / *Биофизика*, 1988. Т. 33, вып. 2. С. 303–309.

ИЗУЧЕНИЕ ИОННОГО МЕХАНИЗМА ГЕНЕРАЦИИ ВАРИАБЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ**Research of variation potential generation in higher plants****Акинчиц Е.К., Катичева Л.А., Мысягин С.А., Неруш В.Н., Воденев В.А.**

Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского,
Россия, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23
Тел: 8(831)465-43-90, akinchits_elena@inbox.ru

Вариабельный потенциал (ВП) для высших растений является стрессовым сигналом о внешнем повреждающем воздействии. Механизм генерации ВП, предположительно, связан с обратимым угнетением активности H^+ -АТФазы. Однако имеются основания полагать, что в генерации ВП принимают участие и пассивные потоки ионов. Таким образом, целью настоящей работы явился анализ участия ионов H^+ , K^+ и Cl^- в генерации ВП.

Объектом исследования служили 3-4 недельные проростки тыквы (*Cucurbita pepo* L.) и пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Для измерения изменения ионных концентраций при генерации вариабельного потенциала был применён потенциометрический метод. Проросток располагали в термостатируемой экранированной камере, закрепляя участок стебля с удаленным эпидермисом в кювете со стандартным раствором. Эксперимент начинали не ранее чем через 2 часа после удаления эпидермиса и установки растения. Электрическую активность и изменения pCl , pK и pH регистрировали с помощью макроэлектродов, pCl , pK и pH чувствительных электродов соответственно. Генерацию ВП вызывали ожогом края листа открытым пламенем.

Применение ингибитора H^+ -АТФазы, блокатора анионных каналов, K -каналов и удаление из внеклеточной среды Ca^{2+} приводило к значительному снижению амплитуды реакции. Было зарегистрировано переходное снижение концентрации H^+ , увеличение концентрации K^+ и Cl^- раствора в экспериментальной кювете, сопровождающие генерацию ВП. Полученные результаты свидетельствуют об участии выходящего потока K^+ и Cl^- в развитие деполяризации при генерации ВП, а также подтверждают и предполагаемое ранее участие Ca^{2+} и протонной помпы в развитии ВП. Отсюда можно заключить, что механизм генерации ВП имеет комплексную природу. При этом, вклад в его формирование вносят как возникновение пассивных потоков ионов (Ca^{2+} , K^+ , Cl^-), идущих по электрохимическому градиенту, так и изменение активности электрогенного насоса.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (12-04-00837-а).

**«КОНЦЕНТРАЦИОННОЕ ЗАПАЗДЫВАНИЕ» ЭФФЕКТОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ
НА МОДЕЛЬНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ ДЛЯ ВЕЩЕСТВ, ДЕЙСТВУЮЩИХ
В МАЛЫХ И СВЕРХМАЛЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ**

**The concentration delay for the affects to the model biological objects for
substances, effectual in the small and ultrasmall concentrations**

Алексеева О.М., Голощাপов А.Н., Бурлакова Е.Б.

Институт Биохимической физики РАН им. Н.М. Эммануэля,
119334, Москва, ул. Косыгина д.4 ИБХФ РАН
Тел.: +7(495)939-74-09; факс: +7(499)137-41-07; e-mail: olgavek@yandex.ru

В настоящей работе представлены данные, дополняющие набор известных фактов для синтезированных в ИХФ и ИБХФ РАН антиоксиданта и адаптогена фенозана и его производного – гибридного антиоксиданта ИХФАН-10, проявляющих свое максимальное воздействие на модельные и клеточные объекты при применении в больших концентрациях (10⁻⁴ – 10⁻⁶ М), а также и в малых (10⁻¹³, 10⁻¹⁴ М), и сверхмалых (10⁻¹⁷, 10⁻¹⁸ М). Механизмы появления на кривых концентрационных зависимостей трех или двух экстремумов с молчашими зонами между ними неясны. Вероятно, водные растворы или эмульсии БАВ структурно варьировать в разных концентрационных диапазонах. Как показано исследованиями в ИОФХ РАН, в области малых и сверхмалых концентраций БАВ образуют с участием структур воды ассоциаты, которые действуют в виде супрамолекулярных комплексов (СМК).

При функциональном тестировании влияния указанных БАВ в диапазоне концентраций 10⁻²¹ – 10⁻³ М на эритроцитах и клетках асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) были получены зависимости с двумя максимумами и зоной молчания между ними. ИХФАН-10 вызывал Са²⁺-зависимый выход К⁺ из эритроцитов с двумя экстремумами в области больших и сверхмалых концентраций и зоной молчания в области малых концентраций. Фенозан изменял объем АКЭ клеток, регулируемый пурин-зависимой Са²⁺-сигнализацией. Первый ответ, отражающий P2Y-рецепторную передачу сигнала внутрь клетки к Са²⁺-депо эндоплазматического ретикулула, проявлял концентрационную зависимость первого порядка при сверхмалых и малых концентрациях с выходом на плато при больших. Второй ответ, отражающий компенсаторный при опустошении депо ретикулула вход Са²⁺ через CRAC, проявлял бимодальную концентрационную зависимость с пиками в сверхмалых и больших областях концентраций и зоной молчания в – малых.

Наблюдается некоторое концентрационное расхождение в экстремумах параметров СМК [3,4] и экстремумах ответов клеток [1,2], которое, по-видимому, можно объяснить либо накоплением в примембранной (или мембранной) области СМК по сравнению с окружающей средой, либо изменением свойств СМК и, соответственно, влияния на мембрану клетки.

1. Алексеева О.М., и др. Сборник статей "Рецепция и внутриклеточная сигнализация" под редакцией В.П. Зинченко, Пущино 2009. С.317-321.

2. Векшина О.М., Фаткуллина Л.Д. и др. / Бюллетень экспериментальной биологии и медицины» 2007. Т.143. С.402-406.

3. Пальмина Н.П. и др. / Доклады Академии наук, 2009. Т.429.С.128-131.

4. Рыжжина И. С. и др. / Доклады Академии наук, 2009. Т.428. С.628-632.

**АТФ-ПУЛ И ЭМИССИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ПСИХРОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ
PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM.****Аленина К.А., Алескерова Л.Э., Вахромеева Т.А., Кащева П.Б., Исмаилов А.Д.**

Московский Государственный Университет имени Ломоносова М.В,
119234, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12.
Тел.: +7 (495) 939-34-50; +7 916-907- 77-58; e-mail: anvaris@list.ru.

До настоящего времени нет четких обоснований основных процессов контролируемых у фотобактерий люминесцентный цикл (1). Несмотря на то, что АТФ не включается непосредственно в световую реакцию, окисление восстановленного флавина и альдегидной молекулы люциферазой может представлять потенциальную конкуренцию за электроны, необходимые для АТФ синтеза. В настоящей работе представлены данные количественного анализа биолюминесцентной активности и пула АТФ в растущей культуре и иммобилизованных клетках фотобактерий *P. phosphoreum*. Интегральный выход фотонов за время люминесцентного цикла растущей культуры (150ч) более 10^9 квант/кл. Внутриклеточная концентрация АТФ за тот же период времени изменяется незначительно в процессе инкубации и составляет 0,2-0,5 10^{-18} моль/кл (1). Результаты параллельного анализа свечения и АТФ в иммобилизованных клетках за 200-часовой период свидетельствуют об отсутствии корреляции между этими параметрами. Общее количество высвеченных фотонов высокоактивными препаратами иммобилизованной клеткой за 2- недельный период инкубации составляет $\sim 10^8$ фотонов, или потребление как минимум 10^{-17} моль/кл субстратов люциферазы, что по крайней мере на порядок выше, чем содержание АТФ. Таким образом установлено, что пул АТФ не изменяется в течении всего люминесцентного цикла как в растущей культуре, так и в иммобилизованных клетках. Очевидно, что даже 100% квантовый выход по альдегиду требует только для одной NADPH, АТФ-зависимой RCOOH-редуктазной реакции мощной системы генерации АТФ, что не подтверждается результатами работы. Полученные данные свидетельствуют о том, что альдегид не утилизируется в биолюминесцентном процессе *in vivo*. По данным работы (2) люциферазы филогенетически и биохимически не соответствуют оксигеназам. Можно полагать, что в реакции свечения альдегид функционирует в форме FMN-алкил аддукта (3) обеспечивая связывание FMN в гидрофобном «кармане» люциферазы. В этом случае необходимо незначительное количество альдегида, который не удаляется из ферментного комплекса.

1. Karl D.M., Neelson K.H. Regulation of cellular metabolism during syntesis and expression of the luminous system in *Beneckea* and *Photobacterium*. *J. Gen. Microbiol.*, 1980; 117, №2:357–368.

2. Rees J.F., Wergifosse B., Noiset O., Dubuisson V., Jassens B., Thompson E.M. The origins of marine bioluminescence: turning oxygen defence mechanisms into deep-see communication tools. *J. Exp. Biol.*, 1998; 201:1211–1221.

3. Karatani H., Konaka T., Katsukawa Ch. *Photochemistry and photobiology*. 2000, 71(2): 230–236.

ДЕТЕРМИНИРУЮЩИЕ ЭЛЕМЕНТЫ СТАБИЛИЗАЦИИ СВЕЧЕНИЯ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФОТОБАКТЕРИЙ В КРИОГЕЛЬ ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА**Алескерова Л.Э., Аленина К.А., Вахромеева Т.А., Кашеева П.Б., Исмаилов А.Д.**

Московский Государственный Университет имени Ломоносова М.В,
119234, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12.
Тел.: +7 (495) 939-34-50; +7 916-907-77-58; e-mail: anvaris@list.ru.

Настоящая работа выполнена в целях изучения наиболее важных факторов стабилизации свечения при иммобилизации фотобактерий. Для получения иммобилизованных препаратов использовали психрофильный штамм *R.phosphoreum*, люминесцентный цикл которого в оптимальном режиме глубинного культивирования при 20°C превышал 100 ч (1). В качестве гель-формирующего агента использован поливиниловый спирт, процесс гелеобразования которого протекает при отрицательных температурах (2). Разработаны технологические операции и процедуры получения препаратов. Оптимизирована среда формирования геля, процедура криогенного гелеобразования, реактивации и хранения (3). Выживаемость клеток в носителе практически 100%, удельная биолюминесцентная активность восстанавливалась до уровня активности свободных клеток (~105 квант/с. кл.) после 24 ч размораживания препаратов. При хранении при -80°C биолюминесцентная активность иммобилизованных клеток сохранялась без изменений в течении 2-х лет. Детектируемый уровень эмиссии в процессе инкубации иммобилизованных препаратов в оптимизированной среде при 4°C – до 1 месяца, при инкубации при 20°C- 3 суток.

Затухание свечения отражает снижение восстановительного потенциала клетки вследствие сдвига pH среды кислыми продуктами метаболизма. Оптимизированы физические и геометрические параметры биосенсора для дискретного и непрерывного биомониторинга экотоксикантов с минимальными ограничениями для диффузии токсинов. Установлено, что интенсивность и длительность эмиссии клеток в иммобилизованном состоянии комплексно контролируется: 1) длительностью и интенсивностью люминесцентного цикла выбранного штамма фотобактерий; 2) составом среды формирования геля; 3) технологией криогенной иммобилизации и реактивации; 4) физико-химическими условиями хранения и применения препаратов.

1. Kuts V.V. and Ismailov A.D. Microbiology, 2009, Vol. 78, No. 5, pp. 554–558

2. Lozinsky V.I., Plieva F.M. Enzyme and Microbial Technology. 1998. V.23. P.227–242

3. Ефременко Е.Н., Сенько О.В., Куц В.В., Аленина К.А., Холстов А.В., Исмаилов А.Д. Патент РФ. 2010. № 2394910

**КОНФОРМАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА НЕВАЛЕНТНЫХ
КОМПЛЕКСОВ ПЕНИЦИЛЛОПЕСИНА С МОДЕЛЬНЫМИ СУБСТРАТАМИ****Алиев Р.Э., Кадымова Ф.А.**

Бакинский Государственный Университет, AZ 1148, г. Баку ул.академика 3.
Халилова,23 Тел.: (99412) 439 05 17; e-mail: rashid_aliev@mail.ru

В настоящем сообщении, используя кристаллографические структуры нативного пенициллопесина и его ингибиторных комплексов, на классической основе при помощи полуэмпирического метода атом-атомных потенциалов, изучены конформационные аспекты взаимодействия пенициллопесина с рядом усложняющихся по структуре модельными субстратами: $\text{CH}_3\text{CO-L-Ala-L-Leu-NHCH}_3$; $\text{CH}_3\text{CO-L-Leu-L-Ala-NHCH}_3$; $\text{CH}_3\text{CO-L-Ala-L-Leu-L-Ala-NHCH}_3$. Выбор этих молекул при исследовании невалентных комплексов пенициллопесина связан с тем, что эти соединения являются простейшими субстратами, позволяющими рассмотреть вопросы первичной и вторичной специфичности. Известно, что аспартатные протеазы, к которым принадлежит пенициллопесин функционируют по общеосновному-общекислотному механизму. На основании анализа трехмерных структур фермент-ингибиторных комплексов, предложенные в литературе стереохимические модели функционирования аспартатных протеаз различаются друг от друга числом стадий ферментативного катализа. При проведении расчетов конформационных стадий ферментативной реакции мы исходили из того, что осуществляемый аспартатными протеазами гидролиз пептидной связи относится к невалентному типу и не были связаны ни с какими априорными предположениями о конкретной схеме механизма катализа. В результате расчета установлено, что продуктивными оказались низкоэнергетические конформации субстрата, которые в то же время выгодны по энергии всех видов взаимодействий с атомами активного центра. Показано, что именно оптимальные невалентные взаимодействия приводят к стереохимической ситуации, благоприятной для реализации последующих стадий гидролиза пептидной связи.

ЖИВАЯ КЛЕТКА С ПОЗИЦИЙ ЕДИНОЙ ТЕОРИИ МАТЕРИИ

Live cell from positions of the uniform theory of a matter

Алифов А.А.

Институт машиноведения им. А.А.Благонравова РАН,
101990, Москва, М.Харитоньевский пер., 4
Тел.: +7(499)135-41-51; e-mail: alishir@mail.ru

Построенная на физико-математической основе единая теория (ЕТ) материи, изложенная в большом цикле работ автора [1-7 и др.], опирается на уравнение мгновенного динамического состояния (МДС) материи. *Клетка* по ЕТ представляет собой осциллятор, и исчезновение колебаний означает ее смерть. Если вымрет определенное количество клеток (микроосцилляторов по отношению к макроосциллятору-органу, содержащему их), то это приведет к смерти состоящего из клеток организма, ибо он в целом потеряет свое колебательное МДС на макроуровне: исчезнет макроколебательное состояние. Вымирание, например, определенного количества клеток сердца и мозга приведет к остановке последних. До сих пор отсутствует объяснение механизма пропуска веществ в клетку. Это объяснение возможно с помощью ЕТ. Механизм пропуска связан с синхронизмом. При синхронизме движений веществ, находящихся внутри и вне клетки, в ее оболочке «двери открываются» и последнее поступает в нее. Если нет синхронизма, то «двери закрываются» и нет поступления вещества в клетку. Синхронизм (синфазный и антифазный) играет фундаментальную роль в процессе *самоорганизации клетки*, ее делении – *митозе*. Без синхронизма этот процесс невозможен. Благодаря синфазному синхронизму элементы клетки собираются вместе, создают группу (или группы) с определенными параметрами, свойственными всей группе как целому образованию. А антифазный синхронизм отделяет друг от друга как отдельные элементы, так и их синфазно синхронизованные группы. Образование *хромосом* происходит благодаря синхронизму между частицами (начиная с уровня неделимых частиц), из которых состоит хроматин – вещество хромосомы. Явлению синхронизма обязано также образование *микротрубочек* в процессе митоза. *Хроматида*, хромосома и микротрубочка, представляют собой осцилляторы (волновые структуры) с различными модальными спектрами. Как известно, ДНК – это единственная саморазмножающаяся молекула в организме, она является, по ЕТ, *автоволной*. Известный распад двойной спирали ДНК на комплементарные половинки при обратимом процессе денатурации и ее восстановления (ренатурация) связан соответственно с десинхронизмом и синхронизмом. Причем, чем больше гены отличаются друг от друга своими колебательными параметрами, тем меньше возможность синхронизма и восстановление двойной спирали.

1. Алифов А.А. Единый закон материи. – М. – Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2010. 328 с.
2. Алифов А.А. Взаимодействия в природе. Единая теория. – М. – Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2008. 472 с.
3. Алифов А.А. Закон движения материи. – М.: Изд-во «ПКЦ Альтекс», 2008. 118 с.
4. Алифов А.А. Колебляющаяся Вселенная. – М.-Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2005. 172 с.
5. Алифов А.А. / Тр. Межд. Конгресса «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине». С.-Петербург, 2009. С.266.
6. Alifov A.A. / Engineering & automation problems, 2010, № 1, p.25-27.
7. Алифов А.А. / В мире научных открытий, 2010, № 4 (10). С.51-53.

**ИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ФОТОСИНТЕЗА В ПЕРФУЗИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ
*CHARA CORALLINA*****Ionic regulation of photosynthesis in the perfused cells of *Chara corallina*****Алова А.В., Булычев А.А.**

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,
119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12
Тел.: +7(495)939-35-03; факс: +7(495)939-11-15; e-mail ava1945@mail.ru

Механизмы внутриклеточной регуляции представляют одну из важных проблем биологии. Ярким примером такой регуляции являются обратимые переходы между однородным и неоднородным распределением фотосинтетической активности и потоков H^+ в клетках харовых водорослей. Природа этого явления во многом еще неясна, но известно, что участки с низкой активностью фотосистемы II (ФС II) лежат в зонах поглощения протонов, где рН на поверхности почти на 3 ед. выше, чем в зонах с активным фотосинтезом. Координацию профилей фотосинтеза и наружного рН объясняют разной доступностью субстрата фотосинтеза – молекул CO_2 при высоких и низких рН среды. Неоднородные профили в апопласте могут контролироваться и другими факторами. Так, генерация потенциала действия (ПД) сглаживает перепады рН в апопласте, но усиливает неоднородность фотосинтеза. По-видимому, важную роль играют многократное возрастание уровня Ca^{2+} в цитоплазме и остановка трансмембранных потоков H^+ во время ПД. В настоящее время отсутствуют данные о том, как влияют изменения концентрации протонов и Ca^{2+} в цитоплазме на флуоресценцию и фотосинтетическую активность хлоропластов. Сочетание метода внутриклеточной перфузии междоузлий и импульсно-модулированной микрофлуориметрии позволяет, изменяя ионный состав внутренней среды, проследить влияние рН и уровня Ca^{2+} в цитоплазме на фотохимическую активность хлоропластов. При перфузии клетки растворами с добавлением ЭГТА происходит разрушение тонопласта, и хлоропласты контактируют непосредственно с экспериментальной средой. Важно, что при этом сохраняется нативное расположение хлоропластов. Было показано, что при перфузии хлоропласты сохраняют высокую функциональную активность (высокий квантовый выход фотореакции ФС II (КВ ФСII) и способность к нефотохимическому тушению (NPQ)). При понижении рН перфузионного раствора от 8.5 до 6.0 квантовая эффективность ФСII снижается, а темновая релаксация NPQ замедляется. Аналогичные изменения происходят на целых клетках при переходе от зон выделения H^+ к зонам поглощения H^+ . Это говорит о том, что рН цитоплазмы повышен в зонах выведения H^+ из клетки и понижен в зонах поступления H^+ . Повышение $[Ca^{2+}]_{цит}$ в интервале 10^{-8} – 10^{-6} М не влияло на КВ ФСII в затененных клетках, но понижало его на свету. Нефотохимическое тушение, наблюдаемое на свету в присутствии Ca^{2+} , исчезает под действием валиномицина, ингибирующего светозависимое накопление Ca^{2+} в пластидах, что подтверждает участие Ca^{2+} в регуляции фотосинтеза.

РОЛЬ РАЗОБЩАЮЩИХ БЕЛКОВ (UCPS) И ДРУГИХ БЕЛКОВ – АНИОННЫХ ПЕРЕНОСЧИКОВ ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ В РЕГУЛЯЦИИ БИОЭНЕРГИТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ТКАНЯХ ГИБЕРНИРУЮЩИХ ЖИВОТНЫХ.

The role of uncoupling proteins (UCPs) and other anion transporting proteins of inner mitochondrial membrane in the regulation of bioenergetic processes in tissues of hibernating animals.

Амерханов. З.Г., Комелина. Н.П., Захарова Н.М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук, 142290, г. Пущино, ул. Институтская, 3.
Тел: 7(095) 925-59-84, факс: (4967) 33-05-09, e-mail: Amerkhanov@mail.ru

Гибернирующие животные являются уникальной моделью для изучения биоэнергетических механизмов терморегуляции. В процессе выхода животных из состояния гибернации наблюдается снижение степени сопряжения окисления и фосфорилирования в препаратах митохондрий из различных тканей. Ранее нами показано, что в этом задействованы механизмы разобщающего действия свободных жирных кислот с участием белков-переносчиков внутренней мембраны митохондрий: ADP/АТР-антипортера и аспартат/глутаматного переносчика [1]. Известно, что в митохондриях бурого жира существует белок, специализированный на выполнении терморегуляторной функции, UCP1.

В настоящее время открыт целый ряд белков-разобщителей (Uncoupling proteins, UCPs), являющихся гомологами разобщающего белка UCP1 из бурой жировой ткани (БЖТ), в митохондриях различных систематических групп эукариот, от простейших до млекопитающих. Во многих тканях человека и животных выявлена экспрессия UCP2, в то время как UCP3 обнаруживается в скелетных мышцах. Показано, что их экспрессия усиливается в тканях животных при гибернации. Большинство авторов связывают функции UCPs с регуляцией общего уровня обмена веществ, несократительным термогенезом, снижением уровня продукции АФК в дыхательной цепи. Предполагается, что супероксид-анион способен индуцировать работу UCPs. При этом GDP предотвращает увеличение протонной проницаемости под действием супероксида.

В связи с открытием UCPs мы в эксперименте, направленном на выявление их активности, для исключения вклада других митохондриальных белков, способных участвовать в транспорте анионов жирных кислот, использовали последовательные добавки специфических ингибиторов. Показано, что ресопрягающий эффект GDP не может служить объективным тестом для выявления функционирования UCPs, и представлены доказательства конкурентного взаимодействия GDP с АНТ. В экспериментах на интактных митохондриях из печени и мышц гибернирующих сусликов было показано отсутствие в них проводимости для ионов хлора, характерной для митохондрий БЖТ, содержащих UCP1. UCPs в печени и скелетных мышцах не участвуют в терморегуляторном разобщении дыхания при пробуждении животных из состояния гибернации, а также в разобщении, активируемом супероксидом и, по-видимому, выполняют другие функции.

Работа выполнена при поддержке гранта по Программе Президиума РАН «Механизмы интеграции молекулярных систем при реализации физиологических функций».

К ВОПРОСУ О МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОМ УЗНАВАНИИ НА БОЛЬШИХ РАССТОЯНИЯХ

On the problem of intermolecular recognition at a distance

Анашкина А.А.¹, Есипова Н.Г.¹, Намиот В.А.²¹ – Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32;² – НИИЯФМ МГУ, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2
Тел.: +7(499)135-13-92; факс: +7(499)135-15-37; e-mail: nastya@eimb.ru

В работе предлагается гипотеза, что специфическое взаимодействие, приводящее к распознаванию определенных сайтов на протяженных макромолекулах, таких как ДНК возможно, если между такими сайтами возникает дальнее действующее взаимодействие, обладающее, в то же самое время, достаточно высокой селективностью. Такой подход модель был теоретически разработан ранее в диссертации [1] в общем виде. В работах [2,3] такая гипотеза была предложена для сворачивания белка. Очевидно, что для того, чтобы такие дальнедействующие взаимодействия в принципе могли бы обеспечить «быстрый» поиск необходимых участков цепей, требуется, чтобы узнающие участки цепочек могли бы достаточно свободно перемещаться друг относительно друга и чтобы эти участки взаимодействовали бы между собой гораздо более эффективно, чем те участки, которые связываться не должны. В предлагаемой работе протяженные молекулы аппроксимируются цепочками зарядов. В приближении, когда характерный размер взаимодействующих между собой участков цепочек существенно меньше характерного расстояния между этими участками выведена в общем виде формула для энергии взаимодействия между двумя цепочками, расположенными параллельно друг другу на расстоянии R , с распределением зарядов $\rho_1(r)$ и $\rho_2(r)$:

$$E = \frac{1}{(2\pi)^2} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\rho_1(\vec{k}) \rho_2^*(\vec{k}) d\vec{k}}{\vec{k}^2} e^{i\vec{k}(\vec{R}_1 - \vec{R}_2)} d\vec{k}$$

где плотность распределения заряда представлена в виде Фурье-образов.

Для проверки гипотезы были искусственно созданы цепочки зарядов, и показано, что в местах комплементарного расположения зарядов на больших расстояниях между цепочками наблюдается глобальный минимум. Также гипотеза была проверена на цепочках зарядов, полученных проекцией зарядов ДНК на спираль, проходящую по центру большой бороздки, и цепочки, полученной проекцией зарядов белка на отрезок прямой, проходящей вдоль ДНК-связывающего участка (на основе структур специфических комплексов белок-ДНК). В этом случае также показано, что на больших расстояниях функция энергии имеет глобальный минимум в местах наблюдаемого связывания ДНК белком. Разработанный подход представляется применимым для предсказания специфических сайтов связывания на ДНК. Также, в сочетании с применением туннельного микроскопа и способа закрепления макромолекул на подложке [4], возможна разработка нехимического метода чтения последовательностей ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного контракта с Министерством образования и науки №П1272, Программы Президиума РАН Молекулярная и клеточная биология и РФФИ (проекты №12-04-01776-а и №12-04-90051-Бел_а).

1. Намиот В.А. Дальнедействующие взаимодействия между макромолекулами в упорядоченных средах. Докт. дисс., Москва, 1984.

2. Намиот В.А., Батыновский А.В. и др. / Биофизика, 2011, Т.56, вып.4, с.594-601.

3. Namiot V.A., Batyanovskii A.V. et al. / Physics Letters A, 2011, V.375, pp.2911–2915.

4. Намиот В.А. / Биофизика, 2009, Т.54, вып.1, с.13-15.

**РЕГУЛЯЦИЯ ТОНУСА АОРТЫ ЯКУТСКОГО СУСЛИКА
ПРИ ВХОДЕ И ВЫХОДЕ ИЗ ЗИМНЕЙ СПЯЧКИ**

Regulation of ground squirrel aortic tone during entrance and awaking from hibernation

Андреева Л.А.

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино. Московская обл., ул.
Институтская, 3
Тел.: 8(4967)739192; факс: 8(4967)330509; e-mail: luandreev@mail.ru

В течение зимней спячки мелких млекопитающих животных скорость кровотока снижается на 90% и быстро (в пределах 2-3 часов) восстанавливается при возвращении к эутермии между баутами спячки. Сведения об изменении тонуса сосудов в ответ на нейрональные и эндотелиальные вазоактивные факторы в этот период малочисленны и противоречивы. Показано, что резистентность периферических сосудов животных во время спячки увеличивается, в основном, из-за повышенной активности симпатической нервной системы, тогда как эндотелийзависимая вазодилатация не изменяется. Целью исследования было изучение роли эндотелия в регуляции тонуса аорты при входе и выходе из спячки в течение гибернации. Исследование выполнено на аорте якутских сусликов обоего пола, взятых в активном состоянии между баутами спячки, при входе в спячку и пробуждении в области температуры тела 10-12 °С и 28-320 °С. Предсокращенные фенилэфрином (ФЭ) 1-5 мкМ кольца аорты подвергали действию кумулятивной концентрации ацетилхолина (АцХ) 10 нМ – 50 мкМ в присутствии и отсутствии ингибитора синтазы оксида азота – L-NAME (100 мкМ). Мы показали, что в период гибернации АцХ вызывает два типа эндотелийзависимых ответов препаратов аорты якутского суслика – релаксирующий в диапазоне 10 нМ – 1 мМ и сократительный (5мМ – 50 мМ). Наименьший релаксирующий эффект АцХ отмечался в группе активных сусликов и не превышал 55%. У входящих в спячку и пробуждающихся сусликов расслабляющий эффект АцХ достигал 70-80% как при низкой, так и высокой температуре тела. В группе активных сусликов L-NAME практически полностью ингибировал релаксирующее действие АцХ. У пробуждающихся сусликов при низкой температуре тела эффект АцХ в присутствии L-NAME составил 40%, тогда как в остальных группах расслабление аорты не превышало 20%. Сократительный ответ на АцХ (50мкМ) был максимальным у активных животных и пробуждающихся при Тт 10-120С, минимальным в группе пробуждающихся сусликов при Тт 28-32 °С. В присутствии L-NAME сократительный ответ аорты на АцХ значительно увеличивался во всех группах, кроме пробуждающихся сусликов при Тт 10-12 °С. Очевидно, что в период гибернации в регуляции тонуса аорты участвуют эндотелийзависимые факторы расслабления (NO) и сокращения (простагландины) и их вклад меняется в зависимости от физиологического состояния суслика.

К ВОПРОСУ ОБ ОРГАНИЗАЦИИ БИОФИЗИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ

On the management of the process of biophysical education

Анисимов А. В.

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111, Казань, а\я 30.
Тел.(843) 231-90-31; факс: (843)292-73-47; e-mail: anisimov@mail.knc.ru

Одна из причин проблем образования сегодняшнего дня любого уровня, начиная со школьного и даже дошкольного, возможно связана с ограниченным числом попыток формализовать понятия образовательного процесса в рамках современных представлений физики, информатики. В большинстве исследований используются эмоциональные чувственные оценки необходимости, целесообразности образования, причем образования усредненного на большие социальные группы людей.

В работе в рамках логически связанной системы объективных физических факторов образовательного процесса и факторов, навязываемых реалиями сегодняшнего дня сделана попытка конкретизировать некоторые условия организации образования с практическими рекомендациями подходящими для сквозной реорганизации образовательного процесса. – школьного, вузовского, профессионального.

Для обоснования предлагаемой схемы используются как известные определения из информатики так и вводятся некоторые новые в частности понятие информативного объема индивидуума, позволяющие формализовать и подвести физическое обоснование под нравственные оценки типа хорошо \плохо и т.п. Применительно к биофизическому образованию предлагается схема оптимальной организации центров коллективного пользования оборудованием (ЦКП).

МЯГКАЯ ПЕРФОРАЦИЯ БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН ПРИ ФАЗОВОМ ПЕРЕХОДЕ ФОСФОЛИПИДОВ $L\alpha - L\beta$.**Soft perforation of lipid bilayer membranes at the lipid phase transition $L\alpha - L\beta$.****Антонов В.Ф., Норик В.П., Смирнова Е.Ю.**Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
Тел.: +7 (499) 367-18-72; e-mail: antonov.valery@gmail.com

При интерпретации электрических явлений в биологических мембранах молчаливо предполагается, что экспериментально наблюдаемые дискретные скачки тока в опытах пэтч-клампа обусловлены особым классом белков, называемых ионные каналы. Основа мембраны- бимолекулярный слой липидов- рассматривается как слой диэлектрика, непосредственно не участвующий в формировании трансмембранных ионных каналов. Однако широкое использование модельных бислойных липидных мембран в виде везикул (липосомы) и плоских бислоев (пБЛМ) привело к обнаружению активного участия липидных молекул в регуляции ионного транспорта без участия белков и пептидов. В 1973 году в опытах на липидных везикулах Папахаджопулос и сотр. [1] впервые установили увеличение проницаемости липидного бислоя для ионов натрия при температурном фазовом переходе мембранного липида. Авторы объяснили этот эффект ростом флуктуаций на границе «жидкое/твердое», что не вызвало большого интереса. Особый интерес в этом отношении вызвало открытие Антоновым и сотр. [2] в опытах на БЛМ из дистеароилфосфатидилхолина скачков тока (quantized currents) при температуре основного фазового перехода. Эти скачки тока были неотличимы от скачков тока белкового каналаоформера грамицидина А. Впервые авторы связали этот эффект с появлением в области фазового перехода липида чисто липидных пор, определили их проводимость и размер.

В докладе анализируются экспериментальные доказательства существования чисто липидных пор, их функциональной роли в мягкой порации (soft perforation) клеточных мембран. Особенности поведения липидных пор при температурном фазовом переходе и химических модификациях обсуждаются с привлечением теории критической поры Дерягина-Гутопа [3]. Влияние электрического поля на процессы рождения липидных пор обсуждается в рамках теории Винтерхальтера-Хельфрича [4].

1. Papahadjopoulos D., Jacobson K., Nir S., and T. Isac, Phase transition in phospholipid vesicles. Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol. Biochim. Biophys. Acta 311, 330 (1973).
2. Antonov V.F., Petrov V.V., Molnar A.A., Predvoditelev D.A., Ivanov A.S. The appearance of single ion channels in unmodified lipid bilayer membrane at the phase transition temperature. Nature 283 585-586(1980).
3. Derjagin B.V. and Y. Gutop, Theory of the breakdown (rupture) of free films. Kolloidn. Zh. 24, 370 (1962).
4. Winterhalter M. and Helfrich W., Effect of voltage on pores in membranes. Phys. Rev. A 36 158101 (1987).

**ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКА LC3-GFP ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТА ПО ИЗМЕРЕНИЮ СИЛЫ,
ГЕНЕРИРУЕМОЙ МИКРОТРУБОЧКОЙ****Creation of LC3-GFP fusion protein for experiment to measure force, generated by
microtubule*****Аржаник В.К.¹, Волков В.А.², Атауллаханов Ф.И.^{2,3,4}***¹ – Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ,
119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73;² – ФГБУН Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН,
119991, Москва, ул. Косыгина 4;³ – ФГБУ Гематологический научный центр МЗСР РФ⁴ – Физический факультет, Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова.

Тел.: +7(919)723-37-34; e-mail: arzhanik_work@mail.ru

В процессе деления клетки необходимо точно и равномерно распределить генетический материал между дочерними клетками. Эта задача решается веретеном деления, главный компонент которого – микротрубочки могут перемещать различные объекты *in vitro* [1].

Генерация силы, которая необходима для работы по перемещению, может происходить при разборке микротрубочки в результате отгибания протофиламентов [2]. В связи с этим представляет интерес измерить силы генерируемые микротрубочкой.

В работе Гришук [3] для измерения такой силы была использована установка «лазерная ловушка», которая удерживает с помощью градиента лазерного света стеклянный шарик и позволяет измерять действующие на него силы с нанометровой точностью. В этой работе использовались биотинилированные микротрубочки и покрытый стрептавидином шарик. Однако измеренные силы оказались малы — в среднем 0.22 пН; авторы предполагают, что в такой системе образуется рычаг и действительная сила должна быть в 20 раз больше.

Для прямого измерения силы можно использовать следующую систему: к стеклянному шарiku прикреплен фрагмент суперспирали длиной 100 нм с GBP (GFP связывающий белок), а к нему присоединен микротрубочка-связывающий белок с GFP через связь GFP-GBP. В такой системе не будет рычагов, но для постановки эксперимента необходима генетическая конструкция связывающего микротрубочки белка, соединенного с GFP. В качестве такого белка был выбран MAP1-LC3 [4].

В результате работы была получена генетическая конструкция LC3-GFP, выделен и охарактеризован соответствующий белок. Показано, что LC3-GFP связывается в основном с пучками микротрубочек. Количество молекул LC3-GFP в 1 мкм длины пучка пропорционально количеству микротрубочек в пучке.

1. Coue M., Lombillo V.A. & McIntosh J.R. / J Cell Biol, 1991. 112, 1165-1175

2. Koshland D.E., Mitchison T.J. & Kirschner M.W. / Nature, 1988. 331, 499-504

3. Grishchuk E.L., Molodtsov M.I., Ataulkhanov F.I. & McIntosh J.R. / Nature, 2005. 438, 384-388

4. Hammarback J.A., Obar R.A., Hughes S.M. & Vallee R.B. / Neuron, 1991. 7, 129-139

СТАБИЛИЗАЦИЯ ТРОПОМИОЗИНА ПУТЕМ ЗАМЕНЫ НЕКАНОНИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЧАСТИ ЕГО МОЛЕКУЛЫ**Stabilization of tropomyosin by replacement of non-canonical amino-acid residues in the central part of its molecule**

Артемова Н.В.¹, Матюшенко А.М.^{1,2}, Случанко Н.Н.¹, Левицкий Д.И.^{1,3}

¹ – Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,
119071, Москва, Ленинский проспект, 33;

² – Кафедра биохимии Биологического факультета МГУ,
119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12;

³ – НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ,
119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

Тел.: +7(495)954-13-00; факс: +7(495)954-27-32; e-mail: ximikk@gmail.com

Ранее в центральной части молекулы тропомиозина (Тм) были выявлены два неканонических остатка, Asp137 и Gly126, нарушающих структуру двойной α -спирали Тм в этой области; при этом было показано, что замены этих остатков на канонические остатки Leu или Arg (мутации D137L и G126R) стабилизируют молекулу Тм, предотвращая ее расщепление трипсином, и оказывают заметное влияние на регуляторные свойства Тм [1,2]. Используя метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), мы сравнили влияние мутаций G126R и D137L на характер тепловой денатурации α -изоформы Тм скелетных мышц, а также исследовали денатурацию Тм, несущего одновременно мутации D137L и G126R. Прежде всего, однако, мы заменили единственный остаток цистеина в молекуле α -Тм (Cys190) на Ala, чтобы избежать образования дисульфидных связей в процессе тепловой денатурации. Эта мутация не оказывала заметного влияния на тепловую денатурацию Тм и, следовательно, Тм С190А мог быть успешно использован для дальнейших исследований. В соответствии с ранее полученными данными [2], Тм С190А/G126R демонстрировал кооперативный тепловой переход при 45°C, энтальпия которого составляла более 60% от общей энтальпии денатурации Тм. В случае Тм С190А/D137L помимо теплового перехода при 45°C на термограмме появлялся переход при 50°C, энтальпия которого составляла почти 50% от общей энтальпии. Самый удивительный эффект наблюдался для Тм С190А/G126R/D137L: в этом случае на термограмме ДСК появлялся новый высокотемпературный пик при 64°C, никогда ранее не наблюдавшийся при исследованиях тепловой денатурации Тм. При исследованиях температурных зависимостей диссоциации комплексов Тм с F-актином, измеряемой по снижению светорассеяния, было показано, что температура полумаксимальной диссоциации комплексов (T_{diss}), составляющая 45°C для Тм С190А, повышается до 51–52°C для Тм С190А/G126R и Тм С190А/D137L и достигает 54°C для тройного мутанта Тм С190А/G126R/D137L. Сделан вывод, что мутация D137L, в отличие от G126R, стабилизирует не только центральную часть молекулы Тм, но и другие ее части, а одновременное введение обеих этих мутаций приводит к еще более сильной стабилизации двойной α -спирали Тм, что заметно отражается на функциональных свойствах Тм.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 12-04-00441) и Программы «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН.

1. Sumida J.P. et al. / *J. Biol. Chem.*, 2008. v. 283, p. 6728–6734.

2. Nevzorov I.A. et al. / *J. Biol. Chem.*, 2011. v.286, p.15766–15772.

**ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ПРОТИВОВИРУСНОЙ
АКТИВНОСТИ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ**

Study of the physic-chemical mechanisms of antiviral activity of polyelectrolytes

Артюшенко С.В., Контаров Н.А., Юминова Н.В.

Научно – исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, РАМН,
Москва, 105064, Малый Казенный пер., д. 5а;
Тел.: +7(495) 674-01-99; e-mail: kontarov@mail.ru

В наших предыдущих исследованиях проведено изучение взаимодействия полиэлектролитов полистиросульфоната со степенью полимеризации 8 (ПСС-8) и полиаллиламина ПАА (молекулярная масса 6 кДа) с вирусами семейства парамиксо- и ортомиксовирусов на примере вируса кори, паротита и гриппа приводящее к снижению их инфекционной активности [1]. Возможным механизмом вирусоингибирующего действия данных соединений является повреждение последними поверхностных антигенных белков парамиксо- и ортомиксовирусов, что было подтверждено методами кругового дихроизма и белковой флуоресценции. Нами также выявлено изменение поверхностного натяжения бислоистой липидной мембраны (БЛМ) из фосфатидилхолина, фосфолипида, входящего в состав всех оболочечных вирусов, в присутствии ПСС-8 и ПАА. Изменение поверхностного натяжения приводит к нарушению адсорбции вирусных белков в БЛМ, а следовательно, и к слиянию вируса с клеткой – мишенью.

1. Артюшенко С.В., Контаров Н.А. и др. / Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2011. №4. С.36-40.

**ПОТЕНЦИАЛО-ЗАВИСИМОСТЬ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФРАКТАЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ
ОДИНОЧНЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ****Single potassium channels fractal characteristics potential dependence****Асташев М.Е., Гриневич А.А.**

ФГБУН Институт биофизики клетки РАН,
142290, Моск. обл., г. Пущино, ул. Институтская, д.3
Тел.: (4967)739-347, e-mail: astashev@yandex.ru

K_V - и K_{Ca} -каналы в клетке изменяют проницаемость клеточной мембраны для ионов K^+ в ответ на изменение трансмембранного потенциала, поэтому их активность сильно зависит от V_m . Ранее методом нормированного размаха и методом бестрендового флуктуационного анализа нами показано что активность исследованных одиночных ионных каналов представляет собой персистентный процесс, т.е. процесс с положительной корреляцией во времени, когда после более длительных времен жизни канала в функционально выделенном состоянии с большей вероятностью следуют также более длительные времена и наоборот, что показано. В данной работе мы исследовали зависимости фрактальных характеристик одиночного канала от потенциала V_m .

Ранее для K_V -канала мы показали методом Хёрста, что при изменении V_m от -30 до 50 мВ H_1 как для $\{\tau_c\}$, так и для $\{\tau_o\}$ не претерпевает существенных изменений. H_1 для $\{\tau_c\}$ варьирует в пределах $0,62 \div 0,65$ ($H_1 = 0,64 \pm 0,05$, $n=9$). H_1 для $\{\tau_o\}$ изменяется в более широких пределах, от 0,58 до 0,66 ($H_1 = 0,61 \pm 0,04$, $n=9$). В целом, это небольшие изменения параметра, они свидетельствуют о том, что параметр H_1 слабо зависит от V_m . Средние значения H_2 , полученные в экспериментах на 4-9 мембранных фрагментах, также слабо изменяются с V_m . H_2 для $\{\tau_c\}$ флуктуируют в пределах $0,8 \div 0,98$ ($H_2 = 0,9 \pm 0,2$, SD, $n=9$), а для $\{\tau_o\}$ – в пределах $0,69 \div 0,88$ ($H_2 = 0,78 \pm 0,15$, SD, $n=9$) (Казаченко и др., 2004).

В экспериментах на клетках Лейдига было показано, что показатель Хёрста не зависит от уровня мембранного потенциала в пределах 20-80 мВ (Varanda, 2000). В этой работе активность канала характеризовалась только одним значением показателя Хёрста, составившим $0,61 \div 0,64$, что близко к величине H_1 , измеряемой в наших экспериментах.

Для K_V -каналов мы обнаружили, что показатель H_0 при изменении V_m изменяется очень слабо, в то время как H_c уменьшается более чем на 0,1 при переходе от -20 мВ к 50 мВ, что довольно существенно. Для K_{Ca} -каналов показатель H_0 при изменении V_m заметно изменяется: увеличивается почти на 0,1 при переходе от -20 до 30 мВ, в то время как зависит от потенциала очень слабо.

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ НЕТИПИЧНЫХ
ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ****Structure-functional organization of atypic opioid peptides****Ахвердиева Г.А.**

Институт физических проблем, Бакинский Государственный Университет,
г. Баку, Азербайджан, ул. З.Халилова 23, AZ-1148,
Тел.: (994-12) 510-18-22; факс: (994-12) 498-33-76; e-mail: hagverdigulnara@gmail.com

Методами молекулярной механики, квантовой химии и молекулярной динамики исследованы важные аспекты структурно-функциональной организации нетипичных опиоидных пептидов: дерморфина, дельторфина I и дельторфина II, киоторфина, геморфинов и их биологически испытанных аналогов. Расчеты показали, что оптимальные структуры первых трех пептидов имеют частично свернутую форму основной цепи, спирализующуюся на N-концевом физиологически активном тетрапептидном участке. Известно, что синтетические аналоги этих пептидов с монозамещениями D-изомера остатка во второй позиции на его L-изомер не активны, синтетические же аналоги, полученные заменой DAla на DArg, проявляют большую активность и пролонгированное действие по сравнению с природными пептидами. Проведенные расчеты показали, что замены первого типа приводят к разрушению регулярной структуры на N-концевом тетрапептидном фрагменте молекул, при заменах же второго типа доминируют структуры, имеющие спиральную форму пептидного скелета указанного участка молекул. Теоретические расчеты киоторфина (Tyr-Arg) и его аналога (Tyr-DArg), проявляющего пролонгированное действие и более устойчивого к воздействию внешней среды, показали, что D-изомеризация аргинина ограничивает конформационные возможности дипептидной молекулы, реализуя лишь структуры, имеющие свернутую форму пептидного скелета молекулы. Расчет молекул, принадлежащих семейству геморфинов, показал, что по сравнению с N- и C-концевыми участками центральный физиологически активный участок Tyr-Pro-Tyr-Thr является конформационно жестким, включающим поворот цепи на сегменте Pro-Tyr. Сопоставление полученных результатов с данными биотестов позволило сделать заключение: 1) ключевую роль в установлении пространственной структуры неклассических опиоидных пептидов играет формирование элементов вторичной структуры на фрагментах, включающих фармакофорные аминокислотные остатки, 2) важным структурным требованием для стабилизации биологически активной структуры молекул является наличие в их аминокислотной последовательности последующим после Tyr либо аминокислотного остатка в D-конфигурации (DAla, DArg), либо остатка, имеющего стерические ограничения (Pro в геморфинах). Именно в таких структурах нетипичных опиоидных молекул связь между Tyr и последующим аминокислотным остатком может быть защищена от расщепляющего действия аминопептидаз, что обеспечивает сильный и продолжительный обезболивающий эффект.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА МОЛЕКУЛ МИОМОДУЛИНОВ**Spatial structure of the myomoduline molecules****Ахмедов Н.А., Аббаслы Р.М., Ахмедова С.Р., Исмаилова Л.И.**

Бакинский Государственный Университет, Институт физических проблем, AZ-1148,
Баку, ул. Ак. 3.Халилова 23, e-mail: Namiq.49@bk.ru

Семейство пептидных молекул миомодулина, найденных в нейронах моллюска *Aplysia*, относится к нейропептидам. Известно, что миомодулины оказывают модулирующее действие на возбудимость нейронов и мембранные токи. С помощью этих нейротрансмиттеров можно представить электро-физиологические свойства сенсорных нейронов. Целью данной работы является исследование пространственных структур молекул миомодулинов F, G, H:

Ser1-Leu2-Asn3-Met4-Leu5-Arg6-Leu7-NH₂ (миомодулин F)

Thr1-Leu2-Ser3-Met4-Leu5-Arg6-Leu7-NH₂ (миомодулин G)

Gly1-Leu2-His3-Met4-Leu5-Arg6-Leu7-NH₂ (миомодулин H).

Исследование пространственной структуры молекул миомодулинов проводилось с помощью метода теоретического конформационного анализа. Расчет выполнялся в рамках механической модели молекул с учетом невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Пространственное строение гептапептидных молекул миомодулинов F, G и H исследовалось фрагментарно. На первом этапе изучены конформационные возможности N-концевых тетрапептидных фрагментов и C-концевого тетрапептидного участка. Затем на основе полученных результатов тетрапептидов была рассчитана пространственная структура всех молекул.

Расчет показал, что пространственная структура молекулы миомодулина F может быть представлена десятью стабильными формами основной цепи, относительная энергия которых попадают в энергетический интервал 0 – 10 ккал/моль. Стабильная форма основной цепи молекулы является BBBBRBR, N-концевой тетрапептидный и C-концевой дипептидный фрагменты находятся в развернутой форме, их отделяют друг от друга остаток Leu5.

Показано, что пространственная структура молекулы миомодулина G представлена десятью стабильными формами основной цепи, относительная энергия которых попадает в энергетический интервал 0 – 7 ккал/моль. Глобальной формой молекулы миомодулина G является BBRBRBR. В этой конформации N-концевой и C-концевой дипептидные фрагменты образуют развернутую форму основной цепи BB и BR, а центральный пентапептидный фрагмент – полусвернутую форму основной цепи BRBRB.

Пространственная структура молекулы миомодулина H представлена десятью стабильными формами основной цепи, относительная энергия которых попадают в энергетический интервал 0 – 13 ккал/моль.

Полученные результаты могут быть использованы при выяснении вопросов биологической активности, для связи функции этих молекул с их структурой и для целенаправленного синтеза аналогов, моделирующих вполне определенные конформации природных молекул.

МАГНИТНАЯ ВОСПРИИМЧИВОСТЬ БИОПОЛИМЕРА МЕЛАНИНА

Static magnetic susceptibility of melanin biopolymer

*Баграев Н.Т.¹, Брилинская Е. С.², Романов В.В.², Панина Л.К.³*¹ – ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 26;² – Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, СПб, ул. Политехническая, 29; Тел.+7(812)552-77-90; e-mail: romanov@phmf.spbstu.ru³ – Санкт-Петербургский государственный университет, СПб, Университетская наб. 7/9,

Меланины – биополимеры, широко распространенные в природе и представляющие собой полиароматические комплексы нерегулярной структуры. В частности, в клеточных стенках грибов весьма распространен ДНН-меланин синтезируемый по пентакетидному пути, который в естественных условиях всегда связан с белками [1]. Способность меланинов тушить свободные радикалы связана с их магнитными характеристиками и коррелирует с вирулентностью грибов [1]. Спектры ЭПР меланинсодержащих грибов демонстрируют слегка асимметричный сигнал с g-фактором, близким к 2,0038 [2]. Однако анализ спектров дает лишь локальные характеристики парамагнитных центров.

Мы представляем результаты экспериментального исследования магнитных свойств меланиновых биополимеров, полученные из измерений статической магнитной восприимчивости методом Фарадея на спектрометре MGD 312 FG. Полевые зависимости магнитной восприимчивости меланинсодержащих образцов измерялись при комнатной температуре во внешнем поле с индукцией до 1.5 Тл. В слабых полях, $B < 0.05$ Тл, проявлялся сильный диамагнетизм, характеризуемый магнитной восприимчивостью $\chi = -(10^{-5} - 10^{-4}) \text{cm}^3/\text{g}$, тогда как в сильных полях доминировал слабый парамагнетизм, обусловленный свободными радикалами.

Полученные зависимости демонстрируют гистерезис, обусловленный персистентными диамагнитными токами, которые текут на периферии областей клеточной стенки грибов. Кроме того, полевая зависимость магнитной восприимчивости демонстрирует эффект “долговременной памяти”, которая возникает вследствие циркуляции токов на протяжении нескольких дней.

Периодические осцилляции магнитной восприимчивости, обнаруженные при изменении внешнего магнитного поля с фиксированным шагом, обусловлены эффектом типа Ааронова-Бома, причем $\Delta B \times S = \Phi_0$, где Φ_0 – квант магнитного потока, S – площадь, замыкающая персистентные диамагнитные токи. Размер области, охватываемой диамагнитными токами, найденный из периода осцилляций, находится в хорошем согласии с характерными размерами кластеров меланинов, выявляемых на поверхности клеток с помощью электронной микроскопии.

В заключение отметим, что наблюдаемая в эксперименте эволюция изучаемой системы представляет собой последовательность термодинамически равновесных состояний, что позволяет провести интерпретацию полученных результатов в рамках формализма равновесной термодинамики.

1. Langerfelder, K., et al./ Fungal Genetics and Biology, 2003.V. 38. P. 143-158.

2. Gorbushina, A.A., et al./ Geomicrobiology Journal, 1993. V.11. P.205-221.

**ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ МЕМБРАН
ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ МОДИФИКАЦИИ АНТИБИОТИКАМИ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ****Change of structurally functional properties of erythrocytic membranes modified by
antibacterial substances of different nature****Баева Е.С., Резван С.Г., Артюхов В.Г.**

Воронежский государственный университет,
394006, г. Воронеж, Университетская пл., 1
Тел.: +7(473)2208981; факс: +7 (473) 220-87-55; e-mail: galaxy1985@mail.ru

С целью изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе взаимодействия антибактериальных препаратов различных классов с биологическими структурами различного уровня организации исследованы структурно-функциональные свойства эритроцитов крови доноров в присутствии антибиотиков.

С помощью метода регистрации кислотных эритрограмм изучено влияние антибиотиков: азитромицин (АМ, $1,34 \cdot 10^{-4}$ моль/л), рокситромицин (РМ, $7,2 \cdot 10^{-5}$ моль/л), кларитромицин (КМ, $1,33 \cdot 10^{-4}$ моль/л), доксициклин (ДЦ, $7,8 \cdot 10^{-5}$ моль/л), клиндамицин (КЦ, $1,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л), ципрофлоксацин (ЦФ, $1,21 \cdot 10^{-4}$ моль/л), офлоксацин (ОФ, $1,1 \cdot 10^{-4}$ моль/л), спарфлоксацин (СФ, $1,02 \cdot 10^{-4}$ моль/л) на величину кислотной резистентности и динамику распада эритроцитов. Показано зависимое от времени снижение длительности латентной фазы гемолиза при добавлении к суспензии эритроцитов ДЦ, АМ, ЦФ (примерно на 100 с) и КМ (на 10 с) относительно контроля. При непосредственном взаимодействии с эритроцитами КЦ и ОФ вызывали сокращение длительности латентной фазы t_{lat} (на 20 с), а РМ и СФ – повышение данного параметра относительно контроля на 15 и 60 с при длительном ($t=60$ мин) взаимодействии с клетками. По степени химической активности, реализуемой в снижении кислотной резистентности эритроцитов, ДЦ и АМ характеризуются как реагенты с наиболее выраженными свойствами гемолитика, вызывающими соответственно повышение параметра ΔK_{max} до 0,4 и 0,8 отн.ед. ЦФ, ОФ и СФ повышали степень структурной модификации эритроцитов, снижая величину ΔK_{max} относительно контроля. На фоне снижения параметра ΔK_{max} ($\approx -0,3$ отн.ед.) для СФ регистрируется максимальное приращение длительности t_{lat} (≈ 80 с), а для ЦФ ($-0,6$ отн.ед.) – наибольшее снижение величины t_{lat} (≈ 105 с) относительно контроля. ЦФ и СФ подавляли развитие гемолитического процесса, что отражено в снижении значения ΔG_{max} на 70 и 55% соответственно.

Полученные результаты позволили заключить, что изученные в опыте антибиотики изменяют степень гидрофобизации мембран как в низко-, так и высокостойких субпопуляциях эритроцитов, вызывая формирование в них структурных повреждений при образовании комплексов «лекарственный препарат – белок».

**КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ЭЛЕКТРОНЕЙТРАЛИЗАЦИИ
БЕЛКОВЫХ МАКРОИОНОВ В ГАЗОВОЙ ФАЗЕ****Балабаев Н. К., Канев И. Л., Глякина А. В., Морозов В. Н.**

Институт Теоретической и Экспериментальной Биофизики РАН,
Пушино, Московская обл.
Институт Математических Проблем Биологии РАН, Пушино, Московская обл.

Наноаэрозоли биологически-активных веществ являются перспективной формой введения в организм лекарств и вакцин, однако перевод в аэрозольную форму сложных молекул, таких как белки, затруднен ввиду их чувствительности к физическим воздействиям, связанным с процессами генерации аэрозолей. Недавно предложена технология генерации аэрозолей нанометровых размеров, основанная на электрораспылении раствора вещества с последующей нейтрализацией получаемого заряженного аэрозоля в газовой фазе облаком противоионов, также генерируемого методом электрораспыления [1]. Для оценки возможного повреждения белковых молекул при данном способе создания наноаэрозолей проведено компьютерное моделирование столкновения белковых макроионов с разными зарядами и разной степенью гидратации в газовой фазе с меньшими противоионами.

Исследование проводили методом молекулярной динамики с использованием программы PUMA. Для оценки интенсивности физического воздействия на молекулу белка кинетическая энергия атомов белка пересчитывалась в аналог температуры. Моделировалось столкновение положительно заряженной молекулы лизоцима яичного белка с неорганическими нитрат и гидроксид-анионами. Показано, что при столкновении противоиона с безводной положительно заряженной глобулой лизоцима выделяется энергия в несколько электрон-вольт, за счет чего происходит локальное нагревание вблизи места удара противоиона о поверхность глобулы до температуры более 1000 K, которое далее рассеивается по всей молекуле белка за 1 – 5 пикосекунд. В том случае, если белковая глобула гидратирована (300 молекул воды), а противоион окружен 10 молекулами воды, картина локального нагрева при соударении меняется: теперь в столкновении участвуют атомы, в основном, гидратной оболочки, а не белковой глобулы, и молекулы воды в области контакта ионов поглощают и диссипируют энергию, что приводит к снижению локального нагревания в 2 раза.

Таким образом, присутствие водной оболочки на ионах способно защитить биологические молекулы от повреждений при газофазной электроннойнейтрализации, участвуя в распределении энергии столкновения ионов. Это делает принципиально возможным использование технологии электрораспыления для создания аэрозолей из лекарств и вакцин.

КАК РАЗЛИЧНЫЕ ФАКТОРЫ ВЛИЯЮТ НА ПРОЦЕСС ОБРАЗОВАНИЯ АМИЛОИДНЫХ АГРЕГАТОВ

How different factors influence the process of amyloid aggregates formation

**Балобанов В.А.¹, Егорова А.Г.¹, Катина Н.С.¹, Васильев В.Д.¹, Мачулин А.В.¹,
Елисеева И.А.¹, Ильина Н.Б.¹, Черткова Р.В.², Долгих Д.А.², Бычкова В.Е.¹**

1 – Институт белка РАН, Пушкино, 142290, Мос. Обл. г. Пушкино, ул. Институтская, 4

2 – Институт биоорганической химии им. акад.

М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН,

117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

тел./факс. +7 (495) 514-02-18; e-mail: uralm62@rambler.ru

Изучение амилоидных фибрилл является актуальной задачей современной биофизики. Они принимают участие, как в нормальных физиологических процессах, так и могут вызывать патологические состояния клеток. Амилоидные фибриллы интересны и с точки зрения синтетической биологии, как возможный носитель структурной функции.

Данная работа посвящена исследованию образования амилоидных фибрилл искусственным белком альбумином. Для получения наиболее полной информации об этом процессе были использованы спектральные (КД в дальней УФ области, рассеяние света и флуоресценция) и микроскопические (ТЭМ, АСМ и флуоресцентная конфокальная микроскопия) методы. Исследование кинетики образования амилоидов альбумином выявило 4 ключевые стадии, каждая из которых была охарактеризована: образование нефибриллярных агрегатов, формирование протофибрилл, созревание фибрилл и объединение их в большие пучки. Было определено влияние внешних факторов, таких как концентрация белка, ионная сила раствора и температура, и внутренних, таких как одиночные замены аминокислот и присоединение белка тиоредоксина. Показано, что увеличение концентрации белка, ионной силы раствора и температуры приводят к увеличению скорости процесса образования амилоидов АВВ. Присоединение тиоредоксина приводит не только к изменению скорости, но и значительно изменяет характер этого процесса. Определение влияния внешних факторов на каждый из этапов образования амилоидных агрегатов позволяет лучше понять этот процесс. Это, в свою очередь, позволит направленным воздействием управлять им для получения необходимых свойств.

Работа поддержана программой МКБ РАН, грантами РФФИ(09-04-01348) и ФАНИ (02.770.11.0295).

КОМПЛЕКСНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ОКСИДА УГЛЕРОДА (II) И УФ-СВЕТА НА FAS-РЕЦЕПТОРЫ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**The combined effects of carbon monoxide and UV-light to Fas-receptors of human blood lymphocytes****Бахметьева О.И., Путинцева О.В., Артюхов В.Г.**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Воронежский государственный университет», 394006, Воронеж, Университетская пл., 1
Тел.: 8 473 2208578; asp-bpf@rambler.ru

Биофизические основы диагностики и состояния больных с острыми отравлениями оксидом углерода (II) имеют особое значение. В последнее время в клиниках широко используется для лечения подобных отравлений метод аутоотрансфузии УФ-облученной крови. Лечебный эффект данного метода связывают с оксигенацией облученной крови, а также со стимуляцией факторов клеточного и гуморального иммунитета. Гибель клеток иммунной системы при действии экстремальных факторов является одной из важнейших проблем современной биофизики и биохимии. На мембранах клеток иммунной системы (лимфоцитах) экспрессируются Fas-рецепторы (CD95), которые являются молекулами, запускающими апоптоз по рецептор-зависимому пути. Целью исследования явилось изучение комплексного воздействия оксида углерода (II) и УФ-света на уровень экспрессии Fas-рецепторов лимфоцитами крови человека. Лимфоциты выделяли из крови доноров путем центрифугирования на градиенте плотности фиколл-урографин ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) и помещали в атмосферу оксида углерода (II). Облучение иммуноцитов проводили светом ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400. Доза облучения составляла 151, 453 и 755 Дж/м². Уровень экспрессии CD95 маркера на поверхности мембран нативных и СО-модифицированных лимфоцитов крови человека (1×10^6 кл/мл) определяли методом проточной цитофлуориметрии. Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью прикладной программы Microsoft Excel 2010. Установлено, что при длительной экспозиции лимфоцитов в атмосфере монооксида углерода (60÷90 мин.) происходит статистически значимое уменьшение количества Fas-молекул на поверхности мембран иммунокомпетентных клеток по сравнению с контролем. Уровень экспрессии CD95 маркеров СО-модифицированных лимфоцитов (60÷90 мин.) крови человека после воздействия УФ-света в дозе 151 Дж/м² не изменялся относительно нативных образцов без облучения. Статистически значимое повышение количества анализируемых молекул было нами обнаружено на поверхности иммуноцитов, подвергшихся СО-инкубации в течение 90 мин. и облучению УФ-светом в дозах 453 и 755 Дж/м². Таким образом, CD95 маркеры становятся более фоточувствительными к влиянию УФ-света (453 и 755 Дж/м²), что выражается в увеличении их количества на поверхности мембраны изучаемых клеток. Известно, что возрастание исследуемого показателя является индикатором программируемой клеточной гибели. Основываясь на полученных результатах, можно предположить, что для проведения сеансов аутоотрансфузии УФ-облученной крови после острых и хронических отравлений угарным газом лучше использовать малую дозу облучения (151 Дж/м²).

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ РАБОТЫ МАШИНЫ ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН, УСТАНОВЛЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ УЛЬТРАКОРОТКИХ НАНОТРУБОК И ДИНАМИНА.**Operating principles of membrane fission machine revealed with extremely short nanotubes and dynamin.**

Башкиров П.В.^{1,2}, Шнырова А.В.^{2,3,4}, Акимов С.А.¹, Фролов В.А.^{2,3,4}.

¹ – Институт физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН, 119991, Москва, Ленинский пр. 31, кор. 4

² – Unidad de Biofísica (Centro Mixto CSIC-UPV/EHU), Leioa 48940, Spain

³ – Departamento de Biochimica y Biología Molecular, Universidad del Pais Vasco, Leioa 48940, Spain

⁴ – Spain; IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, 48011 Bilbao, Spain

⁵ – Московский физико-технический институт (государственный университет), 141700, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский переулок, 9.

ГТФаза динамин – белок, чья функция заключается в делении мембранного перешейка, соединяющего мембранные партменты, в разнообразных клеточных процессах (эндоцитоз, деление клеточных органелл и пр.). Установлено, что для этого динамин полимеризуется на поверхности мембранного перешейка, формируя короткую (несколько десятков нм) структуру, которая осуществляет деление перешейка в результате кооперативного гидролиза ГТФ. Однако до сих пор неясен путь и эффективность превращения химической энергии белковой машины в работу необходимую для локальной перестройки и последующего деления липидного бислоя, так как малый размер структуры деления сильно затрудняет исследование ее активности.

Мы реконструировали механохимическую активность динамина на ультракоротких (несколько сотен нм) липидных нанотрубках (укНТ), вытягиваемых из липидных мембран. С помощью укНТ мы смогли выявить динамику деформирования и деления мембраны одиночными машинами и установить минимальный размер последних (около 20 нм). Нами было показано, что эффективность такой машины определяется двумя факторами: радиусом, до которого динамин сжимает мембранный перешеек в процессе полимеризации на его поверхности, и ориентацией внутримембранных (гидрофобных) участков молекул динамина. Благоприятная для деления ориентация внутримембранных участков достигается только в результате гидролиза ГТФ. Мутантные формы динамина, лишенные возможности частично встраиваться в липидный бислой неспособны осуществлять деление укНТ.

РОЛЬ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ЛИПИД-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В РЕГУЛЯЦИИ УПРУГИХ СВОЙСТВ МЕМБРАНЫ БЕЛКОМ ЭПСИНОМ**The role of specific lipid-protein interactions in the regulation of elastic properties of membrane by epsin**

**Башкиров П.В.^{1,2}, Шнырова А.В.^{2,3,4}, Чекашкина К.В.^{1,5}, Парьева Е.С.^{1,5},
Кузьмин П.И.^{1,2}, Фролов В.А.^{2,3,4}.**

¹ – Институт физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН, 119991, Москва, Ленинский пр. 31, кор. 4

² – Unidad de Biofísica (Centro Mixto CSIC-UPV/EHU), Leioa 48940, Spain

³ – Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad del País Vasco, Leioa 48940, Spain

⁴ – Spain; IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, 48011 Bilbao, Spain

⁵ – Московский физико-технический институт (государственный университет), 141700, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский переулок, 9.

Белок эпсин играет ключевую роль в процессе клатрин-зависимого эндоцитоза. Известно, что ENTH домен этого белка отвечает за создание первоначальной инвагинации эндоплазматической мембраны, которая далее трансформируется в транспортную везикулу. Предполагается, что ENTH домен сорбируется на поверхности и частично встраивается в липидный бислой благодаря специфическому взаимодействию с фосфатидилинозитолом бифосфатом (PIP2) – липидом, обладающим сильным отрицательным зарядом. Однако до сих пор неизвестно, как при этом изменяются физические параметры мембраны.

Для определения эффекта, оказываемого ENTH доменом на упругие свойства липидного бислоя, в данной работе мы использовали мембранные нанотрубки (НТ). НТ вытягивались из бислойных липидных мембран (БЛМ) в растворе электролита, что позволяло нам измерять ионную проводимость люмена НТ. Механические параметры мембраны определялись из анализа вольт-амперной зависимости НТ. Было показано, что ENTH домен неспецифически сорбируется на поверхности отрицательно заряженной мембраны (20% фосфотидилсерина). Такая сорбция приводит к сужению НТ, что связано с уменьшением эффективного модуля изгиба мембраны. Было показано, что падение жесткости мембраны происходит из-за чувствительности домена к кривизне мембраны и его гетерогенного распределения между поверхностью НТ и БЛМ. При наличии фосфатидилинозитола-4,5-бифосфата в мембране эффект, оказываемый ENTH на свойства НТ, был диаметрально противоположным – его добавление приводило к увеличению эффективного модуля изгибной жесткости мембраны НТ и, соответственно, к ее расширению. Таким образом, в данной работе на примере ENTH домена и фосфатидилинозитола мы демонстрируем, что специфические липид-белковые взаимодействия могут быть ключевыми инструментами, используемыми клеткой для поддержания определенной конфигурации своих мембранных структур.

ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ГЛЮКАНТРАНСФЕРАЗЫ КЛЕТочНОЙ СТЕНКИ ДРОЖЖЕЙ *S. CEREVISIAE* BGL2P ФОРМИРОВАТЬ ФИБРИЛЛЫ *IN VITRO***Yeast cell wall *S. cerevisiae* Bgl2p glucantransferase *in vitro* fibrillation ability**

Безсонов Е.Е.¹, Рекстина В.В.¹, Кудряшова И.Б.¹, Довженко М.А.¹, Семисотнов Г.В.², Калебина Т.С.¹

¹ – Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12.

² – Институт белка РАН, 142290 Московская область, г. Пушкино, ул. Институтская, 4. Тел.: +7(495)939-50-75; e-mail: vrexтина@gmail.com

Bgl2p относится к семейству 17 гликозидгидролаз (ЕС 3.2.1.58). Несмотря на более чем 20-летнюю историю изучения, структура молекулы Bgl2p практически не охарактеризована. Изучение структуры Bgl2p необходимо, поскольку он является мажорным белком клеточной поверхности и играет важную роль в создании прочной и устойчивой к внешним воздействиям клеточной стенки (КС). Ранее в нашей лаборатории была продемонстрирована способность Bgl2p, выделенного из КС дрожжей *S. cerevisiae*, формировать фибриллы [1]. В данной работе получены результаты, характеризующие процесс фибриллообразования Bgl2p *in vitro*: особенности морфологии фибрилл, формируемых белком Bgl2p, полученным из КС с использованием различных методов экстракции и при разных значениях pH; данные, демонстрирующие обратимость процесса фибриллообразования; изменение степени экспонированности триптофана в молекуле белка в процессе образования и разборки фибрилл [2]. Будут представлены также данные, полученные с помощью компьютерного моделирования, с применением подходов предсказания трёхмерной структуры Bgl2p, свидетельствующие о том, что N-концевая область этого белка (24-102 аминокислоты), следующая за сигнальной последовательностью, может формировать структуру, аналогичную принообразующему участку белка HET-s (218-289 аминокислоты) клеточной поверхности *Podospora anserina* – единственному амилоиду клеточной поверхности эукариотических микроорганизмов, для которого известна пространственная структура прионного участка в составе фибриллы [3]. Представлен сравнительный анализ полученных результатов и данных по формированию амилоидной формы белка HET-s.

1. Kalebina T.S., Plotnikova T.A., Gorkovskii A.A., Selyakh I.O., Galzitskaya O.V., Bezsonov E.E., Gellissen G., Kulaev I.S. Prion, 2008. V.2(2). P.91-96.

2. Безсонов Е.Е., Калебина Т.С., Горковский А.А., Кудряшова И.Б., Семисотнов Г.В., Кулаев И.С. / Молекулярная биология, 2010. Т.44(3), С.551-554.

3. Wasmer C., Lange A., Van Melckebeke H., Siemer A.B., Riek R., Meier B.H. / Science, 2008. V.319(5869). P.1523-1526.

4. Saupe J.S. / Seminars in Cell & Developmental Biology, 2011. V.22. P.460-468.

**СТРОМУЛО-ПОДОБНЫЕ ВЫПАЧИВАНИЯ МЕМБРАННОЙ ОБОЛОЧКИ ПЛАСТИД
В КЛЕТКАХ КОРНЯ*****Stromules-like protrusions of the membrane environment of plastids in the
root cells******Белова Л.П., Ильина Т.М.***Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН,
420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31

Тел.: +7(843) 231-90-48; Факс: +7(843) 292-73-47; e-mail: velikanov@mail.knc.ru

Известно, что с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии у пластид в живых растительных клетках были обнаружены динамичные тонкие выпячивания мембранной оболочки. Такие динамичные выпячивания – трубочки, имеющие в диаметре 0.35 – 0.85 мкм, из-за предполагаемого заполнения их внутренней полости пластидной стромой, были названы стромулами. Однако функции стромул, равно как и условия, вызывающие появление стромул, до сих пор являются предметом предположений.

Стромулы количественно более распространены в клетках с незелеными пластидами. Однако электронно-микроскопические исследования структуры стромул, подтверждающие представление о двух мембранах в их оболочке, выполнены на зеленых клетках листьев риса или *Arabidopsis*. Возникает вопрос, почему электронно-микроскопические исследования структуры стромул оказались более удачными на зеленом объекте, где из-за меньшего количества стромул вероятность того, что стромула окажется в плоскости ультратонкого среза должна быть ниже, чем в незеленых клетках. Известно также, что внутри пластид содержатся белки, подобные цитоскелетным белкам, которые, в частности, вовлечены в деление хлоропластов. Появились данные о существовании в пластидах соответствующей сети пластоскелета. Требуется ли белки пластоскелета для формирования стромул, неизвестно. Цель настоящего сообщения – представить и обсудить оригинальные результаты визуализации с помощью электронного микроскопа стромуло-подобных выпячиваний мембранной оболочки пластид в клетках корня. Обсуждаются случаи выявления длинного узкого выпячивания наружной мембраны, внутри которого располагалось более короткое выпячивание внутренней мембраны пластидной оболочки, а также рассматривается возможная роль цитоскелета и пластоскелета в формировании, соответственно, “наружного” и “внутреннего” выпячиваний. Представлены доводы в пользу того, что у фотосинтезирующих пластид для обеспечения оттока большого количества фотоассимилятов лидерство в формировании стромул может принадлежать пластоскелету – стромулы полностью заполнены стромой, выпячиваются обе мембраны одновременно. У нефотосинтезирующих пластид может доминировать запрос на ассимиляты со стороны других органоидов клетки, реализуемый цитоскелетом – внутреннее пространство выпячивания наружной мембраны пластидной оболочки заполняется содержимым стромы с отставанием от запроса, или дискретно, или вообще долго не заполняется. Демонстрируется тождество между наружной оболочкой выявленных стромуло-подобных выпячиваний и трубчатymi элементами эндоплазматического ретикулаума.

**ЛИПИДНАЯ ПАЛЬМИТАТ/СА²⁺-ИНДУЦИРОВАННАЯ ПОРА КАК
НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ВЫБРОСА СА²⁺ ИЗ МИТОХОНДРИЙ: ВОЗМОЖНАЯ
РОЛЬ В МЕХАНИЗМЕ ГЛУТАМАТ-ИНДУЦИРОВАННОЙ ДЕГРАДАЦИИ НЕЙРОНОВ**

**The lipid palmitate/Ca²⁺-induced pore as a nonspecific system of Ca²⁺ efflux from
mitochondria: a possible role in glutamate-induced neuron degradation**

**Белослудцев К.Н.¹, Белослудцева Н.В.¹, Трудовишников А.С.¹, Сурин А.М.²,
Пинелис В.Г.³, Ходоров Б.И.², Миронова Г.Д.¹**

¹ – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, 142290, Пущино, Институтская, 3

² – Институт общей патологии и патофизиологии РАМН, 125315, Москва, Балтийская, 8

³ – Научный центр здоровья детей РАМН, 119991,

Москва, Ломоносовский проспект 2/62

Тел: +7(4967)739476; факс: +7(4967)330553; e-mail: bekonik@gmail.com

Продолжительная стимуляция глутаматом NMDA-рецепторов нейронов мозга приводит к драматическим нарушениям Са²⁺ гомеостаза клеток (отсроченной Са²⁺ дисрегуляции (ОКД)) и глубокой митохондриальной деполяризации (МД), завершающихся гибелью нейронов. На сегодняшний день точные молекулярные механизмы этих нарушений до конца не известны. Существует предположение о возможном участии в этих процессах митохондриальной поры, известной как МРТ, однако прямых доказательств участия этой поры в механизме ОКД и МД нет.

Ранее было показано, в митохондриях может происходить образование липидной поры, индуцированной пальмитиновой кислотой и Са²⁺. Было показано, что эта пора нечувствительна к циклоспорину А и другим модуляторам МРТ поры и способна самопроизвольно закрываться. При этом митохондрии способны восстанавливать и в дальнейшем поддерживать мембранный потенциал. Открытие этой липидной поры происходит по механизму хемотропного фазового перехода при образовании комплексов пальмитиновой кислоты и Са²⁺ в мембране и сегрегации этих комплексов в отдельные твердокристаллические мембранные домены. В настоящей работе мы полагаем, что эта пора является неспецифической системой выброса Са²⁺ из митохондрий. Показано, что в при накоплении Са²⁺ в митохондриях, ингибитор Са²⁺ унипортера рутений красный стимулирует выброс иона Са²⁺ из органелл. Ингибиторы Са²⁺-зависимой фосфолипазы А₂ подавляли этот процесс. Добавление пальмитиновой кислоты в этих условиях усиливало выброс Са²⁺ из органелл и вызывало митохондриальное набухание. Все это говорит о том, что при накоплении Са²⁺ в митохондриях происходит активация фосфолипазы А₂, появление свободных жирных кислот (в том числе и пальмитиновой) и открытие короткоживущих липидных пор. Открытие этих пор приводит к выбросу Са²⁺ из митохондрий, однако мембранный потенциал при этом практически не изменяется. Мы полагаем, что такой механизм может лежать в основе глутамат-индуцированной деградации нервных клеток, по крайней мере, на начальных этапах ОКД и МД. На культуре гранулярных нейронов мозжечка было показано, что ингибиторы Са²⁺-зависимой фосфолипазы А₂ отдают наступление отсроченной Са²⁺ дисрегуляции и митохондриальной деполяризации.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации (МК-145.2012.4), РФФИ (12-04-00430-а) и ДПНИТ (4.3010.2011).

**АНАЛИЗ ПРОФИЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ РЕГУЛЯТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ С ДНК И
СТАЦИОНАРНАЯ МОДЕЛЬ ЭЛОНГАЦИОННОГО КОМПЛЕКСА ЭУКАРИОТ****Analysis of transcription-regulators-on-DNA binding profiles and stationary model
of elongation complex****Белостоцкий А.А.**

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова,
119899, г. Москва, Воробьевы горы, кор. А
Тел.: +7(916)5838074, e-mail: alexbel.system@gmail.com

Традиционно в методе ChIP-seq рассматривают только наиболее выраженные, пиковые, данные [1]. В представленной работе рассматривался внепиковый сигнал, трактуемый в достоверных случаях (сравнение с контролем) как профиль связывания белка на ДНК. Понятно, что такое связывание может быть, в частности, *транзитным* связыванием субъединицы белкового комплекса с ДНК, когда белковый комплекс осуществляет перемещение по молекуле ДНК. Такой случай особенно ценен как источник информации о составе динамических комплексов.

В работе также вводилось два вполне естественных предположения: (1) при иммунопреципитации хроматина за каждую субъединицу комплекса в следствие коиммунопреципитации можно «вытянуть» ДНК, связанную любой другой субъединицей (при условии, что она связывает ДНК), что, естественно, и отражается на профиле связывания изучаемой субъединицы с ДНК; (2) метод ChIP-seq не вносит существенные aberrации в связывание белков с ДНК, не приводит к диссоциации и ассоциации комплексов, не стимулирует существенно связывание свободных комплексов и их субъединиц с открытой ДНК (гены, особенно экзоны, некодирующие регуляторные элементы).

Средний уровень внепикового сигнала связывания факторов транскрипции в гене и, особенно, в экзонах, оказался существенно *выше*, чем *вне генов* и *вне экзонов* соответственно (отдельно учитывалась вероятная регуляция). (2) Обнаружена существенная положительная корреляция внепикового сигнала связывания специфических факторов транскрипции и внепикового сигнала РНК полимеразы II, которая сохраняется в гене и, особенно, в экзонах. Эти два эффекта при указанных выше допущениях были интерпретированы как результат связывание факторов транскрипции с РНК полимеразой II в процессе элонгации транскрипции. (3) На основании анализа площадей под пиками в промоторной области и площадей под внутригенными сигналами ChIP-seq (включая также пики) был сделан вывод о возможности нахождения РНК полимеразы II в процессе элонгации в связанном с промотором состоянии.

Введена модель транскрипционного комплекса, в которой РНК полимеразы II в процессе элонгации остается связанной с промоторной областью через факторы транскрипции. ДНК же протягивается через такой комплекс. Такая модель уточняет уже существующую модель стационарных транскрипционных фабрик.

1. Rye M. et al. BMC Biology. 2011, T.9(80).

2. Белостоцкий А. А. Биофизика. 2012. Т. 57, № 2.

РОЛЬ БЕЛОК-БЕЛКОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В СПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ**A role of protein-protein interaction in specific regulation of transcription initiation****Белостоцкий А.А.**

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова,
119899, г. Москва, Воробьевы горы, кор. А
Тел.: +7(916)5838074, e-mail: alexbel.system@gmail.com

Белок-белковое взаимодействие (ББВ) играет ключевую роль в организации белковых комплексов в клетке. Комплексы, регулирующие инициацию транскрипции, не являются исключением. Так можно ли использовать информацию о ББВ для анализа и распознавания регуляторных участков ДНК?

В представленной работе приведен оригинальный алгоритм привлечения данных о ББВ к задачам анализа и распознавания промоторов, энхансеров и сайленсеров, областей контроля локуса, инсуляторов, а также областей, связанных с ядерным белковым матриксом (MAR и SAR). Используется распознавание потенциальных сайтов связывания белков стандартным образом, с помощью матричных моделей мотива [1]. При этом ББВ учитывается как пары и группы взаимодействующих факторов транскрипции (ФТ) в сети ББВ.

В качестве результатов получены некоторые комбинации ФТ, составляющие комплексы, характерные для различных элементов. Однако при всем этом полноценное применение метода оказывается довольно затруднительным. Для большинства рассмотренных регуляторных элементов, как известных, так и потенциальных, т.е. определенных с помощью представленного алгоритма, наличие ББВ между ФТ вовсе не являлось исключительным признаком. Для всех 4-х вариантов наличия/отсутствия ББВ и самого регуляторного элемента в области поиска для большинства ФТ результаты поиска регуляторных элементов получились примерно одинаковые. Заметим, что ББВ из баз данных также проверялись «вручную».

В работе также приведен анализ пересечения участков связывания факторов транскрипции, определенных методом ChIP-seq [2], дающим вполне достоверные данные об участках связывания, что исследовалось отдельно. Оказалось, что наблюдается примерно одинаковое количество пересечений между участками связывания взаимодействующих и не взаимодействующих факторов транскрипции. Причем это верно для участников как плотных, так и неплотных групп взаимодействия в сети.

Также в работе применены данные об определенных взаимодействиях факторов транскрипции с адаптерами, гистон-модифицирующими ферментами и машинами ремоделирования хроматина, что позволяет существенно расширить область анализа, однако для распознавания неинформативно по очевидным причинам.

Исходя из полученных результатов, делается вывод о том, что специфичность регуляции транскрипции достигается не за счет общей специфичности белок-белкового взаимодействия в сети, а другим образом, например с помощью включения разных частей сети белок-белкового взаимодействия за счет специфических посттрансляционных модификаций факторов транскрипции.

[1] Stormo G.D., *Bioinformatics*, 2000. Т.16(1). С.16-23.

[2] Mardis ER. *Nat Methods*, 2007.Т.4(8). С. 613-4.

ДЕЙСТВИЕ МОДУЛЯТОРОВ АТФ-ЗАВИСИМЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ НА ТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ИОНОВ Cd(II)**Action of modulators of ATP-dependent potassium channels on toxic effects of Cd²⁺****Беляева Е.А.¹, Соколова Т.В.¹, Сирош А.А.², Сарис Н.-Э.³**

¹ – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, 194223, Санкт-Петербург, пр. Мориса Тореза, 44;

² – Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, 197022, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 14;

³ – Department of Food and Environmental Sciences, University of Helsinki, FIN-00014 Helsinki, Finland, POB 56 Viikki Biocenter 1

Тел.: +7-911-946-0751; факс: +7-812-552-3012; e-mail: alenab61@mail.ru

В научной литературе практически нет данных о влиянии эффекторов митохондриальных калиевых каналов на жизнеспособность клеток, их метаболизм и митохондриальную функцию, нарушенных под воздействием тяжелых металлов, таких как Cd²⁺, Hg²⁺ и Cu²⁺. Изучение способности модуляторов АТФ-зависимых калиевых каналов, K(ATФ), влиять на цитотоксическое действие ионов тяжелых металлов – мощных индукторов окислительного стресса и неселективной поры митохондрий, играющих ключевую роль при индукции клеточной смерти различного типа, является актуальной фундаментальной научной задачей. На нейрональной клеточной линии крысы (PC12) нами было изучено влияние различных эффекторов K(ATФ) на клеточную выживаемость в присутствии Cd²⁺. В экспериментах использовались различные концентрации как его активаторов – диазоксид (10 и 50 мкМ) и пинацидила (100 мкМ), так и блокаторов – 5-гидроксидекааноата (100 и 300 мкМ) и глибенкламида (1 и 10 мкМ). Было обнаружено, что только диазоксид в тестируемых концентрациях вызывал достоверное снижение смертности клеток при продолжительности инкубации от 3 до 5 часов в присутствии 500 мкМ и 100 мкМ Cd²⁺, соответственно. Этот защитный эффект исчезал при увеличении продолжительности инкубации клеток с металлом до 24 часов. Было проведено влияние эффективных концентраций диазоксид на клеточное дыхание и внутриклеточную продукцию активных форм кислорода, АФК, в отсутствие и в присутствии Cd²⁺. Оказалось, что обе концентрации диазоксид вызывали достоверную стимуляцию внутриклеточной продукции АФК и снижали внутриклеточную генерацию АФК, усиленную Cd²⁺ после 30-минутной и 3-часовой инкубации клеток с металлом. Кроме того, через 3 и 5 часов воздействия 10 мкМ диазоксид стимулировали скорости базального клеточного дыхания и дыхания клеток в состоянии покоя, т.е. в присутствии олигомицина – ингибитора митохондриальной N-АТФ синтетазы (или комплекса V дыхательной цепи митохондрий). При этом данная концентрация диазоксид не влияла достоверно на скорость максимального (т.е. полностью разобщенного) дыхания PC12 клеток. Интересно, что через 24 часа инкубации PC12 клеток в присутствии обеих концентраций диазоксид все изучаемые скорости дыхания клеток были снижены по сравнению с контролем. Представленные данные хорошо согласуются с результатами, полученными нами недавно на другой клеточной линии, асцитной гепатоме AS-30D крысы.

Работа была частично поддержана грантом от Magnus Ehrnrooth Foundation (Сарис Н.-Э.) и грантом РФФИ № 07-04-00722 (Беляева Е.А.).

**КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИГАНДОВ С
НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ****Complex approach to the investigation of ligands interaction with nucleic acids**

**Березняк Е.Г., Гладковская Н.А., Духопельников Е.В., Мирошниченко Е.В.,
Песина Д.А., Хорунжая О.В., Хребтова А.С., Шестопалова А.В.**

Институт радиофизики и электроники им. А.Я.Усикова НАН Украины,
61085, Харьков, ул. Ак.Проскуры, 12

Тел.: +38(057)720-33-37; факс: +38(057) 315-21-05; e-mail: shestop@ire.kharkov.ua

В настоящее время активно обсуждается проблема создания небелковых молекул, способных вызывать желаемый биологический эффект при нековалентном взаимодействии со специфическими сайтами нуклеиновых кислот (НК). Известно, что лиганды, образующие с макромолекулами сходные по структуре комплексы, могут существенно различаться по биологическому действию, которое коррелирует с термодинамикой комплексообразования. Поэтому при направленном синтезе новых биологически активных лигандов необходимо определять и структурные, и энергетические параметры связывания. Для получения таких характеристик нами используется набор экспериментальных и компьютерных методов исследования. Методом спектрофотометрии определяются спектральные характеристики комплексов лигандов с НК и рассчитываются величины констант и мест связывания. Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) является прямым методом получения параметров плавления НК и применяется для исследования влияния лигандов на термодинамическое состояние НК. Разработанная нами методика анализа данных ДСК позволяет также определить параметры связывания лигандов с НК и таким образом получить полное термодинамическое описание системы НК-лиганд. Влияние водного окружения на комплексообразование лигандов с НК оценивается методом КВЧ диэлектрометрии по значениям диэлектрических параметров, изменение которых обусловлено гидратацией молекул. С помощью методов компьютерного моделирования могут быть построены наиболее вероятные молекулярные модели исследуемых систем, в частности, метод молекулярного докинга позволяет определить специфичность связывания лигандов при моделировании структуры комплексов с фрагментами НК различного нуклеотидного состава. Используя такой комплексный подход можно получать детальную информацию о способах связывания и параметрах взаимодействия в системе НК-лиганд при разных экспериментальных условиях и выбирать оптимальные модели связывания с учетом водно-ионного окружения. С помощью данного подхода нами проведено исследование системы ДНК-профлавинов, результаты которого обсуждаются в докладе.

МОДЕЛИРОВАНИЕ КРИВЫХ ТЕПЛОПОГЛОЩЕНИЯ КОМПЛЕКСОВ ДНК-ЛИГАНД ПРИ МУЛЬТИМОДАЛЬНОМ И КОНКУРЕНТНОМ СВЯЗЫВАНИИ**Modeling of heat absorption curves of DNA-ligand complexes at multimodal and competitive binding****Березняк Е.Г., Духопельников Е.В., Хребтова А.С., Шестопалова А.В.**Институт радиофизики и электроники им. А.Я.Усикова НАН Украины,
61085, Харьков, ул. Ак.Проскуры, 12

Тел.: +38(057)720-33-37; факс: +38(057) 315-21-05; e-mail: khrebtova_ann@mail.ru

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) является прямым методом определения тепловых эффектов, сопровождающих конформационные переходы биологических макромолекул и их комплексов. Для полного термодинамического описания системы биополимер-лиганд необходимы как параметры плавления, получаемые непосредственно из ДСК эксперимента, так и параметры связывания, для расчета которых требуется модельное представление процесса плавления. В данной работе предложена модель, учитывающая особенности плавления высокополимерных молекул ДНК, а также мультимодальное и конкурентное связывание лигандов с матрицей.

Кривая теплопоглощения представляет собой зависимость избыточной теплоемкости от температуры, которая может быть выражена через молярные энтальпии переходов и изменения равновесных концентраций компонентов системы. В нашем подходе плавление комплекса биополимер – лиганд рассмотрено как два независимых процесса: отрыв лиганда от нативной матрицы и денатурация биополимера. Макромолекула ДНК представлена как совокупность кооперативных единиц, плавление которых происходит по модели двух состояний. Для связывания лиганда с кооперативной единицей ДНК использована теория химических равновесий с учетом статистического распределения лиганда на одномерной матрице конечной длины. Также учтены температурные зависимости константы и энтальпии связывания. Решение системы уравнений плавления и связывания позволяет рассчитать концентрации всех частиц в растворе и в аналитическом виде выразить кривую теплопоглощения.

Получены теоретические кривые теплопоглощения для систем ДНК-лиганд, в которых происходит образование одного типа комплексов и взаимодействие лиганда с денатурированной ДНК. Рассмотрены системы, в которых лиганд образует два типа комплексов с независимыми и перекрывающимися местами связывания, а также при конкурентном связывании двух лигандов. Исследовано влияние константы, стехиометрии, энтальпии и теплоемкости связывания на форму кривых теплопоглощения комплексов, полученных при различных концентрациях лиганда, и термодинамические параметры плавления. Показано, что выбор модели связывания приводит к существенным отличиям в теоретических кривых теплопоглощения. Полученные теоретические кривые отражают сложный характер плавления комплексов ДНК-лиганд, наблюдаемый в ДСК эксперименте.

**КИНЕТИКА АГРЕГАЦИИ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА,
ИНДУЦИРОВАННОЙ ДИТИОТРЕИТОЛОМ. ИСПЫТАНИЕ АГЕНТОВ, ОБЛАДАЮЩИХ
АНТИАГРЕГАЦИОННОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

**Kinetics of dithiothreitol induced aggregation of bovine serum albumin. Testing of
agents possessing the anti-aggregation activity**

Борзова В.А., Маркосян К.А., Курганов Б.И.

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский пр., 33, стр. 2;
Тел.: +7(495)952-58-86; факс: +7(495)954-27-32; e-mail: koshemysh@mail.ru

Восстановление дисульфидных связей в бычьем сывороточном альбумине (БСА) в присутствии дитиотреитола (ДТТ) сопровождается денатурацией белка и последующей агрегацией денатурированных молекул. Gobbo и др. [1] предложили использовать тест-систему на основе ДТТ-индуцированной агрегации БСА при 45 °С для определения антиагрегационной активности малого белка теплового шока Hsp27. В настоящей работе агрегацию БСА, инициированную добавлением ДТТ (конечная концентрация 46 мМ), изучали методом динамического светорассеяния при 45 °С в 100 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,0. Концентрация БСА составляла 1 мг/мл (0,15 мМ). Начальные участки зависимости интенсивности светорассеяния (I) от времени (t) описывались уравнением: $I = K_{agg}(t - t_0)^2$, где t_0 – длительность лаг-периода и K_{agg} – константа, характеризующая начальную скорость агрегации. Измерения гидродинамического радиуса (R_h) белковых частиц показали, что распределение частиц по размерам остается мономодальным в процессе агрегации, и среднее значение R_h монотонно растет с увеличением времени инкубации. Величина R_h для исходного препарата БСА составляла $4,2 \pm 0,1$ нм. Обсуждаемая агрегационная система может быть использована для количественной оценки антиагрегационной активности молекулярных шаперонов и агентов, обладающих шапероноподобной активностью. Изучено защитное влияние α -кристаллина (представителя семейства малых белков теплового шока) и аргинина на агрегацию БСА, индуцируемую ДТТ. Показано, что зависимости константы K_{agg} от концентрации α -кристаллина и аргинина подчиняются гиперболической зависимости: $K_{agg} = K_{agg,0} / (1 + [L]/K_i)$, где L – агент, проявляющий защитное действие, $K_{agg,0}$ – константа K_{agg} , измеренная в отсутствие агента L , и K_i – константа, характеризующая защитное действие α -кристаллина или аргинина. Величины K_i оценены равными $0,08 \pm 0,01$ мг/мл для α -кристаллина (или $0,0040 \pm 0,0005$ мМ в расчете на мономер α -кристаллина) и 160 ± 10 мМ для аргинина. С ростом концентрации (α -кристаллина или аргинина) наблюдается увеличение параметра t_0 .

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 11-04-00932-а), программы «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России»: Гос. контракт №П1356.

1. Gobbo J., Gaucher-Di-Stasio C., et al. / Calderwood S.K., Prince T.L. (eds.), Molecular Chaperones: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 787, Springer Science-Business Media, LLC, 2011, p. 137-143.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ТАНИНА НА КЛЕТОЧНЫЕ МЕМБРАНЫ**Mechanism of action tannin on the cell membranes*****Борисова М.П.¹, Катаев А.А.², Zamaraeva M.³, Mavlyanov S.⁴***¹ – Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Московская обл. г. Пущино, ул. Институтская, 3² – Институт биофизики клетки РАН,

142290, Московская обл. г. Пущино, ул. Институтская, 3

³ – Department of Biophysics, University of Białystok,
Świerkowa 20B, 15-950, Białystok, Poland⁴ – Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of Uzbekistan,
Abdullaev 83, Tashkent, 100125, Uzbekistan

Тел.: 8 (4967) 739477; +7(4967) 33-05-53; e-mail: mdborisova@iteb.ru

В работах, посвященных механизму действия полифенолов на биологические объекты, утверждается, что этот механизм до сих пор неясен [1]. Во многих работах обсуждается способность танинов и катехинов влиять на физические свойства липидов мембран [2], регулировать клеточный метаболизм [3], взаимодействовать с белками и липидами. Beretta et al [4] представили конформационный анализ, молекулярно-динамический расчет взаимодействия PGG с модельными мембранами. Мы взяли для работы гидролизующий танин Рутан. Препарат показал высокую биологическую активность. Он индуцировал интерферон 512-1024 unit/ml в сравнении с amiksin-control (per oral) 64-128 unit/ml. Противовирусная активность данного агента также высока. В сравнении с Zovirax-control выше в 4-6 раз. Внесение Рутана с одной стороны от мембраны, сформированной из растительного лецитина, изменяло ее проводимость. Нарастание проводимости в KCl происходит сразу после добавления агента, и продолжительное время сохраняет, примерно, этот уровень, хаотично изменяя ток в небольших пределах. Концентрация в 50мкг вызывает постепенное падение сопротивления до уровня сопротивления электродов сравнения и вызывает лизис мембраны. Наличие холестерина в составе мембраны выявляет токовые характеристики, характерные для ионных каналов. Вольтамперные характеристики показывают прямую зависимость проводимости мембраны от концентрации ионов в растворе. При десятикратном градиенте соли в растворе выявляется селективность для хлора (47мВ). Рутан оказался эффективным блокатором хлорной компоненты тока через мембрану клетки пресноводной водоросли *Chara corallina*. Концентрация препарата, вызывающая полумаксимальный эффект для подавления тока составляет $K_{1/2} = 11 \mu\text{g/ml}$

1. Yury S. Tarahovsky. Plant polyphenols in cell-cell interaction and communication. Plant Signaling & Behavior. 2008, T.3, №8; 609-611

2. A.B. Hendrich. Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. Acta Pharm Sinica 2006; 27: 27-40.

3. R.J Williams, J.P Spencer, C. Rice-Evans. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? Free Radic Biol Med 2004; 36; 838-49.

4. Giangiacomo Beretta, Roberto Artali, Enrico Caneva and Roberto Maffei Facino. Conformation of the tridimensional structure of 1,2,3,4,6-pentagalloyl- β -D-glycopyranose (PGG) by H NMR, NOESY and theoretical study and membrane interaction in a simulated phospholipids bilayer: a first insight. Magn. Reson. Chem. 2011, 49, 132-136.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АМИНОГРУПП БЕЛКА С КРАУН-ЭФИРОМ
1МЕТОДАМИ ИК-ФУРЬЕ И ИМПУЛЬСНОЙ ТЕРАГЕРЦОВОЙ СПЕКТРОСКОПИИ****Investigation of the interaction of protein aminogroups with crown-ether using
methods of FTIR and pulsed THz spectroscopies****Бородин А.В.¹, Брандт Н.Н.¹, Ванг К.Дж.², Жао И.², Жанг К.Ч.^{2,4}, Карговский
А.В.¹, Курицын И.И.¹, Луо К.², Манькова А.А.¹, Сакодынская И.К.³, Чикишев А.Ю.¹,
Шкуринов А.П.¹**

¹Физический факультет и Международный лазерный центр, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, 119992, Россия; ²Уханьская национальная лаборатория оптоэлектроники, Хуаджонгский университет науки и технологий, Ухань, 430074, Китай; ³Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, 119992, Россия; ⁴Институт оптики, университет Рочестера, Рочестер, 14627-0186, США
Телефон: 939-11-06; E-mail: mankova@physics.msu.ru

Белки являются важнейшими биологическими объектами, определяющими процессы жизнедеятельности. Известна проблема структура-функция, существенный вклад в решение которой способны обеспечить методы оптической спектроскопии, позволяющие исследовать структуру белковых молекул, а также структурные изменения, связанные с варьированием различных параметров среды и взаимодействием с другими веществами. Функциональная активность многих водорастворимых белков существенно уменьшается в неводных средах; возможны также изменения функционирования. Так, например, в органических растворителях функциональная активность химоотрипсина резко уменьшается, однако добавление молекул краун-эфира (КЭ) приводит к резкому увеличению его активности.

Для исследования биологических объектов наиболее часто применяются методы ИК и КР спектроскопии, однако терагерцовая импульсная спектроскопия позволяет получить дополнительную информацию о способах взаимодействия изучаемых объектов, так как в этом диапазоне расположены как внутри-, так и межмолекулярные колебания. В нашей работе предлагается совместное использование этих спектроскопических методов. Наличие сильной колебательной линии амид I в ИК и КР спектрах белков мешает интерпретации изменений, происходящих с аминокруппами белка при взаимодействии с молекулами КЭ из-за перекрытия соответствующих линий. В связи с этим мы использовали модельное соединение трис(гидроксиэтил)аминометан (трис).

В работе проведены измерения ИК и ТГц спектров протонированного и непротонированного триса, КЭ, комплексов трис-КЭ, а также химоотрипсина и комплексов химоотрипсин-КЭ. Проведен анализ изменений белка, связанных с взаимодействием с молекулами КЭ.

Измерения ТГц спектров химоотрипсина и его комплексов с КЭ показали, что при добавлении молекул КЭ спектры сильно меняются. Эти изменения соответствуют тем, что происходят в спектрах протонированного триса при добавлении молекул КЭ. В спектрах комплексов появляются новые линии, не обнаруженные в спектрах чистых веществ, интенсивность, положение и форма которых сильно зависят от относительных концентраций компонентов. Проведен сравнительный анализ взаимодействия протонированных и непротонированных аминокрупп с КЭ. Взаимодействие поверхностных аминокрупп белка с молекулами КЭ может быть причиной увеличения функциональной активности белка в органических растворителях.

НОВЫЙ СТРУКТУРНЫЙ ПОДКЛАСС И СТРУКТУРНОЕ ДРЕВО (α + β)-БЕЛКОВ**A novel structural subclass and a structural tree of (α + β)-proteins****Бошкова Е.А., Ефимов А.В.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт белка Российской академии наук,
142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д.4.
Тел.: +7(4967)31-84-63; факс: +7(495)514-02-18; e-mail: boshkova.e.a@rambler.ru

В результате анализа Банка белковых структур (PDB) выделен новый структурный подкласс (α + β)-белков. Анализируемые белки (домены) состоят из сильно скрученных β -листов, и одной или нескольких альфа-спиралей, упакованных на вогнутой поверхности β -листа. Таким образом, β -лист служит своеобразной обёрткой для альфа-спирали. В связи с этим, белкам данного подкласса дано название «wгар-белки».

Пространственная структура wгар-белков определяется наличием структурного мотива с уникальной укладкой – сильно скрученной β -шпильки. Сильно скрученная и изогнутая β -шпилька образует в пространстве двойную спираль из β -тяжей. Скрученная шпилька обладает хиральностью: она практически всегда правая, т.е. если смотреть на неё со стороны вогнутой поверхности, то второй тяж по направлению от N- к C-концу располагается справа относительно первого.

Для найденных wгар-белков построено структурное древо. Структурное древо белков – это совокупность всех разрешённых промежуточных и конечных пространственных структур, которые могут быть получены из одной стартовой структуры путём последовательного пристраивания к ней других элементов вторичной структуры в соответствии с набором правил, выведенных из известных принципов структурной организации белков.

В качестве корневого мотива при построении структурного древа для данной группы белков использована сильно скрученная β -шпилька.

При моделировании предпочтение отдано тем путям роста, которые ведут к более быстрому пристраиванию α -спирали, т.к. это резко уменьшает площадь доступной для воды гидрофобной поверхности, характерной для вогнутой стороны сильно скрученных β -шпилек.

Собрана максимально полная база данных белков и белковых доменов, содержащих wгар-белки. Белки отобраны визуалью из банка белковых данных PDB и системы классификации SCOP 1.75. Полученная база данных включает в себя 1242 PDB-файла. Укладки, которые соответствуют известным белкам, отмечены на структурном древе. Построенное структурное древо включает в себя 112 негомологичных белков (белковых доменов), и содержит 67 укладок, заполненных известными белками.

Данная работа поддержана грантом РФФИ № 10-04-00727-а.

ИЗМЕНЕНИЕ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ ОКСИДА АЗОТА

Change of erythrocyte fatty-acid composition under nitrogen oxide

Брагин В.А., Фирстова Н.С. Ревин В.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», Республика Мордовия, г. Саранск, Россия, 430005, Большевикская, 68
Тел.: +7(342)32-45-54; факс: +7(342)32-45-54; e-mail: braginwa@mail.ru

В настоящее время роли NO в регуляции физиологических и патофизиологических процессов, протекающих в липидной фазе мембран клеток крови, уделяется большое внимание исследователей всего мира. В связи с этим, одной из актуальных задач, является изучение влияния оксида азота на липидный матрикс и жирнокислотный состав эритроцитов и его роли в формировании патологий, протекающих в мембране клеток [1,2]. Объектом исследования служили эритроциты периферической крови человека, а также липиды, выделенные из них. Эритроциты получали путем центрифугирования цельной крови при 3000 об/мин. в течение 15 минут. Полученные эритроциты трижды отмывали физиологическим раствором и одну их часть инкубировали с экзогенным донором оксида азота – нитропруссидом натрия ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; $M = 298$) в течение 5, 10 и 20 минут в концентрациях 10^{-3} моль/л, 10^{-4} моль/л при 25°C , а другую – инкубировали без препарата (контроль). Далее проводили экстракцию липидов по методу Блайя и Дайера. Разделение метиловых эфиров жирных кислот проводили на газовом хроматографе Кристалл 5000.1 (Россия) с капиллярной колонкой HP-FFAP 50m 0,32 mm 0,5 μm (США). Использовался программный комплекс "Хроматэк Аналитик" предназначенный для управления, сбора и обработки хроматографической информации компьютером. Действие оксида азота на эритроциты сопровождается изменениями в липидной организации мембран красных клеток крови человека. После инкубации эритроцитов с донором оксида азота – нитропруссидом натрия увеличивается содержание насыщенных и уменьшается уровень полиненасыщенных жирных кислот. Коэффициент насыщенности возрастает в 2,5 – 6 раз в зависимости от концентрации препарата и времени его действия. При помощи методов спектрофотометрического анализа было установлено, что действие оксида азота на эритроциты сопровождается увеличением содержания первичных (диеновых конъюгатов) и вторичных (малонового диальдегида) продуктов перекисного окисления липидов во всех проведенных опытах эксперимента. На основании собственных результатов и данных литературы можно утверждать, что в липидной фазе мембран эритроцитов оксид азота интенсифицирует не только процессы ПОЛ, но и изменяет состав жирных кислот. Таким образом, можно заключить, что при действии NO в липидной фазе мембран эритроцитов активируются не только процессы ПОЛ, но и изменяется коэффициент насыщенности жирных кислот. Возможно, обнаруженные изменения являются одним из показателей возникновения патологического состояния эритроцитарной мембраны.

1. В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая и др. // Бюллетень сибирской медицины. 2006. № 2. С. 62 – 69.
2. Reiter C. D. Superoxide C. D. Reiter, R.-J. Teng, J. S. Beckman // J. Biol. 2000. V. 275. P. 32460 – 32466.

**СТЕРЕОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПЕРЕХОДОВ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ ИЗ
ОДНОГО В-СЛОЯ В ДРУГОЙ В В-БЕЛКАХ****Stereochemical analysis of the polypeptide chain crossovers from one β -sheet
to another in β -proteins****Бражников Е.В., Ефимов А.В.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка Российской академии наук (ИБ РАН), 142290 г. Пушкино, Московской обл., ул. Институтская, 4 тел.; +7(4967)318-440; e-mail: tefg@vega.protres.ru; efimov@protres.ru

Петли в глобулярных белках можно разделить, по крайней мере, на два больших класса: 1) это петли, соединяющие β -тяжи, расположенные в одном слое, например, в β -шпильках и 2) петли, соединяющие β -тяжи из разных слоев (см. обзор [1]). В настоящей работе основное внимание уделено анализу петель, расположенных между слоями, т.е. анализу переходов цепи из одного слоя в другой. На первом этапе мы провели анализ относительно коротких переходов, состоящих не более чем из 5-6 остатков. Из Банка Белковых Данных (PDB) мы отобрали 63 негомологичных белка, в которых были найдены такие переходы. Анализ показал, что большинство коротких переходов имеют конформацию небольших стандартных структур [1] или являются комбинациями из таких структур. Особый интерес представляют углы, под которыми полипептидная цепь «входит» в β -слой и «выходит» из него. Если смотреть вдоль β -тяжа от N- к C-концу, то вектор «входа» цепи отклоняется от перпендикуляра к β -слою всегда влево, а вектор «выхода» – всегда вправо. По-видимому, в этом состоит одна из главных причин того, что суперспирали типа $\beta\alpha\beta$ и $\beta\beta\beta$ в белках практически всегда правые.

1. Efimov A.V. / Prog. Biophys. Molec.Biol., 1993. V.60. P. 201-239.

Работа поддержана грантом РФФИ № 10-04-00727-а.

АКТИВНОСТЬ Na^+ , K^+ -АТФАЗЫ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС КАК ТЕСТ-ОБЪЕКТ ПРИ БИОТЕСТИРОВАНИИ IN VITRO **Na^+ , K^+ -ATPase activity of rat erythrocytes as test-object for bioassay in vitro****Будкевич Р.О., Демченков Е.Л.**

Северо-Кавказский федеральный университет,
355000, Россия, г. Ставрополь, ул. Маршала Жукова, 9
Тел.: +7(8652) 23-39-43; E-mail: budkev@mail.ru

Известна роль Na , K -АТФазы в асимметричном распределении ионов натрия и калия по обе стороны клеточной мембраны клетки. Изменение активности данного фермента в эритроцитах зависит от большого числа факторов: от устойчивости животного к стрессу [2] до действия ионов кадмия [3]. Это позволяет изучить изменение активности Na , K -АТФазы эритроцитов как тест-объекта при биотестировании in vitro.

Использована кровь белых крыс (Вистар). Определяли активность Na , K -АТФазы в цельных эритроцитах крысы как описано ранее [1]. Оценивали активность фермента in vitro при действии слабых магнитных полей в зависимости от устойчивости животных к стрессу и при действии сиропов лактулозы. Данные обрабатывались параметрическими и непараметрическими методами с использованием пакета «STATISTICA 6.0».

У животных с высокой устойчивостью к стрессу средняя активность фермента была на 40% выше; выявлялась положительная корреляция между данными показателями ($r=0,73$). Действие слабого магнитного поля на эритроциты выявило изменение активности изучаемого фермента эритроцитов в зависимости от устойчивости животного к стрессу. У «устойчивых» крыс реакция Na , K -АТФазы была не однородной, однако средние значения в группе были снижены. У животных с низкой устойчивостью к стрессу, действие магнитного поля на эритроциты приводило к повышению активности фермента в среднем на 30%. Корреляционный анализ между устойчивостью к стрессу и активностью Na , K -АТФазы показал, что после воздействия магнитного поля зависимость стала отрицательной ($r=-0,9$). Инкубации эритроцитов с лактулозой изменяла активность изучаемого фермента, что зависело от производителя использованного образца лактулозы. Образцы очищенной лактулозы вызывали повышение «шероховатости» мембраны по данным атомно-силовой микроскопии и снижение активность Na / K -АТФазы. Действие концентрата пищевой лактулозы (ТУ ВУ 100377914.512-2008 Беларусь) приводило к минимальной «шероховатости» мембраны, а так же минимальному снижению активности фермента.

Таким образом, показана широкая изменчивость активности Na , K -АТФазы эритроцитов крыс при действии различных факторов. Выявленные особенности могут использоваться при биотестировании.

1. Казеннов А.М., Маслова М.Н., Шалабодов А.Д. / Биохимия, 1984, №7, с. 1089–1094.
2. Маслова М.Н. /Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 2005, №11, с. 1320–1328.
3. Lijnen P, Staessen J, Fagard R, Amery A. /British Journal of Industrial Medicine 1991;48:392-398.

ПЕРЕНОС ФОТОИНДУЦИРОВАННЫХ СИГНАЛОВ С ПОТОКОМ ЦИТОПЛАЗМЫ И ВОЗНИКНОВЕНИЕ ПОЛЯРНОСТИ В КЛЕТКАХ ХАРОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ**Transmission of photoinduced signals with the streaming cytoplasm and emergence of polarity in charophyte cells****Булычев А.А.**Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,
119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

Тел.: +7(495) 939-35-03, факс: +7(495) 939-11-15; e-mail: bulychev@biophys.msu.ru

Интернодальные клетки *Chara corallina* представляют уникальную модельную систему для изучения взаимодействий между фотосинтезом, мембранным возбуждением и движением цитоплазмы, а также для выяснения роли этих процессов в генерации и регуляции функционально неоднородных пространственных структур в клетках и тканях зеленых растений [1]. Сочетание метода насыщающих импульсов и микрофлуориметрии позволило установить, что приток цитоплазмы в зону наблюдения из затененных участков клетки стимулирует фотосинтетическую активность хлоропластов, освещаемых светом умеренной интенсивности. И наоборот, приток цитоплазмы из ярко освещенных участков в зону умеренного освещения понижает фотосинтетическую активность, что проявляется в усилении нефотохимического тушения флуоресценции. Направленный поток "облученной" цитоплазмы вызывает появление функциональной асимметрии вокруг светового пятна (формирование полярности) как в слое хлоропластов, так и на уровне плазматической мембраны. Показано, что перенос сигнала между освещенными и затененными частями клетки осуществляется со скоростью движения цитоплазмы. Распространяющийся сигнал, вызываемый удаленным фотостимулом постоянной интенсивности, приводит к последовательному ослаблению и усилению энергозависимого нефотохимического тушения в зоне измерения, однако любая из этих стадий может доминировать в зависимости от освещенности всей клетки. Наличие пороговой интенсивности, вызывающей переключение ответной реакции "слабого света" (возрастание F_m') к изменениям F_m' противоположного знака говорит о том, что даже небольшие различия в освещенности слоя хлоропластов, обусловленные строением междоузлий, могут оказаться достаточными для формирования неоднородного профиля фотосинтетической активности под влиянием сигнала, передаваемого вдоль клетки с потоком цитоплазмы. Влияние мембранного возбуждения на фотосинтез и транспорт H^+ проявляется по-разному в зонах выделения и поглощения протонов и опосредовано различными механизмами в физиологических условиях и в присутствии некоторых гидрофильных редокс-активных соединений. Влияние потенциала действия на флуоресценцию хлорофилла в условиях локального освещения по-видимому вызвано активацией Ca^{2+} -зависимых сигнальных путей, а также торможением обмена метаболитов между затененными и освещенными частями клетки вследствие остановки движения цитоплазмы.

3D-РЕКОНСТРУКЦИЯ БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В МОЗГУ МЫШИ**3-D reconstruction of biodistribution of fluorescent nanoparticles in mouse brain**

Бушук Б.А.¹, Бушук С.Б.¹, Недзведь А.М.², Терпинская Т.И.³, Ивановская Н.П.⁴, Турчин И.В.⁵, Ширманова М.В.⁶, Дарашкевич Л.О.⁷, Дарашкевич О.Н.⁸

1.-Институт физики НАН Б, 220072, пр. Независимости, 68. Минск, Беларусь;
2.-Объединенный институт проблем информатики НАН Б, 220012, ул. Сурганова, 6, Минск, Беларусь; 3.-Институт физиологии НАН Б, 220077, ул.Академическая 28, Минск, Беларусь; 4.-ГосНИИ биологического приборостроения, Волоколамское шоссе, 75, к.1 Москва; 5.- Институт прикладной физики РАН, 603950, ул.Ульянова, 46, Нижний Новгород; 6.-Нижегородская государственная медицинская академия, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1, Нижний Новгород; 7.-ГУО СШ№33, 220088, ул. Антоновская 20, Минск, Беларусь; 8.-ООО «АстраЦЭА», 220027, ул.Старовиленская 131/3, Минск, Беларусь
Тел:+375-299-590-020; e-mail:odarash@yahoo.com

Недавно обнаружен интересный феномен биораспределения полимерных наночастиц в органах и тканях экспериментальных животных после внутрибрюшинного введения (1). Однако наиболее интригующим оказался факт избирательного накопления наночастиц в различных структурах мозга, причем интенсивность накопления наночастиц в мозге была пропорциональна скорости роста опухоли аденокарциномы Эрлиха, находящейся на бедре животного.

Для детального изучения этого факта нами предложен алгоритм экспериментально-го исследования, состоящий из протоколов введения наночастиц, фиксации и резки ткани мозга, флуоресцентного имиджинга целого мозга, флуоресцентной микроскопии срезов и компьютерной 3D реконструкции распределения наночастиц.

В эксперименте на двух контрольных группах (без введения наночастиц и без опухоли) и четырех опытных группах (частицы вводили внутрибрюшинно на разных сроках роста опухоли) исследовали распределение наночастиц, содержащих флуоресцентные красители флуоресцеин, платина-копропорфирин и яндоцианиновый зеленый (кардио-грин). После эвтаназии мышей путем декапитации под наркозом ткань мозга фиксировали в 10% забуференном формалине, затем проводили в дегидратирующих растворителях и заливали в парафиновые блоки. Флуоресцентный имиджинг парафиновых блоков и гистологических срезов проводили на установках ИПФ РАН (Россия), Диагем (Россия), IVIS-Spectrum (США) и LI-COR (США), а также на лазерном сканирующем микроскопе Zeiss LSM 510 NLO (Германия) при различных режимах возбуждения и регистрации флуоресценции, оптимально подобранных для каждого из использованных красителей.

Результатом такого комплексного исследования явилось получение удобных для количественной обработки компьютерных моделей для каждого животного в исследуемых контрольных и экспериментальных группах с перевитыми опухолями.

Работа выполнена при финансовой поддержке фирмы Eiger Health Partners LLC(США) и ООО «АстраЦЭА»(Беларусь)

1. Дарашкевич Л.О., Боровская О.С и др. В сб. «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье.» Тезисы XV всерос. мед-биол. конференции молодых исследователей (с международным участием). – СПб 2012. Т. XV. С. 88-89

ВКЛЮЧЕНИЕ 2-[¹⁴C]-АЦЕТАТА В ЛИПИДЫ НЕОКОРТЕКСА ГИБЕРНИРУЮЩЕГО СУСЛИКА *S. UNDULATUS*.**Incorporation [2-¹⁴C]Acetate in neocortex lipids of hibernating Yakutian ground squirrel *S. undulatus*.****Быкова О.В., Маркевич Л.Н., Коломийцева И.К.**

Федеративное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук (ИБК РАН),
142290, Московская обл., г.Пушино, ул.Институтская, 3.
Тел.: +7(4697)73-93-26; e-mail: lelechek@list.ru

Гибернация – зимняя спячка млекопитающих, под которой понимают состояние резко пониженной жизнедеятельности животного. Гибернация является результатом адаптации млекопитающих к неблагоприятным факторам окружающей среды (холод, сокращение светлого периода суток, отсутствие пищи). При этом главным регулирующим органом гибернации млекопитающих является мозг. Представляло интерес исследовать метаболизм липидов коры головного мозга суслика *S. undulatus* в период гибернации в активном состоянии и при оцепенении. Исследовали количество и активность синтеза фосфолипидов и нейтральных липидов в гомогенате неокортекса сусликов в зимний период. Количество липидов определяли методом ТСХ. Активность синтеза определяли по включению 2-[¹⁴C]-ацетата при инкубации гомогената неокортекса в течение 30 минут, при температуре среды 37°C. 2-[¹⁴C]-ацетат является прямым предшественником синтеза холестерина и жирных кислот. В фосфолипиды меченый ацетат включается путем ацилирования и переацилирования жирнокислотных цепей фосфолипидов. Забор материала проводили у спящих животных при температуре тела 4°C и у активных при температуре тела 37°C.

По нашим данным, количество индивидуальных фосфолипидов, холестерина и свободных жирных кислот в неокортексе сусликов в спящем и активном состоянии не отличалось. Исследование включения 2-¹⁴C-ацетата показало, что радиоактивность общей фракции липидов и общей фракции фосфолипидов значительно увеличена у спящих сусликов по сравнению с активными зимними животными. Активация включения метки различна у индивидуальных липидов: в неокортексе спящих животных интенсивность включения метки увеличивалась в сфингомиелин на 20%, в фосфатидилсерин на 64% и моноацилглицериды на 128%. Следует отметить, что в изменениях липидного обмена в основном участвуют минорные, сигнальные липиды: сфингомиелин и фосфатидилсерин, а также моноацилглицериды. Моноглицерид 2-арахидонилглицерид составляет основную часть всех моноглицеридов в мозге и является эндогенным каннабиноидом, участвуя в процессах обучения, памяти, локомоции и в нейродегенеративных процессах. Активация ацилирования моноглицеридов, возможно, связана в их участием в регуляции гипобюоза. Из анализа результатов следует, что в неокортексе гиберирующих сусликов в состоянии оцепенения метаболические пути жирных кислот и глицеридов активированы. Таким образом, в ходе баута гибернации затронут метаболизм как фосфолипидов, так и нейтральных липидов неокортекса.

Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-00993-а, 2009-2011 гг.

**КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ
АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ КРЫС ПРИ
ГИПОТЕРМИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ**

**Kinetic characteristics and thermo stability of acetylcholinesterase in rats blood
erythrocytes membranes at hypothermic states**

Багабова З.С., Кличханов Н.К., Мейланов И.С.

Дагестанский государственный университет. Махачкала. М.Гаджиева, 43а.
Телефон (8722) 678563, e-mail: meylanovis@mail.ru

Ацетилхолинэстераза (АХЭ) – фермент гидролизующий ацетилхолин с образованием холина и ацетата. В организме млекопитающего АХЭ экспрессируется в мозге, где участвует в холинэргической синаптической передаче, и в крови, где она локализована на внешней стороне плазматической мемbrane эритроцитов. Функция АХЭ эритроцитов не известна. В мозге АХЭ представлена тетрамером идентичных субъединиц, а в эритроцитах димером. Нами ранее исследованы кинетические характеристики и термостабильность АХЭ синаптических мембран из мозга крыс при различных гипотермических состояниях [1]. В настоящей работе эти же характеристики исследованы у АХЭ эритроцитов. В работе использованы самцы беспородных белых крыс весом 180-240 г. После осмотического шока мембраны эритроцитов выделяли центрифугированием. Этот материал использовали для определения активности АХЭ при разных концентрациях субстрата (ацетилтиохолин). Затем методом наименьших квадратов находили коэффициенты уравнения Холдейна $V=V_m \cdot [S]/(K_m + [S] + [S]^2/K_i)$, которое соответствует субстратному ингибированию с одним ингибиторным местом связывания. Гипотермию вызывали в специальной камере, в «рубашке» которой циркулировала холодная вода. Температура тела измерялась в прямой кишке. Гипотермия 30°C пролонгированная в течение 30 минут приводит к увеличению V_m (максимальная скорость) и K_m (константа Михаэлиса), K_i (константа субстратного ингибирования) при этом уменьшалась. Гипотермия 30°C пролонгированная в течение 3 часов приводит к изменениям этих параметров так, что они становятся близки к контрольным. Углубление гипотермии до 20°C существенно не повлияло на кинетические характеристики АХЭ. Исследована также термостабильность АХЭ. Инкубировали фермент при 40, 43, 46 и 49°C и измеряли активность в течение 50 минут. Кинетические кривые хорошо описываются уравнением из двух экспонент $A=a \cdot \exp(K_1 t) + b \cdot \exp(K_2 t)$, где коэффициенты перед экспонентами представляют долю быстрой и медленной стадий термоденатурации, K_1 , K_2 – константы скорости денатурации первой и второй стадий, A – активность фермента, t – время инкубации. Из температурных зависимостей констант скорости денатурации находили энергии активации первой и второй стадий. В контроле доля быстрой стадии мала, $b=0.842$ (энергии активации обеих стадий практически одинаковы). При гипотермии 30°C $b=0.632$, энергия активации быстрой стадии меньше чем второй (22 и 93 кДж/моль соответственно). При гипотермии 20°C $b=0.516$, энергии активации 92 и 138 кДж/моль соответственно. Таким образом, гипотермия приводит к увеличению доли быстрой компоненты в кинетике термоденатурации АХЭ мембран эритроцитов крыс. Энергия активации быстрой компоненты меньше чем у второй стадии.

ВЛИЯНИЕ АЛКИЛОКСИБЕНЗОЛОВ НА СТРУКТУРУ И КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ**Alkylhydroxybenzenes influence on the structure and activity of serine proteases****Валиуллина Ю.А., Захарченко Н.Л., Ермакова Е.А., Зуев Ю.Ф.**ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН,
420111, г. Казань, а/я 30

Тел.+7(843)292-62-88; факс. +7(843)292-73-47; e-mail: valiullina@mail.knc.ru

В последнее время большое внимание уделяется изучению роли 'малых' молекул с регуляторными функциями. Одними из таких низкомолекулярных молекул являются алкилоксибензолы (АОБ), которые обладают ауторегуляторными функциями и оказывают протекторное действие в защите клеток бактерий и дрожжей от температурного шока, окислительного стресса, а также клеток млекопитающих – от химических и биологических токсикантов.

В работе исследовано модифицирующее действие АОБ на структуру и каталитическую активность двух сериновых протеаз: трипсина и α -химотрипсина. В качестве модифицирующих добавок использованы гомологи АОБ (С7-, С12- и С18-АОБ), различающиеся длиной алкильной цепи.

Каталитическую активность ферментов контролировали по реакции гидролиза специфических субстратов в присутствии различных концентраций АОБ. Методом молекулярного докинга определяли наиболее вероятные комплексы ферментов с АОБ. Изменение структурного состояния ферментов под действием АОБ контролировали методом флуоресценции триптофановых остатков.

Показано, что в зависимости от строения и концентрации АОБ может наблюдаться как ингибирование, так и активация действия ферментов. Определены кинетические параметры исследуемых реакций. Анализ спектров триптофановой флуоресценции белков показал, что изменение ферментативной активности не связано с нарушением структуры ферментов при взаимодействии с АОБ. Методом молекулярного докинга определено, что наиболее энергетически выгодные комплексы белков с АОБ образуются с участием аминокислотных остатков активного центра ферментов. Наличие молекул АОБ в активном центре фермента препятствует образованию фермент-субстратного комплекса и снижает эффективность каталитической реакции. В то же время, в случае трипсина, образование комплексов с АОБ увеличивает термостабильность белка.

**ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРУКТУРА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА
МОЛЕКУЛЫ BLAST 1****Велиева Л.И.**

Бакинский Государственный Университет
AZ 1148, Азербайджан, Баку, ул.3.Халилова 23, Тел: +994 12 438 72 17 (рабочий)
Lala_Veliyeva@rambler.ru

Молекула BLAST 1 входит в состав семейства аллостатинов, которые обладают уникальной способностью регулировать процессы синтеза и выделения ювенильных гормонов у различных видов насекомых. В работе методами теоретического моделирования детально исследована структура и конформационные свойства этой молекулы, содержащего в своей первичной структуре шесть аминокислотных остатков: Leu1-Tyr2-Asp3-Phe4-Gly5-Leu6-NH2.

Низкоэнергетические конформационные состояния BLAST 1 были установлены путем минимизации полной конформационной энергии в силовом поле атом-атомных потенциальных функций. При расчете энергии учитывались невалентные ($E_{нев}$) и электростатические ($E_{эл}$) взаимодействия атомов, водородные связи ($E_{вод}$) и торсионные вклады ($E_{торс}$). Для изучения конформационной подвижности BLAST 1 был использован метод молекулярной динамики. При проведении расчетов использовалась демонстрационная версия программы Hyper.chem, доступная на сайте Hypercube (<http://www.hyper.com/>).

Начальные структурные варианты для расчета стабильных конформаций составлялись с учетом различных положений боковых цепей аминокислотных остатков таким образом, чтобы учесть максимальное количество стабилизирующих структуру межостаточных взаимодействий. В методе молекулярной динамики молекула BLAST 1, окруженная 117 молекулами воды, с учетом периодических граничных условий, помещалась в гипотетический ящик с размерами 17.09Åx10.64x19.47Å.

Согласно результатам исследования, в интервал с относительной энергией 0-10 ккал/моль попадает 59 конформаций, полная энергия которых варьирует в пределах значений от -5,85 до -13,99 ккал/моль. Конформационное состояние с минимальным значением энергии, равным -13.99 ккал/моль, является наиболее предпочтительным по вкладу как невалентных, так и торсионных взаимодействий. Все низкоэнергетические состояния молекулы сохраняют свернутый характер пептидной цепи до и после оптимизации. Расстояние между C^α-атомами остатков первого и пятого остатков варьирует в пределах 4.8-6.3 Å, а водородная связь между CO и NH-группами пептидной цепи не разрушается в процессе молекулярной динамики.

Полученные данные позволяют заключить, что нейропептид BLAST 1 содержит устойчивые элементы пространственной структуры, которые могут быть ответственны за формирование конформаций, необходимых для связывания с рецепторами аллостатинов. Результаты могут быть полезны при исследовании механизма действия аллостатинов и создании новых, более эффективных аналогов нейропептидов этого семейства.

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ МЕМБРАННЫЕ КОНТАКТНЫЕ САЙТЫ**An endocellular membrane contact sites****Великанов Г.А.**

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН,
420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31
Тел.: +7(843) 231-90-48; Факс: +7(843) 292-73-47; e-mail: velikanov@mail.knc.ru

Изучали особенности ограниченной диффузии молекул воды в корнях проростков кукурузы (в направлении, параллельном радиальному сечению корня) методом спинного эха ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля. Было установлено, что часть молекул воды, исходно локализованных в центральных вакуолях клеток, могла свободно продиффундировать в вакуоли соседних клеток, не покидая вакуолярную (медленно релаксирующую) ЯМР-фазу. Другими словами: между центральными вакуолями клеток существует какое-то русло (канал) для свободной диффузии. Этот результат можно легко объяснить, если допустить, что между центральной вакуолью и внутритропостным пространством эндоплазматического ретикулума существует какой-то канал для свободной диффузии. В дальнейших исследованиях нами было обнаружено, что канал выявляемой межвакуолярной связи блокировался ингибиторами синтеза белков, что предопределяло его белковую природу. Более того, была выявлена полная качественная аналогия данных по регуляции межвакуолярной связи, выявляемой методом ЯМР (её зависимости от других процессов клеточного метаболизма) с данными по регуляции межклеточных щелевых контактов (gap junction) у животных. В условиях ограничения ротационной подвижности цитоплазмы и стандартной химической фиксации препаратов для электронной микроскопии мы обнаружили наличие ультраструктурных аналогов gap junction внутри клеток у растений. В последние годы применением щадящей методики высокоскоростного замораживания-скальвания препаратов при высоком давлении и в нормальных условиях надежно показано существование множественных мембранных контактных сайтов (MCSs) эндоплазматического ретикулума (ЭР) практически со всеми другими мембранами внутри как животных, так и растительных клеток. Ведутся активные исследования функций MCSs. Полученные нами данные в совокупности с обзорным анализом литературы [1] открывают перспективу изучения MCSs в качестве устройств, превращающих ЭР в транспортно-распределительный конвейер для липидов, ионов и любых небольших молекул между органеллами клетки, а ионами и небольшими молекулами, возможно, и между клеткой и интерстициальной средой (за счет контактов ЭР-плазмалемма).

ИЗУЧЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ И ТРАНСПОРТА КАЛИЯ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫС С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К СТРЕССУ**Study of oxidative phosphorylation and potassium transport in rat liver mitochondria with varying resistance to stress****Венедиктова Н.И.¹, Горбачева О.С.¹, Шигаева М.И.¹, Белова С.П.¹, Лукьянова Л.Д.³, Миронова Г.Д.^{1,2}.**

¹ – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3; ² – Пушкинский Государственный естественно-научный институт, 142290, Пушкино Московской области, просп. Науки, д.3;

³ – НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8
Тел.: 8(4967)739329; факс:8(4967)330553; e-mail: office@iteb.ru

Известно, что разные люди, а также животные в пределах одного вида обладают различной устойчивостью к стрессорным повреждениям. Можно полагать, что эти различия в значительной мере определяются генетически обусловленными или приобретенными в течение жизни различиями в активности стресс-системы, реализующей реакцию организма на стрессор. Было установлено, что в защите стрессорных нарушений сердечно-сосудистой системы (инфаркт миокарда, ишемия/реперфузия), а также в регуляции окислительного стресса ключевую роль играет митохондриальный АТФ-зависимый калиевый канал (митокАТФ) [1]. Исследований, позволяющих понять механизмы устойчивости к стрессу у животных разных генетических линий, очень мало. В связи с этим в данной работе у крыс двух линий Август и Вистар, обладающих различной резистентностью к стрессорным повреждениям системы кровообращения и гипоксии [2], исследовали параметры дыхания и транспорта калия в митохондриях печени. Функциональное состояние митохондрий (МХ) печени крыс двух линий оценивали по скорости дыхания, используя НАД-зависимые субстраты и сукцинат. Проведенные эксперименты показали, что скорости дыхания, коэффициент окислительного фосфорилирования МХ печени крыс линии Август были выше, чем эти же показатели у крыс Вистар. Коэффициент дыхательного контроля был стабильным и не отличался у двух групп животных во время исследования. В работе было обнаружено, что скорости транспорта калия в МХ и сопряженная с этим процессом работа митокАТФ различаются у крыс Август и Вистар. Скорость набухания МХ (вход К⁺) у крыс линии Август оказалась на 35% выше по сравнению с животными линии Вистар. Сходные данные были получены и на модели индуцированного денитрофенолом (ДНФ) выхода К⁺ из МХ. Скорость ДНФ-индуцированного выхода калия и концентрация этого иона в МХ печени крыс Август были в 2 раза выше, чем в МХ животных породы Вистар. Ускорение рециклизации калия в МХ может сопровождаться снижением скорости образования в них H₂O₂. Мы обнаружили, что скорость генерации перекиси водорода в МХ крыс Август была снижена на 25% по сравнению с этим параметром у животных Вистар. Таким образом полученные результаты показывают существенную роль митокАТФ в формировании возможных механизмов адаптации животных к стрессу.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №10-04-00920-а и гранта ОПННТ №4.3010.2011.

1. Krylova I.B. et al., / Exp Gerontol. 2006. 41(7). P.697-703.

2. Пшеничникова М.Г. и др. / Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2008. 146(10). С.391-394.

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СИГНАЛЫ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ**Electrical signals in higher plants****Воденев В.А.**

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского,
603950, Нижний Новгород, пр-т Гагарина, 23.
Тел.: +7(831)465-61-06; факс: +7(831)462-30-85; e-mail: v.vodeneev@mail.ru

Свойство возбудимости присуще всем живым организмам и необходимо для существования в постоянно изменяющихся условиях окружающей среды. Одним из наиболее важных проявлений возбудимости является способность генерировать распространяющиеся электрические сигналы в ответ на разнообразные внешние факторы. У высших растений выделяют два основных типа распространяющихся электрических сигналов – потенциал действия (ПД), который возникает в ответ на неповреждающее раздражение, и вариабельный потенциал (ВП) – электрическую реакцию, индуцированную повреждающими раздражителями. Ионный механизм генерации ПД у растений связан, наряду с активацией ионных каналов, с изменением активности электрогенного насоса. Распространение ПД происходит активно по живым клеткам проводящих пучков. ВП, как и ПД, представляет собой переходную деполяризацию клеток, однако, два типа реакций различаются по ряду характеристик. В отличие от ПД, ВП проявляет зависимость от интенсивности воздействия, имеет нерегулярную фазу де- и, в особенности, реполяризации, параметры ВП изменяются по мере распространения. Существуют три гипотезы механизма распространения ВП: электрическая, химическая, гидравлическая. Несмотря на существование различных гипотез, имеются основания полагать, что генерация ВП обусловлена распространением химического соединения из зоны локального повреждения. Относительно механизма генерации ВП доминирующей является точка зрения, согласно которой развитие ВП обусловлено временным угнетением активности электрогенного H^+ -насоса. В то же время, накоплен значительный экспериментальный материал, указывающий на то, что вклад в формирование ВП вносят и пассивные потоки ионов. Вопрос о функциональной роли ПД и ВП у высших растений во многом является дискуссионным. Известно, что электрические сигналы вызывают по ходу распространения кратковременные изменения целого ряда процессов. Выдвинуто предположение, что конечной целью индуцированных электрическими сигналами изменений функционального состояния растения является повышение его неспецифической устойчивости.

Работа поддержана РФФИ (проект № 12-04-00837-а) и грантом Президента Российской Федерации для поддержки молодых российских ученых (МК-1869.2012.4).

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТИЛАКОИДНЫХ МЕМБРАН ХЛОРОПЛАСТОВ ШПИНАТА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИНГИБИТОРОВ КАРБОАНГИДРАЗЫ

Ultrastructural changes thylakoid membranes of chloroplasts spinach under the influence carbonic anhydrase inhibitors

Водка М.В., Белявская Н.А., Золотарёва Е.К.

Институт ботаники им. Н.Г.Холодного НАН Украины, г. Киев, Украина, 01601
Тел: +380(44)272-32-31; факс: +380(44) 272-32-31; e-mail: marinavodka@yandex.ru

Тилакоиды и частицы ФСII содержат карбоангидразу – фермент, который катализирует реакцию гидратации CO_2 и дегидратации H_2CO_3 . Блокирование функций карбоангидразы происходит под действием ингибиторов сульфаниламидной природы – ацетазоламида (АА) и этоксизоламида (ЭА) и ионов металлов – Zn^{2+} , Cu^{2+} . Целью нашего исследования было определение перестройки внутренней мембранной системы хлоропластов шпината под действием ингибиторов карбоангидразы. Хлоропласты класса «С» выделяли из гомогената свежих листьев шпината с помощью комбинации дифференциального и градиентного центрифугирования. Структурные характеристики системы тилакоидных мембран изучали методом трансмиссионной электронной микроскопии. В контрольном образце четко выделялись фрагменты отдельных хлоропластов из листьев растений, содержащие граны, тилакоиды стромы и пластоглобулы. Отмечалась плотная упаковка тилакоидов гран и равномерное их распределение в стопках. Под действием ингибитора АА происходила фрагментация гран и варьирование их высоты, разрыхление общей структуры гран, набухание тилакоидов гран, толщина тилакоидов гран статистически достоверно увеличивалась по сравнению с контролем на 36 %, а размер межтилакоидных просветов – на 10 %. Под действием ЭА структура части гран теряла интактность, расчленяясь на небольшие фрагменты, на некоторых участках тилакоиды гран отделялись от соседних, нарушалась связь терминальных участков тилакоидов гран. Выявлено увеличение толщины тилакоидов гран на 31 % и межтилакоидного пространства на 8 %. Под действием Cu^{2+} при сохранении общей структуры гран и равномерной упаковки тилакоидов в гранах, толщина тилакоидов гран превышала таковую в контроле на 15 %, а толщина межтилакоидных промежутков – на 10 %. После обработки хлоропластов ионами Zn^{2+} наблюдалась неоднородность упаковки тилакоидов гран, изменение строения гран, что проявлялось в резком (на 34%) увеличении межтилакоидных промежутков, особенно в центральной части, при этом терминальные участки граны оставались попарно соединенными, толщина тилакоидов гран также увеличивалась на 35 % по сравнению с контролем. Полученные данные показывают, что фотосинтетический аппарат растений шпината чувствителен к повышению содержания ионов металлов Zn^{2+} , Cu^{2+} , а также к повышению концентраций органических ингибиторов карбоангидразы АА, ЭА, что проявляется в нарушении многих параметров его функционирования. Возможной причиной ингибирования фотосинтетического электронного транспорта являются изменения в ультраструктуре хлоропластов, в частности, повреждение тилакоидов. Отмеченные нарушения в структуре хлоропластов вызывают инактивацию кислородовыделяющего центра ФС II и замедление электронного транспорта. Также, представленные нами экспериментальные данные позволяют высказать предположение об участии карбоангидразы в организации и поддержании интактности мембранной структуры гран хлоропластов. Анализ влияния ингибиторов карбоангидразы на ультраструктуру тилакоидов гран может представлять существенный интерес, поскольку он несет информацию о состоянии гран и хлоропластов в целом.

ИЗМЕНЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ ПРОЦЕССОВ ФОТОСИНТЕЗА У *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* В УСЛОВИЯХ МАГНИЕВОГО ГОЛОДАНИЯ: СВЯЗЬ С ФОТОПРОДУКЦИЕЙ ВОДОРОДА**The changes of the primary processes of photosynthesis in magnesium-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells: relation to hydrogen photoproduction.****Волгушева А.А., Кукарских Г.П., Лаврухина О.Г., Кренделева Т.Е.**

Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова,
119992 Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12. факс: (495)939-11-15,
e-mail: volgusheva_alena@mail.ru

Выделение H₂ в замкнутом биореакторе индуцируется нарушением баланса между процессами выделения и поглощения O₂ при недостатке элементов минерального питания. Несмотря на успехи, достигнутые как в изучении гидрогеназы, так и в понимании изменений в состоянии фотосинтетического аппарата на стадиях, предшествующих выделению H₂, остается много неясных моментов в механизмах регуляции системы. Водоросли с небольшой светособирающей антенной более эффективно используют свет и менее подвержены фотоингибированию. С этой точки зрения нам представляется перспективным использование магниевого (Mg) голодания при культивировании водорослей *C. reinhardtii* для получения H₂. Влияние недостатка Mg на микроводоросли практически не исследовано, однако у высших растений одним из первых проявлений является снижение размера фотосинтетических антенн. Нами показано, что голодающие по Mg в течение 7 суток клетки *C. reinhardtii* отличались от контроля снижением содержания хлорофилла, повышением отношения Хл а/б, снижением на треть скорости выделения O₂ и повышением скорости дыхания вдвое в расчете на единицу Хл. В замкнутом биореакторе голодающая культура после перехода в анаэробноз выделяла H₂ на свету с достаточно высоким выходом. Для характеристики эффективности преобразования энергии в ФС 2 у голодающих по Mg клеток методом РАМ были зарегистрированы параметры флуоресценции хлорофилла (ФХ) на всех этапах, предшествующих выделению H₂, и во время его выделения непосредственно в биореакторе. При переходе культуры в анаэробноз величины $\Delta F/F_m'$ и F_m' медленно снижались и продолжали снижаться в фазу выделения H₂. Это свидетельствует о нарушении эффективности преобразования энергии в РЦ и уменьшении количества активных РЦ. Анализ индукционных кривых ФХ клеток *C. reinhardtii* при высокой интенсивности света (метод РЕА) показал увеличение уровня F₀, снижение переменной флуоресценции F_v и параметра F_v/F_m. Кинетика индукции ФХ голодающих клеток похожа на кривую в присутствии диурона, для нее характерно увеличение амплитуды первой фазы OJ, и уменьшение амплитуды фазы JIP, что свидетельствует о нарушении электронного транспорта с Q_a в пул хинонов. В кинетиках затухания ФХ голодающих клеток *C. reinhardtii*, зарегистрированных методом однофотонного счета в пико-наносекундном временном диапазоне, при трехэкспоненциальном разложении обнаружено уменьшение доли быстрого компонента (характеризующего миграцию энергии к РЦ) и увеличение доли медленных компонентов, связанных с переносом возбуждения от P680* к Q_a.

РЕКОНСТРУКЦИЯ IN VITRO МИКРОТРУБОЧКО-СВЯЗЫВАЮЩЕГО САЙТА КИНЕТОХОРА ПОЧКУЮЩИХСЯ ДРОЖЖЕЙ.**In vitro reconstruction of a microtubule-binding site of a budding yeast kinetochore.****Волков В.А.^{1,2}, Зайцев А.В.³, Гудимчук Н.³, Гриссом П.М.², Макинтош Дж. Р.², Гришук Е.Л.³, Атауллаханов Ф.И.^{1,4,5}**

¹ – ФГБУН Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, 11991, Москва, ул. Косыгина 4; ² – Отделение молекулярной, клеточной биологии и биологии развития, Университет Колорадо, США, Боулдер; ³ – Отделение физиологии, Университет Пенсильвании, США, Филадельфия; ⁴ – ФГБУ Гематологический научный центр МЗСР РФ; ⁵ – Физический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова.
Тел.: +7 (926) 078-65-46; e-mail: vavolkov@gmail.com

Целью митоза является верное разделение сестринских хроматид между дочерними клетками. Два основных клеточных компонента, ответственных за выполнение этой задачи, это микротрубочки, динамические полимеры способные развивать силу с помощью разборки своих концов, и кинетохоры, белковые супер-комплексы, образующиеся на хромосомах и обеспечивающие их правильное присоединение к концам микротрубочек. Последние исследования показывают, что устойчивость связи очищенных кинетохоров почкующихся дрожжей *S. cerevisiae* с микротрубочками к силам в диапазоне 2-20 пН зависит от кольцевидного комплекса Dam1, который присоединяется к кинетохору с помощью продолговатых молекул комплекса Ndc80 [1]. В нашем исследовании мы воспроизводим эту связь путем присоединения рекомбинантного комплекса Dam1 к поверхности микросфер с использованием суперспирализованной белковой фибриллы некинетохорного происхождения. Использование этой фибриллы позволяет с помощью «лазерного пинцета» измерять 4-кратно большую силу в центре микросфер по сравнению с контрольными микросферами, к поверхности которых комплекс Dam1 присоединен с помощью антител. Кроме того, обнаружено, что оба типа шариков присоединяются к латеральной поверхности микротрубочек, но только шарики с фибриллярным закреплением переориентируются под действием натяжения и закрепляются за торцом укорачивающейся микротрубочки. Амплитуды измеренных сил, а также зависимость скорости движения шарика от приложенной силы, измеренные в данной работе, статистически не отличимы от опубликованных данных для очищенных кинетохоров [1]. Шарики, прикрепленные к концам микротрубочек с помощью «подвешенного» кольца Dam1, продолжают поступательное движение под действием натяжения до 30 пН. Такое движение возможно только в случае, если кольцо присоединено к микротрубочке достаточно сильно, чтобы его диффузия вдоль микротрубочки под действием теплового шума снизилась до неизмеряемых экспериментально величин. Действительно, в наших экспериментах показано, что олигомеры Dam1 размером с одиночное кольцо демонстрируют коэффициент одномерной диффузии около 0.1 нм²/с. Представляемые здесь результаты демонстрируют, что молекулярное устройство, состоящее из кольца Dam1, присоединенного к грузу с помощью белковых фибрилл, является функциональным аналогом микротрубочко-связывающего сайта кинетохора почкующихся дрожжей.

1. Akiyoshi, B. et al. Tension directly stabilizes reconstituted kinetochore-microtubule attachments. Nature 468, 576-579 (2010).

ВЛИЯНИЕ N-АЦЕТИЛИРОВАНИЯ НА СТРУКТУРНЫЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС ПАРВАЛЬБУМИНА**Impact of α -N-acetylation on structural and functional status of parvalbumin****Вологжанникова А.А.¹, Пермяков С.Е.^{1,2}, Емельяненко В.И.¹, Князева Е.Л.¹, Казаков А.С.¹, Лаптева Ю.С.¹, Пермякова М.Е.¹, Жадан А.П.¹, Пермяков Е.А.^{1,2}.**¹ Институт биологического приборостроения РАН,
142290, г.Пушино, Московская обл., ул. Институтская, 7² Пушкинский государственный естественно-научный институт,
142290, г.Пушино, Московская обл., проспект Науки, 3
Тел.: +7(4967)31-89-65; факс: +7(4967)33-05-22; e-mail: lisiks@list.ru

α -N-ацетилирование (Nt-ацетилирование) – это универсальная ферментативная модификация белков, регулирующая множество клеточных функций. Несмотря на то, что большинство Ca^{2+} -связывающих белков подвергается Nt-ацетилированию, функциональная роль этой модификации не ясна. Комбинация биофизических и биохимических методов использована для исследования влияния Nt-ацетилирования на свойства парвальбумина (ПА), Ca^{2+} -связывающего фактора релаксации скелетных мышц и основного пищевого аллергена. В отличие от интактного ПА, содержащего N-концевую ацетильную группу, его рекомбинантная форма, экспрессированная в *E. coli* (rWT), не ацетилирована, согласно данным масс-спектрометрии. В сравнении с интактным белком, rWT форма α -ПА шуки характеризуется измененным тепловым поведением (в частности, сниженной на 26°C термостабильностью Mg^{2+} -загруженной формы), пониженной α -спиральностью (на 24% и 7-10% для апо- и металл-связанных форм, соответственно), а также пониженным сродством к Ca^{2+} и Mg^{2+} (са 1-4 и 2-3 порядка величины, соответственно). Структурная дестабилизация rWT белка приводит к его пониженной устойчивости к химотрипсинулизу и повышенной предрасположенности белка к олигомеризации. Константы скорости диссоциации Ca^{2+} для rWT ПА увеличены по сравнению с ацетилированным белком в 1,6-38 раз, что свидетельствует об измененном функциональном статусе белка. В противоположность этому, Nt-ацетилирование α -ПА крысы практически не влияет на его свойства. Резкое различие в эффектах, вызываемых Nt-ацетилированием в изученных ортологах ПА, можно объяснить повышенной склонностью к неупорядоченности АВ домена ПА шуки. Структурная стабильность, сообщаемая парвальбумину в результате Nt-ацетилирования, может вносить вклад в его аллергенность. В целом, показано, что Nt-ацетилирование является необходимым условием для поддержания структурного и функционального статуса некоторых парвальбуминов.

КАЛЬЦИЕВАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ. СВЯЗЬ С ФУНКЦИЕЙ**Calcium signaling in plant cell. Relation to the functioning****Волотовский И.Д.**

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
220072, Минск, Беларусь, ул. Акалемическая, 27,
Тел.: +375(17)284-03-79; факс: +375(17)284-28-19; e-mail:volot@basnet.by

Ионы кальция выполняют в растительной клетке роль вторичного медиатора в сигнальных процессах, индуцированных действием биотических и абиотических факторов, включая свет, что приводит к возникновению в клетке «кальциевого» сигнала. В докладе рассматриваются структурные основы Ca^{2+} сигнализации, механизмы генерации Ca^{2+} сигнатур, природа Ca^{2+} сенсоров и взаимодействие сигнальной системы Ca^{2+} с другими медиаторными системами, в частности, с системами цГМФ и NO, что имеет важное значение для функционирования клетки. Особое внимание уделяется внутриклеточным фоторецепто-рам и роли ионов кальция в трансформации энергии квантов света в физиологический ответ. Рассматриваются перспективы исследований в данной области.

ТРАНСЛЯЦИОННАЯ ПОДВИЖНОСТЬ ВОДЫ ЦИТОПЛАЗМЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ МОДУЛЯЦИИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ТУБУЛИНОВОГО КОМПОНЕНТА ЦИТОСКЕЛЕТА АНТИМИТОТИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ**Translational mobility of water in cytoplasm of plant cells during modulation of structural organization of cytoskeletal tubulin component by antimetabolic agents****Воробьев В.Н.**

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН,
420111, Казань, ул. Лобачевского, 2 а/я 30
Казанский (Приволжский) федеральный университет,
420111, Казань, ул. Кремлевская, 18
Тел: +7(843)231-90-31; факс: +7(843)292-73-47; e-mail: vorobyev@mail.knc.ru

Для исследования гидродинамических показателей цитоплазматического потока методом спин-эхо ЯМР с использованием техники селективной регистрации диффузионного переноса только по цитоплазме [1] исследовалась диффузия воды цитоплазмы (D^*) в клетках стебля элодеи измененная действием антимитотических препаратов. Под влиянием колхицина динамика трансляционного смещения имеет вид кривой с экстремумом в первые часы наблюдения с последующим снижением. Действие винкакалоидов, винбластина и винкристина, выражается в монотонном снижении D^* . В целом, за время наблюдения, влияние колхицина и винкакалоидов приводит к снижению D^* на 0.3×10^{-9} м²/с и 0.5×10^{-9} м²/с соответственно. Динамика трансляционного смещения воды цитоплазмы под влиянием таксола характеризуется монотонным ростом при концентрации 0.05 мМ или выходом на плато при концентрации 0.5 мМ. Все различия в действии используемых препаратов фиксируются на фоне отсутствия изменений в скорости цитоплазматического потока. Известно, что действие колхицина на микротрубочки выражается в повышении нуклеозидтрифосфатной активности тубулина. Комплекс этого препарата с тубулином принимает участие в нуклеации микротрубочек, с которой начинается рост. В результате концентрация колхицинсвязанных димеров тубулина в цитоплазме возрастает, а концентрация свободного тубулина снижается, что находит отражение в сложном поведении зависимости D^* от времени, по крайней мере, в первые часы наблюдения. Присоединение колхицинактивируемой затравки к «+» концу микротрубочки блокирует полимеризацию этого конца, а последующая деструкция микротрубочек повышает концентрацию димеров тубулина в цитоплазме. Винкаалкалоиды подавляют полимеризацию микротрубочек связываясь с тубулином как на «+», так и на «-» концах. Кроме того ингибируют гидролиз ГТФ связанной с β -тубулином. Как следствие, концентрация немикротрубочкового тубулина в цитоплазме возрастает, что приводит к снижению D^* . Таксол стимулирует сборку микротрубочек. Он сдвигает равновесие между димерами и полимерами тубулина в сторону полимеров и вызывает снижение концентрации тубулина в цитоплазме. Вероятно, что «более жидкая» цитоплазма эффективнее перемешивается цитоплазматическим потоком. Этим можно объяснить суточное увеличение D^* до $4.3 \pm 0.35 \times 10^{-9}$ м²/с при 0.05 мМ таксола. Более высокая концентрация приводит к росту D^* уже в первые часы экспозиции ($D^* = 3.7 \pm 0.33 \times 10^{-9}$ м²/с) и незначительно меняется в течение суток.

ПОЛИПЕПТИДНЫЕ ТОКСИНЫ ИЗ ЯДОВ ЗМЕЙ – АНТАГОНИСТЫ НИКОТИНОВЫХ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ**Polypeptide toxins from snake venoms as antagonists of nicotinic acetylcholine receptors****Вульфус Е.А.¹, Горбачева Е.В.¹, Осипов А.В.², Кашеверов И.Е.², Цетлин В.И.², Уткин Ю.Н.²**

¹ – Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской обл., Институтская ул., 3;

² – Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10. Тел.: +7(4967)73-93-47; факс: +7(4967)33-05-09; e-mail: vulfus@gmail.com

Яды змей представляют собой смеси биологически активных соединений, направленных на разные мишени в организме жертвы. Трехпетельные α -нейротоксины выделены из яда змей семейства Elapidae и широко применяются при исследовании никотиновых холинорецепторов (нХР) мышечного типа. Для изучения других типов нХР необходимы новые избирательные агенты. В ходе поиска веществ с новыми свойствами мы провели скрининг цельных ядов 6 видов змей семейства Viperidae. Способность взаимодействовать с нХР оценивали по ингибированию тока, опосредованного возбуждением $\alpha 7$ -подобных нХР в идентифицированных нейронах моллюска *Lymnaea stagnalis*, и связывания радиоактивно меченого α -бунгаротоксина (Btx) с нХР мышечного и $\alpha 7$ типов, а также с ацетилхолин-связывающим белком (АХСБ). Все испытанные яды снижали ответ нейронов на ацетилхолин, но были значительно слабее, чем яд кобры, содержащий трехпетельные α -нейротоксины. С использованием различных видов жидкостной хроматографии из ядов *Bitis arietans*, *Echis multisquamatus* и *Vipera renardi* были выделены белки, способные ингибировать нХР. Белок битанарин, очищенный из яда *Bitis arietans*, блокировал нХР нейронов (IC₅₀ 11.4 мкМ) и конкурировал с Btx за связывание с нХР мышечного и $\alpha 7$ типов (IC₅₀ 4.3 и 20 мкМ), а также с АХСБ (IC₅₀ 10.6 мкМ) [1]. Структура (молекулярная масса, количество дисульфидных связей, частичная аминокислотная последовательность) и высокая Ca²⁺-зависимая фосфолипазная активность (1,95ммол/мин/мкмоль) позволили предположить, что битанарин является новой формой фосфолипазы A2 (PLA2). Это – первый известный белок, обладающий как фосфолипазной активностью, так и сродством к нХР. Классические PLA2 из яда трех видов змей также проявили слабую способность взаимодействовать с нХР. Изучение других белков ядов змей семейства Viperidae, способных взаимодействовать с нХР, продолжается.

Работа поддержана грантами РФФИ (№№ 10-04-00737, 10-04-00708 и 12-04-01523), Министерства образования и науки Российской Федерации (Контракт № 02.740.11.0865) и FP7 Европейского Сообщества (грант № 202088).

1. Vulfus C.A., Gorbacheva E.V. et al., *Toxicon*, 2011. V.57. P.787-793.

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛ ВИЛОНА И ЭПИТАЛОНА**Structural organization of Vilon and Epitalon molecules****Гаджиева Л.С.**

Бакинский государственный университет, AZ-1148, Баку, ул. Ак. З.Халилова 23
Tel. (+994412)510 18 22, Fax(+99412)498 33 76, e-mail:lala-h@mail.ru

Разработка новых геропротекторов (цитомедов), способных задержать старение организма, одно из актуальных направлений в исследованиях. К ним относятся препараты эпиталон и вилон, обладающие иммуногеропротекторными и иммуномодулирующими свойствами. Целью исследования является определение электронно-конформационных свойств данных молекул. Используемый полужемпирический метод молекулярной механики позволяет оценить конформационные возможности молекул, а квантовомеханические методы расчета электронной структуры пептидов позволяют определить эффективные заряды на атомах, дипольные моменты молекулы.

Расчет пространственной структуры молекул вилонa Lys-Glu и эпиталона Ala-Glu-Asp-Gly выполнялся в рамках механической модели молекул с учетом невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Найдены низкоэнергетические конформации каждой молекулы, значения двугранных углов основной и боковых цепей, оценена энергия внутри- и межостаточных взаимодействий. Расчет показал, что низкоэнергетическими для дипептидной молекулы являются конформации с развернутой формой основной цепи. Самой низкоэнергетической конформацией является LR. В данной конформации образуются две водородные связи между атомами водорода боковой цепи Lys и карбоксильной группой C-конца молекулы.

Найденные координаты и значения двугранных углов аминокислот, входящих в дипептид, послужили основой для определения электронной структуры молекулы. Получено, что перераспределение электронного облака в семи структурах приводит к различным дипольным моментам дипептида, причем с увеличением относительной конформационной энергии молекулы значения ее дипольных моментов также увеличиваются. При переходе между низкоэнергетическими конформациями вилонa имеют место флуктуации плотности зарядов на строго определенных группах атомов в боковой цепи аргинина и глутаминовой кислоты.

Расчет пространственной структуры тетрапептида эпиталон определил 10 низкоэнергетических форм основной цепи. Низкоэнергетическими оказались конформации с полностью свернутой и полусвернутой формой основной цепи RRRP, RRRB, RBBP, RBBR.

В низкоэнергетических структурах тетрапептида была оценена конформационная подвижность боковых цепей аминокислотных остатков путем построения конформационных карт. Найдено, что боковые цепи Asp и Glu обладают некоторой конформационной подвижностью. Полученные результаты могут быть использованы для конструирования новых аналогов цитомедов.

КВАНТОВОХИМИЧЕСКИЙ РАСЧЕТ КОМПЛЕКСОВ ЦВИТТЕР ИОНА ГИСТИДИНА С ИОНОМ НАТРИЯ**Quantum-chemical calculation of histidine zwitterion with natrium ion complexes****Гаджиев З.И., Демухамедова С.Д., Алиева И.Н.**

Институт физических проблем Бакинского Государственного Университета,
Баку, Азербайджан, AZ-1148, ул.Ак.З.Халилова, 23,
тел. (+99412) 510-18-226; факс (+99412) 498-33-76; e-mail: svetlanabest@mail.ru

Как известно, применяющиеся в качестве лекарственных препаратов белки должны быть защищены от защитной системы организма человека таким образом, чтобы сохранилась их способность взаимодействовать с биологической мишенью. В США разработали новый метод стабилизации и защиты молекул белков, не затрагивающий их биологическую активность. Роль стабилизаторов белковых молекул при этом играют цвиттер-ионы. При связывании цвиттер-ионных полимеров с белком распределение ионогенных групп способствует тому, что молекулы воды практически не блокируют гидрофобные участки белка, способствуя более эффективному взаимодействию белка-лекарства и соответствующей ему молекулярной мишени не вызывая развития побочных эффектов, что должно быть использовано в фармацевтической промышленности. В связи с этим возросла актуальность в исследованиях различных комплексов, образуемых цвиттер-ионами.

В работе проведено теоретическое исследование пространственной и электронной структуры, а также колебательных спектров чистого цвиттер-иона гистидина и его комплексов с ионом натрия. В изоэлектрической точке аминокислота гистидин является цвиттер-ионом, и обладает свойствами, как аниона, так и катиона. Расчет проведен полуэмпирическим методом квантовой химии PM3 с использованием программы Caussian-03. Вначале была исследована модель чистого цвиттер-иона гистидина. При построении теоретических моделей комплексов цвиттер-иона гистидина с ионом натрия рассмотрены два случая расположения иона натрия относительно заряженных групп – вблизи аниона кислорода и вблизи катиона NH₃ группы цвиттер-иона гистидина. В обоих случаях проанализировано распределение зарядов и изучено влияние иона натрия на геометрические и энергетические параметры координационных комплексов цвиттер-иона гистидина. Показано, что комплексообразование иона натрия с кислородной группой цвиттер-иона гистидина оказывается значительно предпочтительнее. После расчета частот нормальных колебаний и интенсивностей полос поглощения колебательных спектров исследуемых моделей по программе VEDA4 была проведена теоретическая интерпретация частот нормальных колебаний теоретических спектров моделей чистого цвиттер-иона гистидина и его комплексов с ионом натрия по распределению потенциальной энергии по колебательным координатам. Была установлена природа возникновения колебательных полос чистого цвиттер-иона гистидина и определено влияние иона натрия на полосы поглощения ИК спектров образованных комплексов.

ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ СВОРАЧИВАНИЯ ГЛОБУЛЯРНОГО БЕЛКА ОТ ЕГО РАЗМЕРА, ТОПОЛОГИИ И СТАБИЛЬНОСТИ**Dependence of globular protein folding rate on its size, topology and stability****Гарбузинский С.А., Иванков Д.Н., Богатырёва Н.С., Финкельштейн А.В.**Институт белка РАН, 142290, г. Пущино Московской области, Россия
Тел.: +7(495) 514-02-18; факс: +7(495) 514-02-18; e-mail: afinkel@vega.protres.ru

Ранее, на основе полимерной теории, нами было теоретически показано [1-3], что: (1) скорость сворачивания однодоменного глобулярного белка *in vitro*, в точке термодинамического равновесия его нативного и денатурированного состояний, должна лежать в пределах $\sim 10^8 \text{c}^{-1} \times \exp(-(-1/2)L^{2/3}) \div \sim 10^8 \text{c}^{-1} \times \exp(-(-3/2)L^{2/3})$, где $\approx 10^8 \text{c}^{-1}$ – определенная на опыте скорость конформационной перестройки одного аминокислотного остатка, а L – число остатков в цепи белка; (2) если ΔG – разность свободной энергии нативного и денатурированного состояния белка, то скорость его сворачивания должна падать примерно в $\exp(-\Delta G/2RT)$ раз, где T – температура, а R – газовая постоянная. Кроме того, по понятным биологическим причинам, скорости сворачивания белков не должны быть меньше, чем $\sim 10^{-3} \div 10^{-4} \text{c}^{-1}$. Очерченные выше условия создают «золотой треугольник», в который, теоретически, должны попадать скорости сворачивания однодоменных глобулярных белков любой величины и стабильности.

Теперь мы показываем, что все наблюдаемые на опыте скорости сворачивания белков – а их около двух сотен – действительно, попадают в этот «золотой треугольник». Кроме того, мы предсказываем (1) предел величины белкового домена, самоорганизация которого находится под чисто термодинамическим контролем, (2) максимально возможный размер однодоменного глобулярного белка или белкового домена, и (3) зависимость скорости сворачивания белка от его размера, устройства и стабильности.

Работа выполнена при поддержке Программы «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН (грант № 01200957492), Федерального агентства по науке и инновациям (грант № 02.740.11.0295), РФФИ (грант № 10-04-00162а), Грантов Президента РФ для государственной поддержки молодых российских учёных (МК-4894.2009.4, МК-5540.2011.4) и Фонда «Династия».

1. Finkelstein A.V., Badretdinov A.Ya. / Fold. Des., 1997. V.2. P.115–121.

2. Финкельштейн А.В., Бадретдинов А.Я. / Мол. Биол., 1997. Т.31. С.469–477.

3. Finkelstein A.V. In «Slow Relaxations and Nonequilibrium Dynamics in Condensed Matter», J.-L. Barrat, M. Feigelman, J. Kurchan, J. Dalibard, Eds. (EDP Sciences, Les Ulis, Paris, Cambridge & Springer-Verlag, Berlin), 2003. С.649–704.

**ВЛИЯНИЕ БОКОВЫХ ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ В СТРУКТУРЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ
АНТИОКСИДАНТОВ НА ИХ МЕМБРАННЫЙ ТРАНСПОРТ.****The influence of the side substituents in the structure of synthetic antioxidants on
their membrane transport.****Л.Я. Гендель**

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,
117977, Москва, ул. Косыгина, 4
тел.: +7-495-939-7114, факс:+7(499)137-4101, e-mail: lgendel@yandex.ru

На основе сформулированного нами ранее Принципа соответствия биологически активного вещества (БАВ) области биомембраны, где может реализоваться его активность, рассмотрены важные для конструирования синтетических антиоксидантов, лекарств и других БАВ взаимосвязи структуры и гидрофобных свойств вещества с его мембранным транспортом, распределением во внутримембранном пространстве и осуществлением биологического действия.

С использованием методов спиновых зондов и сканирующей электронной микроскопии, синтетических антиоксидантов из разных химических классов (производных пространственно-затрудненных фенолов, анфенов,

5-гидроксibenзимидазола и др.), а так же спин-меченых моделей БАВ показано, что на кинетику встраивания гомологов в биомембрану, селективность распределения во внутримембранном пространстве и ёмкость мембраны для этих соединений оказывают существенное влияние различные по гидрофобным свойствам боковые заместители, введенные в структуру исходного соединения ряда.

Определен вклад заместителей в гидрофобность гомологов, теоретически оценены коэффициенты распределения гомологов в системе октанол-вода.

Выявлены изменения морфологии эритроцитов и структурные модификации эритроцитарной мембраны, индуцируемые различными по гидрофобности синтетическими антиоксидантами.

Установлен немонотонный характер зависимостей модифицирующего действия мембранного транспорта ихфанов на морфологию эритроцитов, структуру эритроцитарной мембраны и целостность эритроцитарных клеток от гидрофобных свойств представителей этого гомологического ряда соединений.

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ СЕРЕБРА И КАЛЬЦИЯ НА ФОРМИРОВАНИЕ ДЕНДРИТНОЙ ТЕКСТУРЫ НА-ДНК В ПЛЕНКАХ**Effect of silver and calcium ions on formation of the Na-DNA dendritic textures in films****Глибицкий Д.М.¹, Глибицкий Г.М.¹, Семенов М.А.¹, Гасан А.И.¹, Рошаль А.Д.².**

¹-Институт радиофизики и электроники НАНУ им. А. Я. Усикова, ул. Ак. Проскуры, 12, 61085, Харьков, Украина; ²-Научно-исследовательский институт химии, Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, Площадь Свободы, 4, 61022, Харьков, Украина. Тел.: +38(057)7203632; e-mail: glibit@ukr.net

Ранее было показано [1], что при выпаривании растворов соли Na-ДНК при температурах 30÷40°C и относительной влажности (ОВ) в интервале 20-40% на стеклянных подложках формируются фрактальные текстуры дендритного типа. Площадь таких текстур на поверхности пленок ДНК занимают не менее 60% от всей площади пленки, с величиной фрактальной размерности $F=1,65\pm 0,05$ [2].

В данной работе исследуется влияние на формирование текстуры ионов кальция и мутагенных ионов серебра.

Были получены пленки ДНК из растворов, содержащих Na-ДНК тимуса теленка (препарат фирмы "Serva") с концентрацией 0.25 мг/мл в 10 мМ растворе 10 мМ NaNO₃ + 0.4 мМ AgNO₃. Полученные фрактальные текстуры на поверхности пленки занимали не более 2% от площади всей пленки, при этом величина фрактальной размерности составляет в среднем 1.61 ± 0.08 . Методами УФ-спектроскопии при $\lambda=260$ нм и ИК-спектроскопии в области поглощения азотистых оснований и сахарофосфатного остова (1000-1800 см⁻¹) было показано [3], что ионы серебра разрушают спиральную структуру ДНК, что не позволяло сформироваться упорядоченной дендритной текстуре в пленке Na-ДНК.

Как известно, ионы кальция, напротив, способствуют стабилизации двуспиральной структуры ДНК. Нами были получены пленки из растворов, содержащих Na-ДНК тимуса теленка с концентрацией 0.25 мг/мл в 10 мМ CaCl₂. При ОВ более 70% дендритные текстуры не образуются. Однако при ОВ=25-35% текстура формируется в виде капель по всей площади пленки.

Эти результаты свидетельствуют о том, что молекулы воды играют важную роль в формировании текстур с ионами Ca²⁺. В докладе также обсуждается роль ионов кальция [4] (в отличие от ионов серебра) в агрегации молекул ДНК при формировании дендритных структур.

[1]. G.M. Glibitskiy, Biophysical Bulletin 21(2). P. 29-34 (2008).

[2]. D.M. Glibitskiy, G.M. Glibitskiy, Nanobiophysics: fundamental and applied aspects. Second international conference. 6-9 October 2011, Kiev, P.50.

[3]. Г.М. Глибицкий, В.В. Джелали, М.А. Семенов, А.Д. Рошаль, Д.М. Глибицкий, А.Ю. Волянский, Г.Г. Зерга. Укр. Физ. Журн., (2012), в печати.

[4]. A.M. Polyanchko, E.V. Chikhirzhina, V.V. Andrushchenko, E. I. Kostyleva, H. Wieser and V. I. Vorob'ev. Molecular Biology, V.38, №4 P.590-600. (2004).

**ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРНЫХ СВОЙСТВ ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ НА ИХ
МЕХАНИЧЕСКУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ****Influence of structural properties of globular proteins on their mechanical and
thermal stability****Глякина А.В.¹, Балабаев Н.К.¹, Галзитская О.В.²**

1 – Институт математических проблем биологии РАН,
142290, Московская обл., Пущино, ул. Институтская, 4;

2 – Институт белка РАН, 142290, Московская обл., Пущино, ул. Институтская, 4
Тел.: +7(4967) 318517; e-mail: quark777@rambler.ru

Трехмерная структура белка определяется балансом разных взаимодействий. Водородные связи, солевые мостики, гидрофобный эффект – все играет важную роль в сворачивании белка и приобретении им конечной нативной структуры. Физические свойства белков прямо связаны с их функциональной активностью и реакцией на внешние воздействия в различных биологических процессах. Они определяют структурную устойчивость и термостабильность макромолекул. Исследование физических характеристик белков является важной и актуальной задачей.

Целью данной работы было всестороннее исследование путей механического разворачивания похожих по структуре, но отличающихся по аминокислотной последовательности иммуноглобулинсвязывающих доменов белков L и G при приложении к их концам внешней силы, а так же поиск структурных факторов, ответственных за термостабильность белков из термофильных организмов.

Для этого методом молекулярной динамики с использованием явной модели растворителя моделировался процесс разворачивания этих белков путем растяжения их за концы [1]. Проводилось два типа вычислительных экспериментов. В одном случае белки растягивались за концы с постоянной силой, а в другом – с постоянной скоростью.

Было обнаружено, что как при больших силах ($F > 800$ пН), так и при больших скоростях растяжения ($v > 6.25 \cdot 10^{-3}$ нм/пс) средние времена разворачивания и, соответственно, средние максимальные силы реакции, возникающие при разворачивании, для белков L и G оказались близкими. С уменьшением силы и скорости растяжения для разворачивания белка G в среднем требуется большее время и возникает большая сила реакции, чем для белка L. Это говорит о том, что в диапазоне малых скоростей и сил растяжения белок G механически более стабилен по сравнению с белком L. В то же время, величина прикладываемой силы не изменяет пути механического разворачивания белков L и G.

Так же было обнаружено, что белок G имеет больше межатомных контактов на остаток для поверхностных аминокислотных остатков по сравнению с белком L. Аналогичная ситуация наблюдалась для термофильных белков при анализе базы, состоящей из 373 пар похожих по структуре, но различающихся по аминокислотной последовательности белков из термофильных и мезофильных организмов [2].

1. Глякина А.В., Балабаев Н.К., Галзитская О.В. / Биохимия, 2009. Т.21. С.389-403.

2. Glyakina A.V., Garbuzynskiy S.O., Lobanov M.Yu., Galzitskaya O.V. / Bioinformatics, 2007. V.23. P.2231–2238.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА КАРДИОАКТИВНЫХ НЕЙРОГОРМОНОВ**Spatial structure of the cardioactive neurohormones****Годжаев Н.М., Агаева Л.Н.**

Университет "Qafqaz", AZ0101, Шоссе Баку-Сумгаит, 16 км
Тел: 00 994 12 – 448 28 62/66 Факс: 00 994 12 448 28 61/67, e-mail:leylanamig@mail.ru

Кардиоактивные пептиды обнаружены в организмах представителей животного мира, где принимают участие в многочисленных физиологических функциях, таких как контроль мускульных движений, кардиорегуляция, регуляция боли. Они являются главными компонентами двигательных систем, в которых химическая энергия трансформируется в механическую работу мышечных сокращений сердца животных, птиц, моллюсков, разного рода перемещений при структурной организации и делении клеток.

С помощью метода теоретического конформационного анализа были исследованы пространственные структуры кардиоактивных пептидов:

Lys1-Asn2-Glu3-Phe4-Ile5-Arg6-Phe7-NH₂ (1)

Ser1-Asp2-Asn3-Phe4-Met5-Arg6-Phe7-NH₂ (2)

Pro1-Asp2-Asn3-Phe4-Met5-Arg6-Phe7-NH₂ (3)

Ala1-Asp2-Arg3-Asn4-Leu5-Arg6-Phe7-NH₂ (4)

Для каждой из этих пептидных молекул был определен набор низкоэнергетических конформаций, найдены энергетические вклады внутри- и межстаточных взаимодействий, энергии невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и геометрические параметры, значения двугранных углов основной цепи и боковых цепей аминокислот, входящих в эти молекулы. Исследования показали, что молекула (1) представлена 9 формами основной цепи, молекула (2) – 18 формами основной цепи, молекула (3) – 24 формами основной цепи, молекула (4) – 12 формами.

N-концевой трипептидный фрагмент молекулы (1) является конформационно лабильным, C-концевой тетрапептидный фрагмент – жесткий, он представлен всего тремя формами основной цепи, поэтому низкоэнергетические конформации молекулы разделены на три группы. У молекулы (2) N-концевой тетрапептидный фрагмент является конформационно жестким и представлен 6 формами основной цепи, C-концевой трипептидный фрагмент – конформационно лабильный.

В молекулы (3),(4) входят аминокислотные остатки с объемными и лабильными боковыми цепями, поэтому во многих конформациях между ними образуются эффективные взаимодействия и не возникает сильная энергетическая дифференциация между формами основной цепи, поэтому они представлены многими стабильными формами основной цепи.

Также исследована конформационная подвижность боковых цепей аминокислот, входящих в кардиоактивные молекулы и их аналоги. Определена способность каждого аминокислотного остатка к взаимодействиям с молекулами рецепторов.

Полученные низкоэнергетические структуры пептидных молекул могут использоваться для точечных замен отдельных аминокислот, что позволяет априорно предсказать актуальные по своим функциям аналоги природной пептидной молекулы.

БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ S-ОБРАЗНЫЕ БЕТА-ЛИСТЫ: СТРУКТУРНЫЕ ДЕРЕВЬЯ И КЛАССИФИКАЦИЯ**Proteins containing S-like beta-sheets: structural trees and classification**

Гордеев А.Б., Ефимов А.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка Российской академии наук, 142290, Московская обл., Пущино.

Тел.: +7(4967)31-84-63; факс: +7(495)514-02-18; e-mail: gordeew@vega.protres.ru

Проблема сворачивания белков представляет собой одну из главных нерешенных задач в области биохимии и молекулярной биологии. Для решения данной проблемы широко используются теоретические методы, позволяющие моделировать процесс сворачивания белка. Одним из подходов, применяемых при моделировании, является построение и анализ структурных деревьев. Структурное дерево белков – это совокупность всех разрешённых пространственных структур, которые могут быть получены из одной стартовой структуры путём последовательного пристраивания к ней других элементов вторичной структуры в соответствии с набором правил [1-3]. В качестве стартовой структуры дерева берётся структурный мотив. Структурные деревья можно использовать для создания структурной классификации белков. Ранее нами был построен ряд структурных деревьев, разработана классификация для соответствующих групп белков, а результаты работы представлены в виде WEB-ресурса PCBOST [4, 5].

Целью данной работы было выполнить построение структурных деревьев для белков, содержащих S-образные бета-листы, и разработать иерархическую классификацию для этой группы белков. При построении структурных деревьев в качестве стартовых структур выделено 6 мотивов, отличающихся по пространственной укладке полипептидной цепи и содержащих S-образный бета-лист: однослойные и двуслойные β S- и β S β -мотивы, (S α)-мотив и двуслойный (β +S α)-мотив. В ходе работы построено 6 новых структурных деревьев; на их основе разработана классификация белков с S-образными бета-листами. Созданная база данных включила 403 белка и домена и более 1 500 PDB-файлов. Классификация содержит 56 Укладок и 31 Уровень. В настоящее время планируется оформить классификацию в виде расширения ресурса PCBOST. После оформления классификация белков и структурные деревья будут доступны в Интернете по адресу <http://strees.protres.ru/>.

Работа поддержана грантом РФФИ № 10-04-00727-а.

1. Efimov A.V. / Journal of Molecular Biology, 1995. V.245. P.402-415.
2. Efimov A.V. / Proteins, 1997. V.28. P.241-260.
3. Ефимов А.В. / Успехи биологической химии, 2004. Т.44. С.109-132.
4. Гордеев А.Б., Кондратова М.С., Ефимов А.В. / Молекулярная биология, 2008. Т.42. С.323-326.
5. Gordeev A.B., Kargatov A.M., & Efimov A.V. / Biochem. Biophys. Res. Comm., 2010. V.397, P.470-471.

**МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
ТРОМБОЦИТОВ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗОЙ****Mechanisms of platelet function regulation by myeloperoxidase**

**Горудко И.В.¹, Шамова Е.В.¹, Соколов А.В.², Грудинина Н.В.², Дрозд Е.В.³,
Васильев В.Б.², Панасенко О.М.⁴, Черенкевич С.Н.¹**

¹ – Белорусский государственный университет, кафедра биофизики,
220030, Минск, просп. Независимости, 4;

² – ФГБУН «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАМН,
197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12;

³ – Институт тепло- и массообмена им. А.В. Лыкова НАН Беларуси,
Минск, ул. П. Бровки, 15;

⁴ – ФГБУН «НИИ физико-химической медицины» ФМБА России,
119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

Тел.: (375-17) 209-5437; факс: (375-17) 209-5445; e-mail: irinagorudko@rambler.ru

Несмотря на значительное количество работ по изучению влияния различных факторов на структурно-функциональные свойства тромбоцитов, информация о механизмах изменения агрегационной активности этих клеток при заболеваниях, ассоциированных с воспалением, остается недостаточной. Одним из основных ферментов, секретируемых лейкоцитами во внеклеточное пространство в очагах воспаления, является белок азурофильных гранул – миелопероксидаза (МПО). Участие МПО в регуляции функциональной активности разных типов клеток обусловлено двумя механизмами: 1) через продукцию гипогалоидных кислот, обладающих высокой галогенирующей и окислительной способностью; 2) непосредственным связыванием фермента с компонентами клеточной поверхности. В данной работе исследовано взаимодействие МПО с поверхностью тромбоцитов и ее влияние на структурно-функциональные свойства этих клеток.

Методом лазерной конфокальной микроскопии с применением аффинных антител крыс против МПО выявлено, что МПО связывается с компонентами плазматической мембраны тромбоцитов, не проникая внутрь клеток. Установлено, что взаимодействие МПО с тромбоцитами сопровождается потенцированием АДФ- и тромбин-индуцированной агрегации клеток и увеличением концентрации свободных ионов Ca^{2+} в клетках в результате депо-зависимого входа Ca^{2+} в цитозоль тромбоцитов. Следует отметить, что праймирующий эффект МПО на агрегацию тромбоцитов сохранялся в присутствии ингибиторов ее ферментативной активности – каталазы (300 U/мл) и гидразиды 4-аминобензойной кислоты (50 мкМ). С применением флуоресцентного красителя флуоресцеин-фаллоидина было установлено, что взаимодействие МПО с тромбоцитами сопровождается деполимеризацией примембранного F-актина. Методом атомно-силовой микроскопии было выявлено снижение модуля упругости тромбоцитов в присутствии МПО.

Таким образом, МПО потенцирует агонист-индуцированную агрегацию тромбоцитов, что сопряжено с деполимеризацией примембранного F-актина и увеличением концентрации свободных ионов внутриклеточного Ca^{2+} в результате депо-зависимого входа ионов Ca^{2+} в цитозоль тромбоцитов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что увеличение концентрации МПО в крови может способствовать активации тромбоцитов и приводить к нежелательному тромбообразованию при заболеваниях, ассоциированных с воспалением.

Работа поддержана РФФИ (12-04-90003) и БРФФИ (Б12Р-036).

**ИЗМЕНЕНИЕ ЛОКАЛЬНЫХ УПРУГИХ СВОЙСТВ МЕМБРАН НЕЙТРОФИЛОВ ПОСЛЕ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С НАНОРАЗМЕРНЫМИ ЛЮМИНОФОРАМИ****Changes in local elastic properties of neutrophils membrane after interaction with
nanoscale phosphors****Горшкова Е.Н.¹, Пудовкина Е.Е.², Маланина Н.В.¹**¹ – Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
603950, Н.Новгород, пр-т. Гагарина, 23;² – Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева,
603950, Н.Новгород, ул. Минина, д.24

Тел.:+7(920)012-10-68; e-mail: e.n.gorshkova@gmail.com

Наночастицы с различной структурой и химическим составом активно внедряются в различные области науки, в том числе в области биологических исследований и с перспективой применения в медицинской практике. Особый интерес вызывают наноразмерные частицы, способные проявлять интересные оптические свойства и, как следствие, могут выступать в качестве материалов для биоимиджинга. Однако накапливается всё больше данных о токсичности наноматериалов. Важнейшую роль в реализации иммунного ответа организма на проникновения ксенобиотиков играет неспецифический иммунный ответ, важнейшим фактором которого являются нейтрофилы. В процессе жизнедеятельности они проникают через микрососуды, осуществляют трансэндотелиальную и трансэпителиальную миграцию. Поэтому исследование наномеханических свойств нейтрофилов человека может предоставить необходимую информацию о сохранении ими функциональных свойств и способности мигрировать и осуществлять иммунный ответ после взаимодействия с наноразмерными объектами. В работе использовались вновь синтезированные нанокристаллические материалы на основе ортофосфатов двух типов $\text{Ca}_9\text{Er}_0.1431\text{Yb}_0.8569(\text{PO}_4)_7$ ($x+y=1.0$, $x/y=0.17$) (ОФ-1) и $\text{Ca}_9\text{Er}_0.0909\text{Yb}_0.9091(\text{PO}_4)_7$ ($x+y=1.0$, $x/y=0.1$) (ОФ-2). Свечение данных веществ обусловлено присутствием в них ионов Er^{3+} и Yb^{3+} , которые известны своей способностью излучать в видимой области спектра, в т.ч. за счет апконверсионного механизма люминесценции при накачке на длине волны ~ 0.98 мкм. Для оценки ригидности мембран использовали метод силовых кривых, в котором используется режим спектроскопии атомно-силового микроскопа. Исследования поверхности клеток проводили в физиологическом растворе на атомно-силовом микроскопе SOLVER BIO™ (NT-MDT, Зеленоград) с использованием контактных зондов MSCT-Au (Veeco, США). Сначала проводили измерение ригидности мембран нативных клеток. Показатель составил – $2,59 \pm 1,16$ кПа. Затем инкубировали клетки с исследуемыми наночастицами (30 мин, 37°C), взвешенными в физиологическом растворе в концентрации, соответствующей полученным LD50 для данных веществ, в результате чего наблюдали статистически значимое снижение значения модуля Юнга до $1,98 \pm 1,46$ кПа в случае с ОФ-1 и до $1,71 \pm 0,56$ кПа в случае с ОФ-2 ($p < 0,05$). Т.о. исследования показали, что исследуемые люминофоры оказывают влияние на механические свойства мембран нейтрофилов, вызывая снижение упругости и увеличение их вязкости.

**ПОКАЗАТЕЛИ УПРУГОСТИ И АДГЕЗИИ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН
ГЕМОЦИТОВ GROMPHADORHINA PORTENTOSA (INSECTA: DICTYOPTERA:
BLABERIDAE) И SHELFORDELLA TARTARA (INSECTA: DICTYOPTERA: BLATTIDAE).**

Elasticity and adhesion data of the hemocytes cell membranes of *Gromphadorhina portentosa* (INSECTA: DICTYOPTERA: BLABERIDAE) and *Shelfordella tartara* (INSECTA: DICTYOPTERA: BLATTIDAE).

Гребцова Е.А., Присный А.А.

ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85.
Тел.: +79087810216; e-mail: shtirlitz009@mail.ru

Цель исследования – исследовать упругость цитоплазматической мембраны и адгезию зонда к мембране клетки *Gromphadorhina portentosa* и *Shelfordella tartara*.

Данные по свойствам упругости и адгезии были получены с использованием сканирующего зондового микроскопа Интегра Вита NT-MDT в режиме атомно-силовой спектроскопии при наложении нагрузки в 16 локальных участках клеточной поверхности. Рассчитывали модуль Юнга при помощи программного приложения «Ef3» (NT-MDT, Зеленоград). Силу адгезии рассчитывали по силовым кривым при помощи программного приложения “Nova 1.0.26 Build 1397” (NT-MDT) и формулы $F=kx\Delta\text{Height}$, где k – жесткость кантилевера. В результате получали показатель адгезии клетки к кантилеверу в точке подвода зонда. Значения модуля Юнга, характеризующего упругостные свойства мембраны, заметно отличались для разных точек в пределах одной клетки из-за особенностей плазматической мембраны и локализации внутриклеточных органоидов.

Гемоциты типа 1 мелкие, правильной круглой формы, псевдоподий не образуют. Ядро крупное, цитоплазма занимает пристеночное положение. Значения модуля Юнга и силы адгезии у *G. portentosa* равны 143,4±12,5 кПа и 25,8±5,3 нН соответственно. Значения модуля Юнга и сила адгезии *S. tartara* равны 75,6±13,1 кПа и 29,2±4,8 нН.

Гемоциты типа 2 крупные, округлые с базофильными гранулами. Образуют филоподии и распластаются на субстрате. Значения модуля Юнга и силы адгезии у *G. portentosa* равны 186,5±11,8 кПа и 21,1±4,3 нН соответственно. Значения модуля Юнга и сила адгезии *S. tartara* равны 87,8±9,2 кПа и 22,7±6 нН.

Гемоциты 3 типа округлые, с неровными контурами. Имеют мелкозернистую цитоплазму. Образуют множество коротких псевдоподий, располагающихся по всему периметру клетки. Значения модуля Юнга и силы адгезии у *G. portentosa* равны 96,5±10,1 кПа и 20,6±3,1 нН соответственно. Значения модуля Юнга и сила адгезии *S. tartara* равны 86,1±12,3 кПа и 21,9±2,6.

Гемоциты типа 4 веретеновидной, овальной формы. Содержат эозинофильные гранулы. Ядро занимает центральное положение. Значения модуля Юнга и силы адгезии у *G. portentosa* равны 154,9±8,9 кПа и 27,8±4,9 нН соответственно. Значения модуля Юнга и сила адгезии *S. tartara* равны 66,7±7,2 кПа и 29,1±4,7 нН.

Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта НИУ «БелГУ» ВКАС-03-12.

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМОВ P4501A
В ПЕЧЕНИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА ОРГАНИЗМ ХОЛОДА**

Molecular mechanisms of cold-induced cytochrome P4501A activation in liver

Гришанова А.Ю., Перепечаева М.Л.,

ФГБУ "Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики"

СО РАМН, 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

Тел.: +7(383)333-88-40; факс: +7(383)335-98-47; e-mail: perepech@soramn.ru

Действие на организм умеренного холода обычно сопровождается угнетением таких процессов как транскрипция генов, трансляция белков, ферментативные реакции [1]. В этой связи интересным фактом является феномен активации под действием холода ферментов метаболизма ксенобиотиков, в частности, цитохромов P450 подсемейства 1A (CYP1A1 и CYP1A2) в печени крыс.

CYP1A известны как ферменты, метаболизирующие такие проканцерогены как полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) и ариламины до канцерогенов. В последние годы стало известно, что индуцируются CYP1A не только ПАУ, но и веществами с иными физико-химическими свойствами, в том числе эндогенными. При этом единственный доказанный путь активации CYP1A1 – это путь сигнальной трансдукции, опосредованный лиганд-зависимым транскрипционным фактором AhR (арилгидрокарбонный рецептор) [2].

В основу данной работы была положена модель Харта [3], которая используется для изучения адаптации организма к холоду. Животных содержали при 4°C в течение 5 и 10 суток. Активности CYP1A измерялись по скорости O-деалкилирования специфических субстратов, определение уровня мРНК проводилось методом мультиплексной ОТ-ПЦР, определение функционально активного AhR – методом гель-ретардационного анализа, определение апоферментов – методом вестерн-блот анализа.

Апоферменты CYP1A1 и CYP1A2 регистрировались на 5 сутки, и их содержание к 10 суткам увеличивалось. Активность CYP1A1/2 на 5 и 10 сутки воздействия холодом возрастала примерно в 3 раза, и одновременно возрастал уровень мРНК CYP1A1, что говорит о транскрипционном механизме регуляции CYP1A1. Уровень мРНК CYP1A2, напротив, незначительно снижался на 5 и 10 сутки воздействия холодом, что, в совокупности с увеличением активности CYP1A2, говорит о посттранскрипционном механизме его регуляции. В ядрах клеток печени крыс в процессе пребывания крыс на холоде появляется ДНК-связанная форма AhR, что доказывает AhR-зависимый механизм индукции транскрипционной активации гена CYP1A1.

Таким образом, воздействие на крыс умеренного холода приводит к увеличению в печени крыс активности CYP1A1 в результате активации транскрипции гена CYP1A1 с вовлечением AhR-зависимого пути сигнальной трансдукции, а также к увеличению активности CYP1A2, регулируемой на посттранскрипционном уровне.

1. Sonna L.A., Fujita J. et al. / J Appl Physiol, 2002. Vol. 92. P. 1725-1742.
2. Whitlock J.P.Jr. / Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999. Vol. 39. P. 103-125.
3. Hart J.S. / Symp Soc Exp Biol, 1964. Vol. 18. P. 31-48.

**ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ СУКЦИНАТА НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ
ЛИПИДОВ ИНТАКТНЫХ И ПОВРЕЖДЕННЫХ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС
РАЗНОГО ВОЗРАСТА**

**Succinate effects on lipid peroxidation in the intact and damage rat liver
mitochondria on young and old animals**

Гришина Е.В., Хаустова Я.В., Маевский Е.И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пущино, Московской обл., ул. Институтская, 3;
Тел. +7(495)6326769; +7(4967)73-93-54; факс +7 (4967)33-0553;
e-mail: grishina_lena@rambler.ru

Увеличение уровня активных форм кислорода (АФК) вследствие изменения соотношения активности прооксидантных и антиоксидантных систем является непременным атрибутом старения, что по мнению ряда исследователей является одной из ведущих причин большинства возрастных нарушений физиологических и биохимических функций, включая различные заболевания. На основании «свободно радикальной» теории уменьшение скорости развертывания программы старения можно было бы достигнуть, предотвратив происходящий с возрастом подъем уровня АФК. Известно более 20 видов антиоксидантов, способных увеличивать продолжительность жизни животных, так называемых геропротекторов. Однако множество исследований свидетельствуют о том, что длительный прием антиоксидантов в высоких дозах опасен, поскольку вызывает своеобразную «атрофию» собственных антиоксидантных систем и нарушает течение процессов регуляторной сигнализации.

Альтернативой использования экзогенных антиоксидантов может быть уменьшение генерации эндогенных АФК, в частности в митохондриях (МХ), являющихся одним из основных производителей АФК в клетках. В последние годы в качестве геропротектора начали использовать препараты янтарной кислоты (сукцината) и ее производных.

В связи с этим мы сравнили антиоксидантные свойства сукцината и 3-гидроксибутирата на изолированных МХ печени молодых (3 мес.) и старых (1-1,5 г.) крыс линии Sprague Dawley по кинетике перекисного окисления липидов (ПОЛ), индуцированного Fe²⁺/ATP комплексом, регистрируемой по потреблению кислорода.

Окисление 3-гидроксибутирата способствовало снижению скорости ПОЛ (Vпол) только в МХ старых животных (на 19%, $p < 0,01$), тогда как окисление сукцината тормозило ПОЛ в суспензии МХ печени молодых крыс (на 14,7%, $p < 0,1$), и существенно в большей степени – на 35% ($p < 0,001$) в МХ старых крыс. Повреждение МХ после замораживания-оттаивания значительно усиливало проявление антиоксидантного действия сукцината (торможение Vпол на 56%, $p < 0,001$) в МХ печени старых и молодых животных.

Мы полагаем, что антиоксидантная эффективность сукцината связана с активацией дыхательной цепи. Согласно полученным данным антиоксидантное действие окисления сукцината наиболее выражено в суспензии МХ старых животных и на поврежденных МХ, независимо от возраста животных. Полученные нами данные позволяют в какой-то мере объяснить большую эффективность сукцинат-содержащих препаратов при наличии экстремальных нагрузок, при патологии и у более старых пациентов.

**КИНЕТИКА ВСАСЫВАНИЯ ГЛЮКОЗЫ В ТОНКОЙ КИШКЕ КРЫС *IN VIVO* ПРИ
ВЫСОКОМ И НИЗКОМ УРОВНЯХ ЛОКАЛЬНОЙ СУБСТРАТНОЙ НАГРУЗКИ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ И МАТЕМАТИЧЕСКОЕ
МОДЕЛИРОВАНИЕ)**

**Kinetics of glucose absorption in the rat small intestine *in vivo* under high and
low levels of the local substrate load (experimental investigation and mathematical
simulation)**

Груздков А.А., Громова Л.В.

ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова 6,
E-mail: gruzdkov@pavlov.infran.ru

Известно, что уровень пищевой нагрузки существенно влияет на функциональные характеристики тонкой кишки, но остается спорным вопрос об относительной роли вторичного активного транспорта (с участием SGLT1) и облегченной диффузии (с участием GLUT2) в адаптации всасывания глюкозы к повышенной концентрации субстрата в полости кишки. В нашей работе в хронических опытах на крысах исследовалась кинетика всасывания глюкозы в изолированной петле тонкой кишки после её перфузии (а) в течение 10 дней (по 1,5 – 2 ч ежедневно) раствором глюкозы 125 мМ (группа 1, n=6) и (б) в течение 9 дней (по 1 ч ежедневно) раствором глюкозы 12.5 мМ (группа 2, n=5). Группы животных 1 и 2 были сформированы в предварительных опытах так, чтобы усредненные данные по кинетике всасывания глюкозы (контроли 1 и 2 соответственно) были близкими для обеих групп. Результаты опытов анализировались на математической модели, учитывающей современные представления о всасывании глюкозы в тонкой кишке (Громова и др., 2002). В случае повышенной субстратной нагрузки (гр.1) скорости всасывания глюкозы снизились по сравнению с исходными значениями (контроль 1) на 7.5%, 10.8%, 12.6% и 25.4% ($P<0.05$) при ее концентрациях в инфузате 12.5, 25, 50 и 75 мМ соответственно. При пониженной нагрузке (гр. 2) снижение скорости всасывания глюкозы по сравнению с исходными значениями (контроль 2) составило 17.2%, 27.4% ($P<0.01$), 37.1% ($P<0.0027$) и 37.4% ($P<0.02$) в том же диапазоне концентраций субстрата. Наиболее близкое соответствие с данными опытов было получено на модели при следующих значениях кинетических параметров активного транспорта глюкозы: $K_m=3.0$ мМ; $J_{max}=0.73$ и 0.67 мкмоль/мин – для контроля 1 и контроля 2 соответственно, а также $K_m=3.0$ мМ; $J_{max}=0.62$ и 0.38 мкмоль/мин – для гр. 1 и гр. 2 соответственно. Согласно результатам моделирования, при концентрации глюкозы в инфузате 75 мМ вклад ненасыщаемого компонента всасывания глюкозы, обусловленного преимущественно облегченной диффузией с участием GLUT2, в случае повышенной субстратной нагрузки не превышал 12%, а в случае пониженной нагрузки – около 30%. Сделан вывод, что на фоне частичной атрофии изолированного участка кишки повышенная субстратная нагрузка в наибольшей степени влияет на систему вторичного активного транспорта, способствуя сохранению ее мощности на более высоком уровне. При этом снижается относительный вклад ненасыщаемого компонента

Работа поддержана РФФИ (грант № 10-04-01048-а)

**ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ ВЫСОКОЙ НАПРЯЖЕННОСТИ НА
ИНТЕНСИВНОСТЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ КРОВИ У ЛИЦ С
ДЕФИЦИТОМ Г-6-ФД**

**Effect of high-tension electric field on intensity of lipid peroxidation with G-6-PD
deficient blood men**

Гулиева Р.Т.¹., Джафаров А.И.¹., Мамедова Т.А.²., Асадов Ч.Д.²

1 – Институт Физики, НАН Азербайджан, Баку, пр. Г. Джавида, 33 AZ-1143;

2 – Институт гематологии и переливания крови МЗ Азербайджанской Республики, Баку,
ул. Мирали Гашкая, 87, AZ1000

Тел.: +99450 373 14 30; e-mail: ruhiyya.guliyeva@yahoo.com

Исследовано действие электрического поля с напряженностью 50 кВ/м (50 Гц) на развитие перекисного окисления липидов (ПОЛ) во фракциях крови лиц с наследственным дефицитом глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД). Оценку интенсивности ПОЛ определяли по интенсивности спонтанной хемилюминесценции и по содержанию МДА в исследованных образцах (плазма, суспензия мембран эритроцитов). Образцы подвергались воздействию электрического поля в течение 1, 3 и 6 суток при температуре 8°C. Обнаружено, что интенсивность спонтанной хемилюминесценции и накопление МДА в мембранах эритроцитов и плазме, подвергнутых действию электрического поля, по сравнению с не подвергнутыми воздействию образцами, увеличивается. Характерно, что интенсификация ПОЛ при действии электрического поля в суспензии мембран эритроцитов более выражена, чем в плазме. Также установлено, что интенсивность ПОЛ во фракциях крови зависит от величины экспозиции действия электрического поля, и она увеличивается с увеличением срока экспозиции.

На основании анализа полученных данных в работе делаются попытки выяснения механизма усиления ПОЛ под влиянием электрического поля.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭЛЕКТРОАКУСТИЧЕСКОГО ДАТЧИКА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК ПРИ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С МИНИАНТИТЕЛАМИ**Use the electroacoustic sensor for detection of microbial cells with help miniantibodies****Гулий О.И.¹, Зайцев Б.Д.², Кузнецова И.Е., Шихабудинов А.М.², Караваяева О.А.¹, Дыкман Л.А.¹, Староверов С.А.¹, Фомин А.С.¹, Игнатов О.В.¹**

¹ – Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, 410049 г. Саратов, проспект Энтузиастов, 13

² – Саратовский филиал Института радиотехники и электроники РАН, 410019, г.Саратов, ул. Зеленая, 38

Тел.: +7(8452)970444, Факс: +7(8452)970383, E-mail: guliy@ibppm.sgu.ru; guliy_olga@mail.ru

В последние годы большой интерес исследователей вызывают пьезоэлектрические резонаторы с поперечным электрическим полем, которые в отличие от традиционных резонаторов с продольным полем более чувствительны к контактирующей жидкости, поскольку реагируют не только на изменение ее механических свойств (вязкость, модуль упругости, плотность), так и электрических (диэлектрическая проницаемость, проводимость). Были получены фаговые мини-антитела к бактериальным клеткам штамма *Azospirillum brasilense* Sp245 и исследована возможность их применения для детекции микробных клеток с помощью пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем. Установлено, что частотные зависимости реальной и мнимой частей электрического импеданса такого резонатора, нагруженного суспензией клеток *A. brasilense* Sp245 с мини-антителами, значительно отличаются от зависимостей резонатора с контрольной суспензией клеток без мини-антител. Найден предел возможного определения концентрации микробных клеток, который составляет 103 кл/мл при их взаимодействии с мини-антителами. Установлено, что детекция клеток *A. brasilense* Sp245 с помощью мини-антител возможна в присутствии посторонних культур, например, клеток *E. coli* BL-Ril и *A. brasilense* Sp7.

Представленные результаты показывают перспективность анализа микробных суспензий с помощью пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем и демонстрируют возможность разработки биологического датчика для количественной детекции микробных клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, гранты №10-02-01313а м №12-02-01057а.

СПЕЦИФИЧНЫЕ ДНК-БЕЛКОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ИНИЦИАЦИИ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСНОЙ ДНК, КАК ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ТИПОВ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ АГЕНТОВ**Specific protein – DNA complexes participating in the initiation of viral DNA replication
as platforms for design of new types of antiviral drugs**

**Гурский Г.В.¹, Н.П. Бажулина Н.П.¹, А.Н. Суrowая А.Н.¹,
Андрoнова В.Л.², Архипова В.С.¹, Никитин А.М.¹, Головкин М.В.¹, Галегов Г.А.²,
Гурский Я.Г.³, Гроховский С.Л.¹**

¹ФГБУ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва ул. Вавилова, 32. ²ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития России, 123098 Москва, ул. Гамалеи, 16. ³ФГБУ Кардиологический научно-производственный комплекс, 121552 Москва, ул. 3-я Черепковская, 15 а. Тел.: +7(499)135-97-90; факс: +7(499)135-14-05; e-mail: gursky@eimb.ru

Аналоги ацикловира являются единственной группой соединений, которая используется в настоящее время для лечения болезней, вызываемых вирусом простого герпеса первого типа. Эти соединения в трифосфорилированной форме являются ингибиторами вирусной ДНК полимеразы. В ходе настоящей работы были синтезированы ДНК-связывающие соединения, которые селективно подавляют развитие вирусного цитопатического эффекта в культуре клеток Vero E6, инфицированных вирусом простого герпеса первого типа. Проведены исследования их связывания с ДНК с помощью UV и КД спектроскопии, подвижности комплексов при электрофорезе в геле и ДНКазного футпринтинга. Данные футпринтинга показывают, что некоторые из этих соединений избирательно связываются с А+Т кластером в OriS и защищают А+Т кластер от расщепления ДНКазой I. В отличие от аналогов ацикловира димерные производные нетропсина ингибируют процесс локального раскручивания А+Т кластера, катализируемого хеликазой UL9 вируса герпеса, т.е. действуют на ранней стадии жизненного цикла вируса, когда синтез вирусной ДНК еще не имеет места. Мы использовали резонансный перенос энергии возбуждения по механизму Ферстера (FRET) в качестве чувствительного метода для исследования структурных изменений в межмолекулярном комплексе, образуемом хеликазой UL9 с минимальным дуплексом OriS (80 пар оснований), а также для исследования кинетики хеликазной реакции. В этих экспериментах были использованы олигонуклеотиды, содержащие различные флуоресцентные метки, присоединенные к 5 - и 3 - концам олигонуклеотидов в минимальном дуплексе OriS. Разделение цепей в минимальном дуплексе сопровождается уменьшением квантового выхода флуоресценции, вызванном увеличением эффективности процесса переноса энергии от донора к акцептору. Это вызвано тем, что олигонуклеотид сворачивается в шпильку, в которой расстояние между донором и акцептором меньше, чем в дуплексе OriS. Исследована кинетика раскручивания дуплекса OriS хеликазой UL9. Показано, что Рт-бис-нетропсин и другие бис-нетропсины уменьшают скорость раскручивания минимального дуплекса OriS рекомбинантной хеликазой. Они также уменьшают скорость раскручивания АТ-богатой шпильки в однотяговом олигонуклеотиде OriS* (63 нуклеотида). Исследована антивирусная активность бис-нетропсинов в культуре клеток и их лечебное действие в опытах на лабораторных животных, инфицированных вирусом герпеса.

**КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕНОСА ВЕЩЕСТВА ЧЕРЕЗ
КЛЕТОЧНЫЕ МЕМБРАНЫ****Computer modeling of trafficking across cell membranes****Гуртовенко А.А.^{1,2}**

1 – Институт высокомолекулярных соединений РАН,
199004, г. Санкт-Петербург, Большой пр. 31;

² – Санкт-Петербургский государственный университет,
198504, г. Санкт-Петербург, Петродворец, Ульяновская ул. 1

Тел.: +7(812)3285601; факс: +7(812)3286869;

e-mail: a.gurtovenko@biosimu.org;

web: biosimu.org

Перенос вещества через клеточные мембраны играет ключевую роль в различных физиологических процессах в клетках. Кроме того, он представляет значительный интерес для биотехнологических и биомедицинских приложений, таких как адресная доставка терапевтических молекул в клетки-мишени. В целом, проницаемость клеточных мембран во многом определяется свойствами липидного бислоя, который служит матрицей для мембранных белков и характеризуется наличием внутренней гидрофобной области. Поэтому небольшие гидрофобные и полярные молекулы способны сравнительно легко диффундировать через мембраны, в то время как трансмембранный пассивный транспорт полярных молекул большой молекулярной массы и – в особенности – заряженных молекул затруднен. В этом случае один из наиболее вероятных механизмов пассивного переноса молекул через мембраны связан с формированием в мембране временных гидрофильных пор [1]. В данной работе мы используем компьютерное моделирование (метод молекулярной динамики) для изучения процессов формирования пор в модельных фосфолипидных мембранах под действием сильного электрического поля (электропорация), а также в присутствии небольших амфифильных молекул, таких как диметилсульфоксид (ДМСО). На основе атомистических моделей в работе было показано, что процесс формирования заполненной водой поры практически не зависит от типа внешнего воздействия на мембрану и начинается с возникновения временных гидрофильных дефектов на границе раздела фаз липиды/вода, за которым следует переориентация полярных головных групп липидов во внутреннюю часть мембраны. На примере моновалентных ионов соли и липидных молекул было продемонстрировано, что образовавшиеся гидрофильные поры в значительной степени облегчают перенос вещества через мембрану, т.е. повышают ее проницаемость [1].

1. Gurtovenko A.A., Anwar J., Vattulainen I. Defect-mediated trafficking across cell membranes: Insights from in silico modeling // *Chemical Reviews*. 2010. V. 110. P. 6077-6103.

**ВЫЖИВАЕМОСТЬ И РАЗМНОЖЕНИЕ ГЕТЕРОТРОФНЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ В ОТСУТСТВИЕ ОРГАНИЧЕСКОГО СУБСТРАТА****Survival and multiplication of the heterotrophe microorganisms without organic
substrates***Гусев В.А.*

Институт математики им. С.Л. Соболева СО РАН, 630090, Новосибирск, пр. ак. Коптюга, 4;
Тел.: 8(383)3634-520; факс: 8(383)333-2598; e-mail: vgus@math.nsc.ru

Начиная с середины 50-х годов в литературе стали эпизодически появляться публикации о том, что их авторы сталкиваются с необычным явлением амплификации некоторых гетеротрофных микроорганизмов в чистом физрастворе и других солевых буферах [1, 2]. Был даже введена специальная терминология – амплификация в условиях «следового количества органических субстратов» [3]. Это позволило авторам опубликовать результаты, которые в корне противоречили «здоровому смыслу». Дело в том, что гетеротрофы, для роста которых считалось необходимым наличие органических субстратов и сбалансированной солевой среды, не должны размножаться в солевых буферах, физрастворе и тем более в обычной дистиллированной воде. Это – непогрешимый постулат, парадигма микробиологов.

Все это являлось серьезным доводом, на основании которого были фактически отвергнуты результаты работ, выполненные в середине 50-х годов. Длительное время микробиологи пытались объяснить размножение микроорганизмов в неадекватных условиях тем, что живые клетки питаются отмирающими, используя их в качестве криптического субстрата [4]. Несомненно, что нет оснований отрицать такую возможность для поддержания в течение некоторого времени жизнеспособности клеток. Однако, объяснить их размножение таким путем уже невозможно – второй закон термодинамики запрещает этот процесс.

Эти результаты, а также современные данные о природных сообществах микроорганизмов [5], сохраняющих длительное время жизнеспособность в условиях, при которых они согласно той же микробиологической парадигме «обязаны» только вымирать (например, в глубине Антарктического льда) не позволяют просто отмахнуться от них. Под давлением этих фактов необходимо провести скрупулезный анализ и пересмотр микробиологической парадигмы для объяснения неукладывающихся в нее экспериментальных данных.

Методологический подход, развиваемый в данной монографии, выходит за рамки биологических представлений и наряду с биологическими оперирует физическими понятиями. Целью данной работы является систематизация экспериментального материала о динамике гетеротрофных микроорганизмов в бессубстратных условиях и построение обобщенной биофизической модели этого явления. *Елин В.Л./ Микробиол. 1957. Т.XXVI. С.17-21.*

1. Калинин В.О./ Микробиол. 1957. Т.XXVI. С. 148 – 153.
2. Мясник М.Н. // Всесоюзное совещание «Управляемый биосинтез и биофизика популяций. Красноярск, 1969. С. 287 – 288.
3. Головлев Е.Л. /Микробиология, 1998.Т. 67. С. 725 – 735.
4. Kulakov L.A., McAllister M.B. et al. /Appl. Environ. Microbiology, 2002. V. 68. P. 1548-1555.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ОПОСРЕДОВАННОГО БЕЛКОМ VirE2 НАКОПЛЕНИЯ
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ КЛЕТКАМИ HeLa****VirE2-dependent oligonucleotides accumulation by HeLa cells****Гусев Ю.С., Волохина И.В., Чумаков М.И.**

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
410049, Саратов, просп. Энтузиастов, 13;
Тел.: +7(8452)97-04-44; факс: +7(8452)97-03-83; e-mail: chumakov@ibppm.sgu.ru

Лечение заболеваний с помощью доставки генов в клетку (генотерапия) является перспективным направлением в медицине. Известно, что агробактериальная Т-ДНК является уникальным природным вектором, который переносится при участии белков VirE2 и VirD2 в геном растительных клеток [1]. В 2001 году впервые было показано, что агробактерии могут неизвестным способом оставлять Т-ДНК в животные клетки [2]. Возможность использование элементов транспортной системы доставки Т-ДНК агробактерий в растительную клетку для доставки ДНК в животную клетку рассматривается в данной работе. В частности, считается, что белок VirE2 может обеспечивать перенос одноцепочечной (оц) ДНК через искусственную мембрану, формируя пору [3]. Целью данной работы было изучение методами *in vitro* и *in silico* способности белка VirE2 участвовать в переносе олигонуклеотидов в клетки HeLa.

Представлены данные о возможности накопления олигонуклеотидов в нативных клетках HeLa в присутствии рекомбинатного белка VirE2. В частности, с помощью оптических методов зарегистрировано увеличение флуоресценции клеток HeLa после инкубации с FAM-мечеными олигонуклеотидами (25 н.о.) в присутствии белка VirE2 на 56%, по сравнению с клетками, инкубированными только с олигонуклеотидами, что означает, что белок VirE2 каким-то образом способствует накоплению олигонуклеотидов [4].

Чтобы определить возможную роль эндоцитоза в поглощении олигонуклеотидов клетки HeLa были предварительно обработаны ингибиторами дыхания карбонил цианид м-хлорфенилгидразоном (КЦХФГ) и азидом натрия. Преинкубация клеток HeLa с 5 мкМ КЦХФГ приводит к снижению флуоресценции на 26%, по сравнению с клетками без обработки. Азид натрия в концентрации 10 мМ еще в большей степени (на 51%) снижает уровень флуоресценции. Т.е. блокировка дыхания в значительной степени снижает активность накопления флуоресцентно-меченных олигонуклеотидов в клетках HeLa, однако часть олигонуклеотидов накапливается клетками HeLa благодаря присутствию белка VirE2. Компьютерными методами созданы и проанализированы надмолекулярные комплексы из двух и четырех субъединиц белка VirE2, которые могут обеспечить транспорт оцДНК через поровые структуры.

Работа частично поддержана грантом РФФИ №11-04-01331а.

1. Чумаков М.И. / Слово. Саратов, 2001. 256с.
2. Kunik T., Tzfiga T. et al. / PNAS, 2001. V.98. P.1871–1876.
3. Чумаков М.И., Мазилев С.И. и др. / Биомембраны, 2010. Т.27. С.449-454.
4. Volokhina I.V., Gusev Yu.S. et al. / J. Bioinform. Comput. Biol., 2012. V.10. P.1241009.

ШАПЕРОННЫЙ ЭФФЕКТ ЛИПИДНОГО МАТРИКСА НА ПОРИН OMPF *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS***Chaperon effect of lipid matrix on porin YOmpF of *Yersinia pseudotuberculosis***

**Давыдова Л.А.¹, Санина Н.М.¹, Бахолдина С. И.², Портнягина О. Ю.²,
Новикова О.Д.², Богданов М.В.³, Соловьева Т.Ф.²**

1 – Дальневосточный федеральный университет, 690650 Владивосток, ул. Суханова 8.

Тел.: +7(423)2457779; факс: +7(423)249510; e-mail: l.vorobushek@mail.ru

2 – Тихоокеанский институт биоорганической химии, 690022 Владивосток, ул.

Проспект 100 Владивостоку, 159

3 – University of Texas-Houston Medical School, Houston, TX,
1111 Andover Drive, Pearland, Texas 77584 USA.

Липиды мембран образуют динамичный жидкокристаллический матрикс, способный передавать внешние сигналы в клетку и стимулировать адаптационные механизмы пойкилотермных организмов. Предполагается, что компенсаторные физико-химические изменения в липидном матриксе мембран при адаптации пойкилотермных организмов необходимы для оптимизации функциональных свойств мембранных белков в новых условиях существования.

Порины YOmpF – белки наружной мембраны грам-отрицательной бактерии *Yersinia pseudotuberculosis* образуют трансмембранные каналы. С одной стороны, порины представляют собой молекулы-мишени для иммунной системы организма-хозяина, а с другой — выступают как факторы вирулентности и патогенеза [1]. Конформация порина в клетке бактерии, а, следовательно, и его функции, вероятно, определяются физико-химическими свойствами липидного окружения. В связи с этим, целью настоящей работы являлось изучение эффекта адаптационных изменений липидного матрикса *Y. pseudotuberculosis* на конформационное состояние порина YOmpF.

Бактерии, выращивали при 8 °С в питательном бульоне без перемешивания и при перемешивании. В первом случае липиды экстрагировали из микробов без обработки фенолом (№1), а во втором – после обработки фенолом (№2). Показано, что фенольная обработка бактерий, даже выращенных в условиях аэрации, значительно стимулирует образование лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭ), что приводит к повышению температуры фазового перехода липидов йерсинии на 23 °С. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии установлено, что энергия активации процесса денатурации порина в липидном окружении повышается в ряду: порин → порин+липид №1 → порин+липид №2. Следовательно, порин становится более устойчивым к термоденатурации, когда находится в липидном окружении. Причем липид, содержащий повышенное количество ЛФЭ, проявляет более сильные шаперонные свойства. Методом иммуноблоттинга показано, что ЛФЭ эффективно препятствует образованию денатурированной формы мономера порина при повышенных температурах. Этот эффект зависит от концентрации ЛФЭ прямо противоположен при низких и высоких температурах.

Работа поддерживается грантами Министерства образования и науки РФ (Госзадания 4.2007.2011 и 4.583.2011, Госконтракт ПЗ40) и Правительства РФ (грант для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих учёных в российских вузах, контракт 11.G34.31.0010).

ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МОЗГА КРЫС ПРИ ГИПОТЕРМИИ**Temperature dependence of electrical activity of rat brain at hypothermia****Джамалудинова К., Рабаданова З.Г., Абдурахманов Р.Г., Мейланов И.С.**Дагестанский государственный университет. Махачкала. М.Гаджиева, 43а.
Email: meylanovis@mail.ru

Гипотермия используется в медицинской практике при операциях на сердце и мозге, но сама является серьёзным фактором риска. У крыс электроэнцефалограмма (ЭЭГ) становится плоской при ректальной температуре примерно 20°C. Ниже этой температуры риск летального исхода резко возрастает. В 1967 году группа Гершеновича З.Г. обнаружила, что внутривентрикулярное введение крысам мочевины в дозе 100 мг на 100 г живого веса существенно повышает выживаемость крыс при глубокой гипотермии. Нами было показано, что введение мочевины снижает критическую температуру тела, при которой ЭЭГ становится плоской. Аналог мочевины ацетамид в той же дозе также снижает критическую температуру для ЭЭГ. Однако диметилмочевина не оказывает влияния на критическую температуру для ЭЭГ. Недавно было обнаружено, что блокатор кальциевых каналов L-типа нифедипин увеличивает выделение глутамата в срезах мозга крыс в концентрациях от нескольких микромолей до нескольких наномолей. Причём этот эффект не связан с его способностью блокировать кальциевые каналы. Мы исследовали влияние введения нифедипина в дозе 5 мг на кг веса тела на ЭЭГ крыс при общей гипотермии. Нифедипин незначительно снижал критическую температуру ЭЭГ, при этом он существенно подавлял волну Осборна на электрокардиограмме. Исследование спектра мощности крыс ЭЭГ в цикле охлаждение-согревание показало, что перед охлаждением при температуре тела 36-37°C в спектре мощности ЭЭГ доминируют низкие частоты. Однако при снижении температуры тела до 33-32°C в спектре ЭЭГ появляется мощная полоса, соответствующая диапазону тета-ритма (6-9 Гц). При дальнейшем снижении температуры тела эта полоса смещается в область низких частот вплоть до 0.5 Гц, и, наконец, при температуре тела ниже 20°C ЭЭГ становится плоской. При согревании крыс после гипотермии картина изменений ЭЭГ обратна – при температуре тела 22-26°C появляется полоса тета-ритма, которая по мере повышения температуры тела смещается в область высоких частот. При температуре тела 37°C спектр мощности вновь становится сплошным в диапазоне 0 – 25 Гц с доминированием низких частот. Снижение температуры тела приводит также к изменению распределения потенциалов на ЭЭГ. При высоких температурах тела распределение биопотенциалов близко к нормальному (гауссовому). Однако при низких температурах тела распределение биопотенциалов становится полимодальным, что говорит о разной чувствительности нейронов к низким температурам. Механизмы влияния мочевины и её аналогов на критическую температуру ЭЭГ не вполне ясны. Наиболее вероятная гипотеза – это осмотический механизм. Однако не все экспериментальные данные согласуются с этой гипотезой.

**ПЛАВЛЕНИЕ ДНК В СПЕКТРАХ МАНДЕЛЬШТАМ-БРИЛЛЮЭНОВСКОГО
РАССЕЯНИЯ СВЕТА****Melting of DNA in spectrum of Mandelshtam-Brilluanov light dispersion****Дмитриев А.В.^{1,2}, Федосеев А.И.², Захаров Г.³ Лушников С.Г.², Савватеева-
Попова Е.В.³**¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия²Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе, Санкт-Петербург, Россия³Институт физиологии им. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

В последнее десятилетие активно исследуются фазовые превращения ДНК, белков, и других биополимеров, которые могут приводить к изменению их активности и функции. Под фазовыми превращениями биополимеров подразумеваются изменения пространственной структуры макромолекулы под влиянием внешних факторов (температуры, давления, и т.д.). Одним из наименее изученных вопросов является поведение колебательного спектра макромолекулы при изменении пространственной структуры, или иначе говоря – динамика макромолекулы при фазовом превращении. Настоящая работа посвящена исследованию низкочастотной (диапазон частот от 1 до 1000 ГГц) динамики ДНК при плавлении. Известно, что низкочастотная динамика биополимеров обычно отражает локальные конформационные изменения, т.е. прыжки атомов от одной конфигурации к другой, и коллективные возбуждения. Динамика биополимеров в этом диапазоне частот имеет много общего с динамикой стекол, переохлажденных жидкостей и других конденсированных сред. Одним из наиболее перспективных методов, который позволяет исследовать низкочастотную динамику биополимеров является мандельштам-бриллюэновское рассеяние света [1,2].

В настоящей работе изучалась низкочастотная динамика ДНК при ее плавлении с помощью мандельштам-бриллюэновского рассеяния света. В качестве образца использовался раствор ДНК в натрий-фосфатном буфере (pH = 7,5). Образец ДНК, длиной в 120 нуклеотидов, была получена с помощью полимеразной цепной реакции из геномной ДНК дрожофилы. Очистка проводилась по стандартной методике очистки с этанолом.

Эксперименты проводились с помощью трехпроходного, пьезосканируемого интерферометра Фабри-Перо в 1800 геометрии рассеяния. В качестве источника света использовался аргоновый лазер с длиной волны $\lambda = 488$ нм. Измерения проводились на растворах с концентрацией ДНК 100 мкг/мл, в диапазоне температур от 20 до 900 С.

Было показано, что скорость гиперзвука испытывает аномалию в области теоретической температуры плавления. При этих же температурах наблюдается аномалия в затухании гиперзвуковых волн. Результаты работы анализируются в рамках современных представлений физики конденсированных сред.

КАК ОПРЕДЕЛИТЬ РАЗМЕР ЗАРОДЫША АМИЛОИДА ИЗ КОНЦЕНТРАЦИОННОЙ ЗАВИСИМОСТИ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЛАГ ПЕРИОДА? ПРИЛОЖЕНИЕ: ИНСУЛИН**How to determine the size of nucleus from the concentration dependence of lag-time duration? Application: insulin*****Довидченко Н.В.¹, Суворина М.Ю.¹, Селиванова О.М.¹, Елисеева И.А.¹, Сурин А.К.¹, Шматченко В.В.², Финкельштейн А.В.¹, Галзитская О.В.¹***¹ – Институт белка РАН, 142290, Московская обл., Пушкино, ул. Институтская, 4;² – Институт микробиологии РАН, 142290, Московская обл., Пушкино, ул. Институтская, 6
Тел.: +7(4967) 318275; e-mail: ogalzit@vega.protres.ru

Разная морфология фибрилл может являться следствием сходных, но не идентичных путей формирования зрелых протофибрилл. Отличия могут закладываться в начале пути формирования фибрилл, в том числе и на стадии нуклеации. Вопрос о размере зародышей протофибрилл, образованных разными белками и пептидами, до настоящего времени остается открытым. При нуклеационном механизме образование протофибриллы начинается с термодинамически невыгодных шагов, в результате которых образуется «критический зародыш» из n мономеров. В нашей работе предложена кинетическая модель процесса амилоидообразования, позволяющая рассчитывать размер зародыша по определенным кинетическим данным. Данная модель включает в себя, помимо нуклеации, как линейный рост протофибриллы (происходящий только за счет присоединения мономеров к ее концам), так и экспоненциальный рост протофибриллы за счет ее ветвления и дробления. Полученное аналитическое решение и компьютерное моделирование позволяют определить размер зародыша амилоида из экспериментально полученных концентрационных зависимостей отношения длительности лаг-периода к времени роста амилоидных фибрилл. В случае инсулина, это отношение не зависит от концентрации белка, что, согласно разработанной теории, соответствует размеру зародыша в один мономер.

Работа выполнена при поддержке Программ "Молекулярная и клеточная биология" и "Фундаментальные науки – медицине" Президиума РАН, грантами РФФИ (11-04-00763, 10-04-00162а).

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕНЫХ ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВЫХ ВЕЗИКУЛ С ДНК В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ ДВУХВАЛЕНТНЫХ МЕТАЛЛОВ**Interaction fluorescence probes of phosphatidylcholine vesicles and DNA in presence metal cations (II)****Дойникова А.Н.¹, Золесе Дж.², Жданов Р.И.¹**¹Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета 420008, г.Казань ул. Кремлевская, 18.

Тел. +79179164124, +79518960336; e-mail: student1612@mail.ru

²Университет г. Анкона, Италия

Комплексы нуклеиновых кислот и катионных липидов широко используются как липоплексы в протоколах генотерапии (1). Амфифильные липиды и везикулы на их основе реже используются для переноса терапевтических генов. Однако нейтральные и даже отрицательно заряженные липиды имеют определенные перспективы для направленного транспорта в целях генотерапии, поскольку они могут нести адресные группы, например, пептидные векторы типа сигнала ядерной локализации, или олигосахаридные векторы. Поэтому исследование структурно-функциональных взаимоотношений в таких нанокомплексах актуально. В частности, имеется определенный интерес к использованию в геном переносе нуклеометаллолипосом – тройных комплексов амфифильных липосом, ионов металлов (II) и ДНК/РНК (2). С этой целью нами был проведен анализ свойств комплексов ДНК с фосфатидилхолиновыми везикулами в присутствие и без ионов металлов (Ca (II) и Zn (II), 5 mM) методом флуоресцентных зондов (3). В работе были использованы: дуплекс поли А-полиУ в качестве нуклеиновой кислоты, и ТМА-DPH, в качестве зонда для полярных областей биомембраны и DPH, в качестве зонда для гидрофобных областей мембраны. Флуоресцентные спектры регистрировались для флуоресцентно-меченых монобислойных фосфатидилхолиновых нановезикул (85 +/- 15 нм) в присутствие и без ионов металлов, а также для флуоресцентно-меченых тройных комплексов с полиА/У дуплексами РНК. Результаты изучения поляризации флуоресценции и анизотропии флуоресценции показали, что полярный зонд, локализующийся в полярной области везикул, чувствителен к взаимодействию везикул с нуклеиновой кислотой, а гидрофобный зонд не чувствителен. Таким образом, метод флуоресцентных зондов перспективен для изучения подобных тройных систем.

1. Zhdanov R.I., Bogdanenko E.V., Moscovtsev A.A. et al (2003) *Methods in Enzymol.* 373: 433-465

2. Жданов Р.И., Шмырина А.С., Жданов А.Р. и соавт. (2005) Доклады Акад.наук, 2005,405,118-122.

3. Zolese G. et al (2005) *J. Lipid Res.* 46: 17-27

КРИБАНК УНИКАЛЬНЫХ ГЕНОМОВ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**Unique genomes cryobank of the Republic of Belarus**

Дромашко С.Е., Макеева Е.Н., Квитко О.В.

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Республика Беларусь,
220072, Минск, ул. Академическая, 27;
Тел.: +375(17)284-21-90; факс: +375(17)284-19-17; e-mail: S.Dromashko@igc.bas-net.by

В Институте генетики и цитологии НАН Беларуси в течение ряда лет проводятся исследования, имеющие важное научное и практическое значение. Проводится генетическое тестирование растений и животных по уникальным хозяйственно-ценным признакам, начаты работы по генетическому тестированию животных, внесенных в Красную книгу Республики Беларусь.

Особое место в общей программе проводимых работ занимают ДНК-анализы, направленные на выявление предрасположенности человека к тем или иным многофакторным заболеваниям (сердечнососудистым, диабету 2-го типа, остеопорозу, бронхиальной астме, нарушению нормального физиологического течения беременности); определение индивидуальных реакций человека на те или иные лекарства с учетом их генетической составляющей, т.е. с установлением этнографического происхождения далеких предков по материнской и отцовской линиям.

Проводится изучение связей спортивных достижений людей с генами, ответственными за развитие и контроль функций, необходимых для спортивного совершенствования. К наиболее важным наследственным факторам, необходимым для достижения высоких спортивных результатов, относятся гены, определяющие функции сердечнососудистой системы и кислородного обмена.

Таким образом, в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси уже имеется коллекция образцов ДНК изученных растений, животных и людей, которая может стать основой криобанка ДНК уникальных геномов, а также оборудование для их хранения.

Разрабатываются клеточные технологии для медицины и сельского хозяйства, включая средства диагностики и терапии онкологических заболеваний, способы культивирования и анализа стволовых и дифференцированных клеток для регенеративной медицины и санитарного тестирования ксенобиотиков, а также для продуцирования эмбрионов сельскохозяйственных животных *in vitro*. В ходе перечисленных исследований, включающих продолжительное культивирование клеток, получены уникальные постоянные клеточные линии, представляющие значительную ценность для разработок клеточных технологий. Для сохранения и использования в работе имеющихся и вновь получаемых, а также известных в мировой литературе клеточных линий, необходимо создание коллекций клеточных культур.

Нами подан проект в программу партнерского участия ЮНЕСКО на создание криобанка, задачей которого станет сбор и длительное (десяtkи лет) сохранение биологического материала, несущего полную генетическую информацию о редких и исчезающих видах растений и животных, занесенных в Красную книгу Республики Беларусь.

ИНДУКЦИЯ α,ω -ДИКАРБОНОВЫМИ КИСЛОТАМИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ**Induction of a nonspecific permeability of the inner membrane of liver mitochondria by α,ω -dicarboxylic acids****Дубинин М.В. , Адакеева С.И. , Иванова А.Е. , Самарцев В.Н.**Марийский государственный университет, 424001, Йошкар-Ола, пл. Ленина, 1
Факс:(836-2) 56-57-81; e-mail: samvic56@mail.ru

Известно, что монокарбоновые жирные кислоты способны индуцировать Ca^{2+} -зависимую неспецифическую проницаемость внутренней мембраны митохондрий (открытие поры) по нечувствительному к циклоспорино А (ЦСА) механизму [1]. Представляет интерес исследовать действие их метаболитов – α,ω -дикарбоновых жирных кислот, как потенциальных индукторов открытия поры по аналогичному механизму. В настоящей работе была использована α,ω -гексадекандиоловая кислота (ГДК), которая образуется в клетках печени путем ω -окисления пальмитиновой кислоты [2].

Установлено, что внесение ГДК в концентрации 10 – 20 мкМ к нагруженным Ca^{2+} или Sr^{2+} митохондриям приводит к высокоамплитудному набуханию органелл и выходу этих ионов из матрикса. ЦСА, будучи предварительно добавленный к митохондриям, не ингибировал наблюдаемые процессы. Ингибитор кальциевого унипортера рутениевый красный, блокирующий вход Ca^{2+} в матрикс митохондрий, препятствовал открытию поры. Аналогичным образом действовал хелатор Ca^{2+} и Sr^{2+} ЭГТА, а также АТФ и АДФ, также обладающие хелатирующим эффектом. Бычий сывороточный альбумин (БСА), будучи предварительно добавленный к митохондриям, лишь увеличивал лаг-период высокоамплитудного набухания. В то же время БСА существенно ингибировал набухание, индуцированное пальмитиновой кислотой. По-видимому, это связано с тем, что дикарбоновые кислоты на порядок хуже связываются БСА, чем их монокарбоновые аналоги [3]. В экспериментах с высокомолекулярным ($M_n=36$ кДа) полиэтиленгликолем (ПЭГ) установлено, что пора, индуцированная Ca^{2+} и ГДК, способна самопроизвольно закрываться. Это согласуется с результатами, полученными ранее при использовании монокарбоновых жирных кислот как индукторов проницаемости [1].

Таким образом, естественные метаболиты монокарбоновых жирных кислот – α,ω -дикарбоновые кислоты, также способны индуцировать неспецифическую Ca^{2+} -зависимую ЦСА- нечувствительную проницаемость внутренней мембраны митохондрий печени.

1. Sultan A., Sokolove P.M. / Arch Biochem Biophys., 2001. V.386(1). P.37-51.
2. Ferdinandusse S., Denis S., Van Roermund C.W., Wanders R.J., Dacremont G. / J Lipid Res., 2004. V.45(6). P. 1104-1111.
3. Tongsard J.H., Meredith S.C. / Biochem J., 1991. V. 276(3). P.569-575.

ОЖИРЕНИЕ, ДИАБЕТ 2-ГО ТИПА И ДИСФУНКЦИЯ ЖИРОВОЙ ТКАНИ**Obesity, type 2 diabetes and adipose tissue dysfunction****Дынкин В.В., Туровский Е.А., Долгачева Л.П., Зинченко В.П**Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 3;
Тел.: 8-4967-739162, e-mail: vpz@mail.ru

Высокий уровень циркулирующих в крови длинноцепочечных жирных кислот (LCFA) и других факторов при избыточном весе и ожирении являются причинами развития атеросклероза и диабета 2-го типа (D2T). В представлениях о регуляции липолиза основное внимание уделяется контролю уровня cAMP при действии норадреналина и инсулина и в меньшей степени cGMP. Менее изучены механизмы регуляции липогенеза и связь процессов липогенеза и липолиза с адипогенезом. Практически не исследована роль Ca²⁺ в регуляции этих процессов. В условиях ожирения и последующего развития D2T, жировая ткань из активного буфера триглицеридов и LCFA, регулятора уровня LCFA в крови и важного эндокринного органа превращается в орган – продуцент воспалительных цитокинов (TNF α , IL-6 и др.), в котором имеет место дисфункция адипоцитов. Ключевую роль в этой дисфункции играют нарушения в регуляция Ca²⁺-обмена, возникающая в присутствии избытка LCFA. Проведенные нами исследования показывают, что наряду с хорошо изученным сигнальным путем G α q \rightarrow PLC \rightarrow IP3 \rightarrow IP3R \rightarrow Ca²⁺ важную роль в регуляции Ca²⁺-гомеостаза клеток эндокринных и гладкомышечных органов и тканей играет другой сигнальный путь, в котором происходит конвергенция сигналов, идущих от различных гормонов и трансмиттеров на уровне G β γ субъединиц G-белков: G β γ \rightarrow PI3K γ \rightarrow PKB \rightarrow eNOS \rightarrow NO \rightarrow sGC \rightarrow cGMP \rightarrow PKG \rightarrow CD38 \rightarrow cADPR \rightarrow RyR \rightarrow Ca²⁺. Формирование нескольких петель обратной связи в этой системе обеспечивает сложное динамичное поведение системы реакций Ca²⁺-обмена, включая: колебания, волны и триггерные переключения системы в состояния с высоким значением Ca²⁺_i. Следствием «хронического» функционирования системы в условиях высоких значений Ca²⁺_i (400-600нМ) может быть активация Ca²⁺-зависимых ядерных факторов, приводящих к активации сигнальных путей с участием NFAT, NF- κ B и др., к подавлению гиперплазии и адипогенеза и стимуляции гипертрофии адипоцитов. Таким образом, в основе «необратимого» развития заболеваний, связанных с ожирением и токсичным действием избытка LCFA лежит сложная динамичная организация системы регуляции Ca²⁺-сигнализации адипоцитов, основанная на функционировании большого числа положительных и отрицательных обратных связей в системе. Анализ механизмов регуляции такой системы может позволить разработать методы коррекции таких патологических состояний как дисфункция жировой ткани, дисфункция поджелудочной железы и эндотелия при ожирении и D2T.

**ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФЕРРЕДОКСИНА С ФНР И ГИДРОГЕНАЗОЙ
МЕТОДОМ ПРЯМОГО МНОГЧАСТИЧНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ. ЗАВИСИМОСТЬ
РЕАКЦИИ ОТ pH И ИОННОЙ СИЛЫ****Study of ferredoxin interactions with FNR and hydrogenase using direct
multiparticle computer modeling. Dependency upon pH and ionic strength****Дьяконова А.Н.¹, Хрущев С.С.¹, Коваленко И.Б.¹, Ризниченко Г.Ю.¹**

¹ – кафедра биофизики Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова,
Москва, Ленинские горы, 119991, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
Тел. +7(499)939-02-89; e-mail: alex.diakonova@gmail.com

Белок ферредоксин (Фд) в электрон-транспортной цепи фотосинтеза переносит электроны от фотосистемы I на ферредоксин-НАДФ+-редуктазу (ФНР). В некоторых фотосинтезирующих организмах, таких как цианобактерии и зеленые одноклеточные водоросли, в анаэробных условиях Фд переносит электроны не на ФНР, а на гидрогеназу – фермент, катализирующий восстановление атомарного водорода до H₂. В электрон-транспортной цепи фотосинтеза ФНР и гидрогеназа конкурируют за ферредоксин [1]. Молекулярный водород может служить биотопливом, и разработка методов его получения при помощи микроорганизмов является важным направлением биоэнергетики. Встает вопрос, при каких характеристиках среды в строме тилакоида возможно переключение электронного потока с линейного транспорта ФСІ–Фд–ФНР-НАДФ+ на путь ФСІ–Фд–гидрогеназа-H₂.

Для исследования использован метод прямого многочастичного моделирования [2], рассматривающий белки как индивидуальные объекты, испытывающие броуновское движение и электрические взаимодействия, и позволяющий описывать образование белок-белковых комплексов в растворе, содержащем десятки-сотни белков каждого типа.

На модели исследовано влияние pH и ионной силы на процесс взаимодействия белков Фд-ФНР и Фд-гидрогеназа. Построено поверхностное распределение электрического потенциала на белках Фд, ФНР, гидрогеназе при разных значениях pH и ионной силы. Получены зависимости константы скорости образования комплексов ферредоксин-ФНР и ферредоксин-гидрогеназа от ионной силы и pH. Показано, что зависимости кинетических констант имеют колоколообразную форму, причем при значениях pH 5-9 константы практически не изменяются. Зависимость константы связывания Фд и ФНР от ионной силы также имеет немонотонный характер с максимумом в области 100-150 мМ, когда как зависимость константы для Фд и гидрогеназы монотонно убывает. Дальнейшие исследования предполагают моделирование системы Фд – ФНР – гидрогеназа.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 11-04-01019.

1. Yacobi I., Pochekailov S., Toporik H., Ghirardi M.L., King P.W., Zhang S. Photosynthetic electron partitioning between [Fe-Fe]-hydrogenase and ferredoxin:NADP+-oxidoreductase (FNR) enzymes in vitro / PNAS, 2011. T. 108. C. 9396-9401.

2. Kovalenko I.B., Abaturova A.M., Diakonova A.N., Knyazeva O.S., Ustinin D.M., Khrushchev S.S., Riznichenko G.Yu., Rubina A.B. Computer simulation of protein-protein association in photosynthesis / Mathematical Modeling of Natural Phenomena, 2011. T. 6. C. 39-54.

**ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛОК-ЛИГАНДНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕТОДОМ
МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА. КОМПЛЕКС ДЕФЕНЗИН-ФОСФОЛИПИД****The study of protein-ligand interaction by molecular docking approach. Defensin-phospholipid complex****Ермакова Е.А., Хайрутдинов Б.И., Зуев Ю.Ф.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, 420111, Казань, ул. Лобачевского 2/31, а/я 30.

Тел.: +7(843)231-90-37; факс: +7(843)292-73-47; e-mail: khayrutdinov@yahoo.com

Понимание механизма взаимодействия белков с различными лигандами является одной из ключевых проблем современной биофизики. Методы компьютерного моделирования все чаще применяются для исследования механизма молекулярного распознавания и образования комплексов биомолекул. С целью получения более быстрого способа моделирования различного типа комплексов в последнее время активно развивается метод, который получил название докинг.

Дефензины — катионные пептиды иммунной системы играющие активную роль в биологических процессах. Известно, что они обладают способностью встраиваться в мембраны растений бактерий, грибов и многих оболочечных и безоболочечных вирусов. Однако механизм взаимодействия дефензинов с мембранами остается неизученным.

В данной работе проведено исследование взаимодействия растительного дефензина с различными монофосфолипидами, а также с поверхностью фосфолипидного бислоя методом докинг. Определены вероятность образования белок-лигандного комплекса, а также энергия взаимодействия молекул и константы диссоциации комплексов. Выявлены те аминокислотные остатки белка, которые дают наибольший вклад в энергию взаимодействия с лигандами. Показано, что движущей силой образования комплексов дефензина с монофосфолипидами являются Ван-дер-Ваальсовое взаимодействие и сольватационный эффект.

При взаимодействии дефензина с поверхностью фосфолипидного бислоя основной вклад в энергию взаимодействия дает электростатическое взаимодействие. Определены сайты специфического связывания белка, показано, что специфичность взаимодействия проявляется в различной ориентации белка относительно поверхности мембраны.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №12-04-01286-а.

**ГРАНИЧНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН ОТРАЖАЕТ
ИЗМЕНЕНИЯ В УПАКОВКЕ ЛИПИДОВ, СУЩЕСТВЕННЫЕ ДЛЯ РАБОТЫ
МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАНАЛОВ**

**Boundary potential of lipid membrane reports on the changes in lipid packing
essential for mechanosensitive channels activity**

Ермаков Ю.А.

Институт физической химии и электрохимии им. А.Н.Фrumкина РАН
110971, Москва, Ленинский пр.31.стр.4.
Тел/факс. (495)952-5582, e-mail yermakov@elchem.ac.ru

Функционирование белков в клеточных мембранах существенно зависит от состава и физических характеристик липидного матрикса. Эта зависимость была в явном виде доказана в случае встроенных в липидный бислой механочувствительных каналов E.Coli., конформация которых в открытом и закрытом состояниях существенно различна, а переход между ними регулируется натяжением мембраны. Более того, блокирование этих каналов катионами Gd³⁺ происходит лишь в том случае, когда в составе мембраны присутствует фосфатидилсерин (PS) [1]. Для исследования особых свойств молекул PS были использованы электрокинетические измерения в суспензии липосом, титрационная калориметрия, регистрация граничного потенциала плоских бислоидных липидных мембран (БЛМ) методом компенсации внутримембранного поля и техника липидных монослоев Ленгмюра. Электростатические измерения показали, что именно молекулы PS ответственны за увеличение дипольной компоненты граничного потенциала мембран при адсорбции высокоафинных катионов Gd³⁺ и Be²⁺ [2,3]. Электрокинетические и калориметрические данные свидетельствуют о высокой эффективности адсорбции таких катионов в микромолярной области концентраций, соответствующей константам связывания порядка 10⁴ М⁻¹. Граничный потенциал плоских БЛМ и Вольта потенциал липидных монослоев обнаруживают примерно одинаковое увеличение дипольного потенциала при адсорбции катионов или в области перехода монослоя липидов из жидкого в состояние геля. Диаграммы сжатия липидных монослоев демонстрируют взаимосвязь изменений Вольта потенциала и сжимаемости монослоя [4]. Для количественного анализа таких данных предложена феноменологическая модель, которая позволяет описать форму соответствующих кривых, учитывая изменение упругих характеристик фосфолипида при переходе от «жидкого» к «твердому» состояниями. Эта модель позволяет количественно описать изменение латерального давления и Вольта потенциала монослоя при встраивании в него заряженных молекул хлорпромазина, которые поддерживают открытое состояние механочувствительных каналов.

1. Ermakov Yu.A., Kamaraju K., Sengupta K., Sukharev S.I. Biophys.J. 2010. V.98(6), 1018-1027
2. Ермаков Ю.А., Авербах А.З., Арбузова А.Б., Сухарев С.И. Биол. мембраны. 1998. Т.15(3), 330-341.
3. Ermakov Y.A., Averbakh A.Z., Yusipovich A.I., Sukharev S. Biophys.J. 2001.V.80(4), 1851-1862
4. Ермаков Ю.А. Биологические мембраны. 2011. Т.28(5), 408-414.

ХИРАЛЬНОСТЬ СТРУКТУРНЫХ МОТИВОВ В БЕЛКАХ**Handedness of structural motifs in proteins****А.В. Ефимов**

Институт белка РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 4, Московская обл.;
Тел.: 8(4967)31-84-40; факс: 8(495)514-02-18; Эл. почта: efimov@protres.ru

В настоящей работе термин хиральность означает свойство белковых структур существовать в правой или левой форме. В белках многие структуры существуют преимущественно в одной форме. Простейшей структурой такого типа является α -спираль, которая в белках практически всегда находится в правой форме. Большинство β -листов в белках скручены с образованием правопропеллерных структур, а сильно скрученные длинные β -шпильки образуют своеобразные двойные суперспирали правого смысла. Многие известные структурные мотивы с уникальными укладками цепи также содержат элементы (часто это различные суперспирали) с определенной хиральностью. Так, например, $\beta\alpha\beta$ -единицы, из которых состоят все укладки по Россманну, включая 5s и 7s α/β -мотивы, представляют собой правые суперспирали. В abcd- и abCd-единицах имеются аналогичные правые суперспирали bcd и bCd, соответственно. В белках с ортогональной упаковкой β -слоев встречаются более сложные правые суперспирали, включающие в себя S- и Z-образные β -листы. Всего в докладе рассматривается более десяти структурных мотивов с уникальной хиральностью и приводятся данные о том, что они широко распространены в белках.

Свойство этих и других рассмотренных структур существовать преимущественно в одной (правой или левой) форме имеет важнейшее значение как для сворачивания белков *in vivo* и *in vitro* так и для теоретического моделирования белковых структур, поскольку резко (во многих случаях наполовину) сокращает число разрешенных структур полипептидной цепи. Все это значительно упрощает поиск и отбор уникальных белковых структур.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 10-04-00727).

РОЛЬ ДИПОЛЬНЫХ МОДИФИКАТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ КАНАЛООБРАЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИЕНОвого АНТИБИОТИКА ФИЛИПИНА В ЛИПИДНЫХ БИСЛОЯХ**The role of dipole modifiers in the regulation of channel-forming activity of polyene antibiotic filipin in the lipid bilayers****Ефимова С.С., Остроумова О.С., Щагина Л.В.**Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, 4
Тел.: +7(812)297-24-60; факс: +7(812)297-03-41; e-mail: ssefimova@mail.ru

Полиеновые макролидные антибиотики занимают особое место среди лекарственных препаратов, поскольку они применяются для лечения системных микозов. Полиены связываются со стеринами, находящимися в мембранах клеток-мишеней, формируют ионные каналы, в результате чего нарушается водно-электролитный баланс клетки, и грибковая клетка гибнет. Литературные данные свидетельствуют о том, что дипольные модификаторы мембран, агенты способные изменять величину скачка потенциала на границе раздела фаз бислоем-раствор, влияют на каналобразующую активность антимикробных агентов [1, 2]. В связи с этим перспективно изучение влияния дипольных модификаторов на равновесный полиен-индуцированный трансмембранный ток (I). Простейшим по структуре представителем класса полиенов является пентаен филипин. Целью работы являлось установление эффекта дипольных модификаторов (флоретина, кверцетина и RH 421) на каналобразующую активность филипина в стерин-содержащих мембранах, омываемых 2 М КСl (рН 7.0). Формирование бислоевых липидных мембран проводили по методу Монтала и Мюллера [3] из смеси дифитаноилфосфохолина (ФХ) и холестерина (ФХ:Хол = 67:33 М%) или ФХ и эргостерина (ФХ:Эрг = 67:33 М%).

Результаты исследований показали, что при добавке 20 мкМ флоретина происходит незначительный рост I в 2.2 ± 0.7 и 2.8 ± 0.8 раза в ФХ:Хол-бислоях и ФХ:Эрг-мембранах, соответственно, а присутствие 20 мкМ кверцетина увеличивает I в 11.0 ± 4.1 раза в ФХ:Хол-мембранах и в 10.4 ± 3.1 раза в ФХ:Эрг-бислоях. При этом, введение 5 мкМ RH 421 в растворы, омывающие ФХ:Хол-мембраны и ФХ:Эрг-бислои, практически не изменяет I. Эффект дипольных модификаторов на I не зависит от вида стерина и не коррелирует с их влиянием на дипольный потенциал бислоев. Анализ полученных результатов позволяет предположить, что увеличение I при введении флоретина и кверцетина является следствием непосредственного взаимодействия этих агентов с филипиновыми каналами за счет Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (№12-04-00948), Программы Президиума РАН «МКБ» и гранта Президента РФ (МК-1813.2012.4).

1. Ostroumova O.S., Kaulin Y.A., Gurnev P.A., Schagina L.V. / *Langmuir*, 2007, V. 23. P. 6889-6892.
2. Ostroumova O.S., Malev V.V., Ilin M.G., Schagina L.V. / *Langmuir*, 2010, V. 26. P. 15092-15097.
3. Montal M. and Muller P. / *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, V. 65. P. 3561-3566.

**СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ ПРИРОДНЫХ ДНК-СВЯЗАННЫХ ЛИПИДОВ:
ЛИПИДНЫЙ КОД ГЕНОМНОЙ ДНК****Structure and function of natural DNA-bound lipids: lipid code of genomic DNA****Жданов Р.И.**

Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18
Тел. +79375272800; e-mail: rzhdanov@ksu.ru

Комплексы нуклеиновых кислот с липидами приобрели большую известность в связи с использованием в направленном транспорте генов (1,2). Однако крайне важным остается исследование роли липидов при передаче сигнала, при контакте ДНК с мембранами, в митохондриях и в хроматине (3). Была выделена фракция липидов, прочно связанная с геномной ДНК прокариот даже в присутствии детергентов (4). Исследована специфичность взаимодействия ДНК и липидов: от простых молекул нейтральных липидов (холестерин, жирные кислоты) до более сложных (диглицериды, фосфо- и сфинголипиды) в зависимости от последовательности оснований и вторичной структуры с целью поиска новых векторных структур (5). Проведено титрование олиго- или полинуклеотидов нуклеиновых кислот липидами с регистрацией результатов различными физико-химическими и физическими методами: спектрофотометрией, спектроскопией кругового дихроизма, плазмонным резонансом, с помощью микроципов ДНК, кондуктометрических хемосенсоров, атомно-силовой микроскопии (5). Нами показано, что нейтральные липиды – жирные кислоты и холестерин – взаимодействуют с АТ-богатыми ДНК на основе «узнавания», т.е. связывается не более одной молекулы липида на 1 виток, а с ЦГ-богатыми ДНК – на основе «насыщения», т.е. на виток может связываться 2 и более молекул липида. Для более сложных липидов, например, кардиолипина, показано, что взаимодействие не зависит от последовательности оснований в ДНК и обнаружено, как для АТ-, так и для ЦГ-богатых ДНК. Методы докинга и молекулярной механики и динамики (6,7), использованные для моделирования и докинга комплексов нуклеиновых кислот и липидов с целью расчета их стабильности, строения и динамики, в основном, подтвердили наши результаты. Эти компьютерные эксперименты выявили большую стабильность комплексов липидов по малой бороздке ДНК и решающую роль ван-дер-ваальсовых сил и гидрофобных взаимодействий в комплексообразовании (7). На основе полученных результатов осуществлен поиск и конструирование новых липоплексов ДНК и липидов, которые могут быть использованы для невирусной доставки генов. Сформулирована гипотеза о существовании липидного кода геномной ДНК: липидные молекулы могут быть связаны в геномной ДНК в определенной последовательности.

1. Zhdanov R.I., Bogdanenko E.V. et al. / *Methods in Enzymol.*, 2003. Vol. 373, p.433-465.
2. Duzgunes N., Konopka N., Zhdanov R.I. et al / *Curr. Med. Chem.* 2003.Vol.10, p. 911-918.
3. Struchkov V.A., Strazhevskaya N.B. et al. / *Bioelectrochem.*, 2002. Vol.58, p. 23-31.
4. Zhdanov R.I., Shmyrina A.S. et al. / *FEMS Microbiol. Lett.*, 2006. Vol. 265, p.151-158.
5. Zhdanov R.I., Strazhevskaya N.B. et al. J. *Biomol. Str. Dynamics*, 2002. Vol. 20, p. 232-243.
6. Дьячков Е.П., Ибрагимова М.Я., Дьячков П.Н., Жданов Р.И. / Ученые записки Казанского университета. Естественные науки. 2011. Т. 153, № 1, С. 86-96.
7. Тарасов Д.С., Ибрагимова М.Я. и др. / Доклады Акад. Наук, 2012. Т. 447.

О ПРИРОДЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ КОМПЛЕКСОВ А-ЛАКТАЛЬБУМИНА И ОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ**Cytotoxicity mechanism of α lactalbumin – oleic acid complexes****Жерелова О.М.¹, Катаев А.А.², Грищенко В.М.³**¹ – Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино, Моск. обл.² – Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, Моск. обл.
Тел. 8 (4967)73-91-55; факс: 8 (4967)33-05-09; E-mail: aakka@rambler.ru,³ – Институт биологического приборостроения РАН, 142290, Пущино, Моск. обл.

Более 10 лет ведутся исследования белково-липидных комплексов на основе α -лактальбумина (α -Ла) и олеиновой кислоты (О.К.), обладающих цитотоксической и апоптозной активностями и названных HAMLET или BAMLLET (Human or Bovine Alpha-lactalbumin Made LEthal to Tumor cells). Было сделано предположение, что носителем цитотоксичности и противораковой активности в комплексах является О.К., сама обладающая этими свойствами. До сих пор неизвестно, каким образом HAMLET – подобные комплексы взаимодействуют с клеточными мембранами и проникая в цитоплазму, вызывают апоптоз клетки. Эксперименты с искусственными мембранами разного липидного состава не дали однозначного ответа на этот вопрос. Вероятнее всего, процесс проникновения белок-липидных комплексов в клетку-мишень может осуществляться через их взаимодействие с рецепторами или другими элементами плазмалеммы. Это предположение до сих пор является гипотетическим и не имеет экспериментального подтверждения. Для решения этой задачи были использованы в качестве реальной модели гигантские клетки харовой водоросли *Chara corallina*, которая хорошо изучена электрофизиологически. Наличие в её плазмалемме ионных каналов, практически идентичных каналам животных клеток, даёт возможность исследовать на этом простом и доступном объекте механизмы взаимодействия биологически активных соединений с ионтранспортными системами клеточной мембраны. Было показано, что введение 20 мкМ комплекса из α – лактальбумина и олеиновой кислоты (LA-OA) в омывающий клетку раствор (что соответствует 120 мкМ свободной О.К.) индуцировало исчезновение входящего тока. Это, прежде всего, свидетельствует о ее взаимодействии со структурами Ca и Cl каналов. При этом наблюдалось появление неспецифического тока утечки, что является следствием нарушения липидного матрикса. Аналогичные эффекты были получены при внеклеточном введении такой же концентрации свободной О.К. Таким образом О.К. в концентрации ≥ 100 мкМ индуцирует необратимые повреждения липидного матрикса плазмалеммы. Представленные здесь результаты дают основание сделать вывод о том, что решающая роль в транспорте HAMLET-подобных комплексов внутрь клетки принадлежит олеиновой кислоте. Обладая собственной цитотоксичностью и апоптозной активностью она дозозависимо (при концентрации ≥ 100 мкМ) разрушает фосфолипидный матрикс мембраны и проникает в клетку, индуцируя таким образом ее гибель.

СОДЕРЖАНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ С ОЧЕНЬ ДЛИННОЙ ЦЕПЬЮ В МЕМБРАНАХ МИТОХОНДРИЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА ВЛИЯЕТ НА МАКСИМАЛЬНЫЕ СКОРОСТИ ОКИСЛЕНИЯ NAD-ЗАВИСИМЫХ СУБСТРАТОВ

Contents of fatty acids with very long chane in the mitochondrial membrane of pea seedlings influence on the maximum rates oxidation of nad-dependent substrates

Жигачева И.В., Бурлакова Е.Б., Мишарина Т.А., Теренина М.Б., Крикунова Н.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук,
119334, Москва, ул. Косыгина, 4
Тел.: +7(495)-939-74-09; факс: +7(499)-137-41-01

Изменение ЖК состава мембран обуславливает адаптацию растений к различным видам стресса, в том числе, и к водному дефициту. Особый интерес представляют ЖК с очень длинной цепью (свыше 18 углеродных атомов) (ЖКОДЦ). Показано, что эти кислоты принимают участие в адаптации растений к осмотическому стрессу, обусловленному засолением. Концентрация ЖКОДЦ в сумме ЖК вегетативных органах галофитов составляет 4-64% и главными компонентами ЖКОДЦ были С20, С21, С22 и С23 ЖК [Иванова Т.В. и др., 2009]. Известно, что регуляторы роста и развития растений повышают устойчивость растений к биотическому и абиотическому стрессу, в том числе и к водному дефициту. Одним из таких регуляторов роста является мелафен, синтезированный в Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Российской академии наук и представляющий собой меламиновую соль бис(оксиметил)-фосфиновой кислоты. Цель работы состояла в выяснении влияния недостаточного увлажнения и регулятора роста и развития растений мелафена на ЖК состав липидов мембран и биоэнергетические характеристики митохондрий 5-дневных проростков гороха. Недостаточное увлажнение приводит к изменениям этого состава, которые выражаются в увеличении содержания насыщенных и снижении пула ненасыщенных ЖК с 18 и 20 углеродными атомами. Изменения в ЖК составе липидов мембран сопровождаются изменениями в энергетике митохондрий: происходит снижение эффективности окислительного фосфорилирования и скоростей окисления NAD-зависимых субстратов в присутствии АДФ или FCCP. Обработка семян 2 x 10⁻¹²М раствором мелафена предотвращает вызванные недостатком влаги изменения ЖК состава мембран митохондрий. Не происходят и изменения в максимальных скоростях окисления NAD-зависимых субстратов и эффективности окислительного фосфорилирования. При этом наблюдается четкая корреляция между максимальными скоростями окисления НАД-зависимых субстратов (скорости окисления НАД-зависимых субстратов в присутствии АДФ или FCCP), содержанием жирных кислот с 18 углеродными атомами ($r = 0,76489$) и жирных кислот с 20 углеродными атомами ($r = 0,9637$).

ЛОКАЛИЗАЦИЯ НОВОГО БЕНЗАНТРОНОВОГО ЗОНДА В ЛИПИДНОМ БИСЛОЕ ПО ДАННЫМ РЕЗОНАНСНОГО ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ

Lipid bilayer location of a new benzanthrone dye as revealed by resonance energy transfer

Житняковская О.А.¹, Трусова В.М.¹, Горбенко Г.П.¹, Кирилова Е.М.², Кирилов Г.К.², Калниня И.², Молотковский Ю.Г.³

¹ – Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, 61077, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина

² – Даугавпилский университет, 13 Виенибас, Даугавпилс LV5401, Латвия

³ – Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова Российской Академии наук,

117997, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, Россия

E-mail: olya_zhitniakivska@yahoo.com

Благодаря своей яркой флуоресценции, высокой термо- и фотостабильности, бензантронные зонды широко используются в биомедицинских исследованиях. Высокая чувствительность данных зондов к полярности окружения, делает их идеальными кандидатами для изучения структурных изменений мембран, белков и ДНК. Особый интерес представляют новые бензантронные красители с улучшенными спектральными свойствами. Цель данной работы заключалась в определении локализации нового флуоресцентного зонда А6 в модельных липидных мембранах с помощью метода индуктивно-резонансного переноса энергии. В качестве донора использовали антрилвинил-меченый фосфатидилхолин, а акцептора – хромофорная группа А6. Липосомы формировали из фосфатидилхолина и его смесей с кардиолипином и фосфатидилглицерином. Для количественной интерпретации экспериментальных данных использовали модель переноса энергии Фанга-Страера, учитывающую зависимость ориентационного фактора от расстояния. С помощью данной модели было определено расстояние между донором и акцептором, которое составило 1,5 нм для фосфатидилхолиновых антрилвинил-меченных липосом, 2,2 нм и 2 нм для кардиолипин- и фосфатидилглицериновых-содержащих липосом (5 мол % и 20 мол %, соответственно). Полученные результаты свидетельствуют о том, что добавление кардиолипина и фосфатидилглицерина в фосфатидилхолиновые липосомы затрудняет встраивание красителя в липидную фазу. Можно предположить, что краситель локализуется, наиболее вероятно, в полярной области мембраны, при этом глубина проникновения красителя уменьшается в зависимости от физико-химических свойств мембраны в ряду: фосфатидилхолиновые мембраны кардиолипин-содержащие мембраны фосфатидилглицерин-содержащие мембраны.

Данная работа выполнена при поддержке Государственного Фонда Фундаментальных Исследований Украины (проект № Ф.41.4/014).

КВАНТОВАЯ БИОФИЗИКА ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА**Журавлев А.И.**

Московская государственная академия ветеринарной медицины
и биотехнологии имени К.И.Скрябина, 109472, Москва, ул. Акад.Скрябина, д.23,
Тел. 8(495)377-77-16, 377-95-28; e-mail:mitinki@mail.ru

Квантовая биофизика-это раздел биологии, изучающий участие в метаболизме электронных возбужденных состояний (ЭВС) и излучаемых ими квантов. В настоящее время необходимо в учебные планы ввести этот курс, включающий 4 основные раздела с изучением ЭВС и их роли в биосубстратах.

Раздел 1. Эндогенное спонтанное сверхслабое свечение-ССС с поверхности органов живых животных и их биосубстратов. Б.Н.Тарусов, А.И.Поливода, А.И.Журавлев. Биофизика, 1961,№4, с.490. Явление ССС свидетельствует о функционировании эндогенных ЭВС при их прямом определении без каких-либо физических или химических воздействий, т.е. Без артефактов. ССС поставляет прямую информацию об ЭВС и косвенную о свободно-радикальном окислении. Определение ССС митохондрии дало возможность сформулировать представление о двухуровневой биоэнергетике животных. Невозможно полноценное изучение как свойств липидов, так и их метаболизма без изучения их ССС. ССС применяется в медицине: для ранней диагностики криза отторжения, дифференциальной диагностике ранних стадий рака легких и туберкулеза, характеристики атеросклероза и стрессорных состояний.

Раздел 2. Фотобиофизика. Раздел биофизики, изучающий синтез ЭВС под влиянием ВНЕШНИХ облучений светом и УФ при резонансном поглощении квантов веществом. Фотобиофизика создана трудами А.С.Теренина, Ю.А.Владимирова, С.В.Конева, И.Д.Волотовского и др. Фотобиофизика проявляет электронную структуру биологически активных мономеров и биополимеров, как основу их функциональной активности. Это наиболее изученный раздел квантовой биофизики.

Раздел 3. Ультразвуковое свечение воды и водных систем. Это незаслуженно мало изученный и преподаваемый раздел о квантовых явлениях в воде – основной среде (75%) наших организмов. А.И.Журавлев, В.Б.Акопян. «Ультразвуковое свечение». М.: НАУКА, 1977,134с. Индуцированное УЗ-свечение в видимой области возникает в чистой дистиллированной воде под влиянием газовой кавитации при интенсивностях УЗ до 0,4 Вт/см² при терапевтической частоте УЗ 0,9 Мг.Гц и усиливается при вакуумной кавитации выше 0,4 Вт/см². Некавитационное (без видимой кавитации) свечение воды наблюдается с 0,5 Вт/см² и сыворотки крови с 0,2 Вт/см², очевидно, за счет колебаний газовых микропузырьков. О.П.Цвылев обнаружил явление десятикратного усиления УЗ свечения при образовании стоячей волны в жидкостях, насыщенных газами АРГОН, усиливал свечение в 10 раз сильнее, чем азот, неон, кислород и др.газы. В растворах электролитов Zn⁺⁺ ослаблял УЗ свечение в 2 раза, а другие электролиты К⁺,Na⁺,Li⁺ усиливали в 2 раза. УЗ свечение – путь к изучению участия молекул воды в метаболизме ЭВС.

Раздел 4. Хемилюминесцентный анализ. Это определение активных метаболитов по возникновению свечения при их взаимодействии с введенными в систему: зондами люминола и люцигенина; перекисями; катализаторами: Fe⁺⁺, Zn⁺⁺,Co⁺⁺; люциферин-люциферозной системы с АТФ, и др., т.е. По возникновению инициированной хемилюминесценции.

МОДЕЛИРОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННОГО ПОВЕДЕНИЯ ЖИРНОКИСЛОТНЫХ ЦЕПЕЙ МЕТОДОМ МОНТЕ-КАРЛО

Monte Carlo simulation of conformational behavior of fatty acid chains

Журкин Д.В.¹, Рабинович А.Л.²

1 – Петрозаводский государственный университет,
185910, Петрозаводск, ул. Ленина, 33

2 – Институт биологии Карельского научного центра РАН,
185910, Петрозаводск, ул.Пушкинская, 11;

Тел.: +7(8142)57-18-79; факс: +7(8142)76-98-10; E-mail: rabinov@krc.karelia.ru

Компонентами молекул липидов, образующих основу биологических мембран, являются жирнокислотные цепи. Наиболее распространенные из них – неразветвленные, в значительной степени определяющие свойства липидного бислоя. Насчитываются многие десятки цепей, различающихся по химическому строению. Установление взаимосвязи между химическим строением цепей и физическими свойствами гидрофобной области бислоев является важнейшей задачей, исследуемой как экспериментальными, так и теоретическими методами. В работе описана специально разработанная вычислительная схема метода Монте-Карло (МК) для генерирования конформаций жирнокислотных цепей заданного строения. С ее помощью исследованы свойства типичных углеводородных компонентов молекул липидов биомембран. Генерирование конформаций проводится в 2 этапа. 1-й этап: все валентные связи и валентные углы фиксируются при равновесных значениях, а конформация генерируется только по торсионным углам (изменение каждого – в диапазоне от 0 до 360°). Используется выборка по значимости согласно энергии ближних взаимодействий цепи как суммы энергий ее фрагментов, содержащих по 3 последовательных взаимозависимых угла внутреннего вращения вокруг связей основной цепи. Учитывается торсионная энергия, энергия невалентных взаимодействий и электростатическая энергия. 2-й этап: осуществляется переход от внутренних переменных к декартовым координатам атомов и производятся небольшие смещения каждого атома, случайные по всем трем осям. Вычисляется итоговая энергия молекулы с учетом полного набора компонентов избранного силового поля. Учитывается вероятность генерирования каждой конформации, что позволяет получить несмещенную оценку средних значений в методе МК. Подход позволяет корректно проводить сравнение между собой средних характеристик цепей, вычисленных в рамках различных методов, в сходных условиях, при идентичных параметрах силовых полей. Рассчитаны характеристики совокупности жирнокислотных цепей разной степени ненасыщенности, – равновесная гибкость, параметры размеров и формы. Изучена зависимость этих свойств от температуры. Использовано поле CHARMM27, которое широко применяется в расчетах свойств липидных систем методом МД. Проведено сравнение МК-результатов с имеющимися экспериментальными данными и с результатами МД-моделирования этих же цепей, входящих в состав липидов бислоев.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 10-03-00201а) и программы Президента РФ “Ведущие научные школы” НШ-1642.2012.4.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ГИБРИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ ИЗ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ
РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ ПУРПУРНЫХ БАКТЕРИЙ *Rb. SPHAEROIDES*
И КВАНТОВЫХ ТОЧЕК В СОСТАВЕ ЛЕЦИТИНОВЫХ ЛИПОСОМ**

**The investigation of hybrid complexes composed from the *Rb. sphaeroides*
photosynthetic reaction centers and quantum dots in structure of lecithin liposomes**

**Загидуллин В.Э., Лукашев Е.П., Нокс П.П., Гришанова Н.П., Сейфуллина Н.Х.,
Пащенко В.З.**

Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова,
119991, Ленинские горы, 1, стр. 12

Тел.: +7(495)939-11-07; факс: +7(495)939-11-15; e-mail: vz.paschenko@gmail.com

Включение в липосомы мембранных белков фотореакционных центров (РЦ) и квантовых точек (КТ) в качестве антенны, способных поглощать свет значительно эффективнее природных светособирающих комплексов и передавать эту энергию к РЦ, открывает новые возможности применения таких гибридных систем в качестве основы искусственных фотопреобразующих устройств с большей эффективностью и стабильностью. РЦ *Rb. sphaeroides* и КТ с максимумом флуоресценции при 530 нм (CdSe/ZnS с гидрофильным покрытием из полиэтиленгликоля) внедряли в лецитиновые липосомы экструзией раствора мультислойных липидных везикул через поликарбонатную мембрану с порами 0,1 мкм или в результате диализа липида с белком, диспергированного избытком детергента. Размеры получаемых гибридных систем оценивали на основе динамического светорассеяния и по результатам просвечивающей криоэлектронной микроскопии. Для «экструзионных» липосом характерна выраженная на микрофотографиях двухслойность с диаметром внутреннего слоя около 60 нм, внешнего – 120 нм. Липосомы, получаемые при помощи диализа, типично представлены сферами диаметром около 25 нм и более крупными структурами продолговатой формы с размерами 25-30 нм на 120-250 нм, получаемыми в результате слияния более мелких частиц. По данным электрофореза сами КТ не диффундируют в агарозном геле под действием электрического поля – пятно флуоресценции возбуждаемых УФ светом КТ оставалось на старте. Липосомы с КТ диффундировали в поле, пятно свечения размывалось (очевидно из-за распределения липосом по размерам) и ослабевало – видимо, результат частичного тушения флуоресценции КТ фосфолипидами. Об эффективном взаимодействии РЦ с КТ в составе липосом свидетельствуют спектры возбуждения флуоресценции фотоактивного Бхл РЦ (Р) в составе протеолипосом, содержащих КТ: наблюдается сильное увеличение флуоресценции Р за счет поглощения световой энергии КТ и ее переноса к РЦ. Эффективное тушение возбужденного состояния КТ в результате их взаимодействия с РЦ в составе липосом подтверждается также измерениями кинетики затухания флуоресценции КТ. Функциональная активность РЦ в составе гибридных комплексов полностью сохраняется. Более того, информативный показатель структурно-динамического состояния РЦ, регулирующего его активность – время темновой рекомбинации фоторазделенных между Р и первичным хинонным акцептором зарядов – практически не меняется при нагревании препаратов вплоть до 60°C, в отличие от РЦ в буфере.

Работа поддержана Минобразования РФ (проект №16.513.11.3078) и РФФИ (гранты № 10-04-00769 и 11-04-01617).

ЭФФЕКТ ГЕТЕРОГЕННОСТИ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ

Effect of Heterogeneity of Sodium Channels

Зайцев А.В.¹, Ким К.Х.¹, Смирнова Е.Ю.², Чижов А.В.²

1 – Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
194021, Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44;

2 – Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН,
194021, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д.26
Тел.: +7(921)593-99-62; e-mail: elena.smirnova@mail.ioffe.ru

В работе была изучена зависимость частоты потенциалов действия пирамидных нейронов префронтальной коры и медиальной преоптической области гипоталамуса крысы от силы деполяризующего тока и мембранной проводимости, используя метод динамического клампа. Показано, что область спайковой активности нейрона на плоскости тока и проводимости имеет форму «языка», специфичную для разных типов нейронов. Также была разработана математическая модель, которая описывала спайковую активность пирамидного нейрона при разных значениях силы тока и проводимости. В отличие от предложенных ранее моделей, данная модель включала два типа натриевых каналов, различающихся порогами активации и инактивации, что позволило существенно улучшить ее возможности описания экспериментальных данных.

Результаты:

1) Экспериментально методом динамического пэтч-клатпа получены зависимости частоты спайков нейрона от входных сигналов – синаптического тока и мембранной проводимости.

2) Построенная модель нейрона с двумя типами потенциал-зависимых натриевых каналов оказалась наиболее согласованной с экспериментом. Это свидетельствует в пользу предположения о том, что существенной характеристикой нейрона может быть гетерогенность натриевых каналов.

**ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ
ПОТЕРИ УСТОЙЧИВОСТИ ГОМЕОСТАЗА ЭРИТРОЦИТОВ ПОСЛЕ ВЗЯТИЯ
ДОНОРСКОЙ КРОВИ**

**A probable mechanism for erythrocytes homeostasis stability loss after donor
blood sampling**

Зайцева Г.В., Зарицкий А.Р., Краснова М.А., Маслова М.Н.

ФГБУН Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН,
11999, Москва, Ленинский проспект, д.53
Тел.: 8-910-428-91-40; e-mail: mashavin@mail.ru

Данная работа касается проблем хранения донорской крови человека. После взятия из организма частично утрачиваются ее нативные свойства. Возможной причиной такой утраты является потеря устойчивости гомеостаза эритроцитов. Выяснение механизма указанного нарушения метаболизма эритроцитов является целью данной работы. Объектом исследования являются эритроциты человека. Метод исследования заключается в анализе кинетики проточного гомеостатирования основных параметров энергетического метаболизма этих клеток — показателя кислотности pH, концентрации АТФ (пАТФ) и количества липидов в мембранах. На фазовой плоскости (пАТФ, pH), для исследования устойчивости метаболизма эритроцитов, были получены кривые баланса скоростей роста и убыли указанных параметров. Состоянию эритроцитов *in vivo* соответствует пересечение этих кривых баланса в одной точке. После взятия крови из организма в эритроцитах изменяются скорости процессов метаболизма, что на фазовом портрете отразится в изменении взаимного расположения кривых баланса (в их смещении и/или деформации). При этом возможны два варианта. Первый – в исходной области (соответствующей параметрам *in vivo*) кривые баланса пересекаются в одной точке не будут, а пересекутся попарно. Метаболизм эритроцитов в этом случае будет характеризоваться появлением незатухающих колебаний его основных параметров. Второй вариант – в исходной области не будет даже попарного пересечения кривых. При этом метаболизм эритроцитов может перейти на другой уровень. Этот уровень будет характеризоваться более низкими, чем *in vivo*, концентрациями АТФ и другими значениями pH. В этом случае можно говорить о том, что произошла потеря устойчивости исходного состояния эритроцитов. Из проведенного анализа следует, что метаболизм эритроцитов *in vivo* имеет границы устойчивости по выбранным варьируемым параметрам – pH и пАТФ. Таким образом, на основе анализа кинетики основных параметров энергетического метаболизма эритроцитов (пАТФ, pH цитоплазмы и количества липидов в мембране) предложен возможный механизм потери устойчивости гомеостаза этих клеток после взятия донорской крови из организма. Были получены экспериментальные подтверждения предсказанных изменений энергетического метаболизма эритроцитов. Так обнаружены колебания концентрации глюкозы в плазме крови, величины проницаемости эритроцитарных мембран для кислорода и pH плазмы крови.

**АНАЛИЗ ЭКЗО- И ЭНДОГЕННЫХ ВЛИЯНИЙ НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ
СЕРДЕЧНОГО ЦИКЛА СУСЛИКА ПРИ РАЗОГРЕВЕ, ВЫЗВАННОМ
СПРОВОЦИРОВАННЫМ ПРОБУЖДЕНИЕМ****The analysis of exogenous and endogenous effects on duration of the cardiac cycle
of a ground squirrel at warming-up caused by provoked awakening****Захарова Н.М.¹, Асланиди К.Б.²**

1 – Институт биофизики клетки РАН,

2 – Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

^{1,2} – 142 290, Московская обл., г. Пушкино, ул. Институтская, д.3

Факс:+7(4967)33-05-09, e-mail: n.m.zakharova@gmail.com

До настоящего времени не получено количественных оценок режимов саморазогрева организма гибернантов, нет убедительных сведений о роли сердечно-сосудистой системы в этом процессе, а также о вкладе ЦНС в регуляцию сердечного ритма при пробуждении. Цель данной работы состоит в выявлении роли сердечно-сосудистой системы и ЦНС в процессе саморазогрева гибернанта в условиях спровоцированного пробуждения. Эксперименты проводились на длиннохвостых сусликах *S. Undulatus* с декабря по апрель. В процессе спровоцированного пробуждения суслика (при температурах внешней среды 2°C и 18°C), при ректальной температуре от 0°C до 37°C, кроме экзогенного нагрева, происходящего от контакта с окружающим воздухом и уменьшающимся по мере приближения температуры тела к температуре внешней среды (максимальная мощность порядка 4,5 Вт), происходило последовательное подключение, как минимум, 3 эндогенных источников саморазогрева. Первый источник, мощностью менее 0,4 Вт, включался в начале пробуждения, второй, мощностью около 1,0 Вт – при достижении сердцем температуры 10-12°C, а третий, мощностью около 13,0 Вт – при температуре сердца 19-20°C. Каждому из источников соответствовала специфическая температурная зависимость продолжительности сердечного цикла. Температуры включения источников саморазогрева не зависели от температуры окружающей среды. На первом этапе разогрева от 0°C до 10°C зависимость продолжительности сердечного цикла (Δ , сек) от температуры (T , °C) аппроксимировалась прямой: $\Delta = -0,6829 T + 8,3196$, $R^2 = 0,8793$. На втором этапе в диапазоне от 10°C до 20°C получено: $\Delta = -0,179 T + 3,5764$, $R^2 = 0,7546$. На третьем этапе, выше 20°C: $\Delta = -0,0134 T + 0,6006$, $R^2 = 0,497$. При этом, в диапазоне 0°C – 20°C: $\Delta = -0,3727 T + 6,4834$, $R^2 = 0,8766$, а эта прямая параллельна линии тренда, полученной для изолированных сердец в диапазоне 0°C – 37°C ($\Delta = -0,3972 T + 12,828$). Анализ экспериментальных результатов, позволяет заключить, что изолированное сердце суслика обладает автономной регуляцией ритма, доминирующей в диапазоне 0°C – 20°C, а влияние симпатической и парасимпатической систем, гуморальные влияния и влияние ЦНС на паттерн сердечных сокращений *in vivo* становятся существенными при температурах, превышающих 20°C. Указанная температура *in vivo* не зависела от температуры окружающего воздуха. Предполагается, что аналогичная регуляция происходит и при спонтанном пробуждении гибернирующих животных в естественных условиях.

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИПАЗЫ *CANDIDA RUGOSA* В ПРИСУТСТВИИ МИЦЕЛЛ БЕТА-КАЗЕИНА**Enzymatic activity of lipase *Candida Rugosa* in the presence of beta-casein micelles****Захарченко Н.Л., Богданова Л.Р., Коннова Т.А., Зуев Ю.Ф.**

ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111, Казань, а/я 30
Тел.: +7(843)2926288; факс: +7(843)2927347; e-mail: natasha@mail.knc.ru

Исследование шапероноподобных свойств бета-казеина активно ведется последнее десятилетие. Молекула бета-казеина обладает гибкой и подвижной структурой лишь с небольшими элементами вторичной упаковки, что наряду с амфифильными свойствами обуславливает возможность образования в растворах супрамолекулярных структур – мицелл. В поиске ответа на вопрос о взаимосвязи структуры и шапероноподобной активности бета-казеина в отношении целевых белков активно исследуются рекомбинантные формы белка с минорными модификациями полипептидной цепи. Одним из направлений получения мутантных форм бета-казеина является введение цистеиновых остатков в полипептидную цепь, что приводит к образованию димерных или олигомерных форм белка с измененными ассоциативными свойствами. Однако, в исследованиях не всегда рассматривается влияние, которое оказывает бета-казеин на функциональную активность целевых белков. Ранее, нами было показано, что препятствуя агрегации алкогольдегидрогеназы, бета-казеин и его модифицированные формы тем не менее не всегда позволяют сохранить активность фермента [1]. В настоящей работе исследовалось влияние бета-казеина на ферментативную активность липазы *Candida Rugosa* в реакции гидролиза водонерастворимого субстрата п-нитрофениллаурата (ПНФЛ).

Было показано, что все формы бета-казеина существенно снижают активность липазы *Candida Rugosa* в реакции ферментативного гидролиза ПНФЛ. В то же время, в случае значительно менее гидрофобного субстрата п-нитрофенилацетата (ПНФА), активность липазы не менялась. Предполагается, что определяющим фактором снижающим активность фермента является взаимодействие бета-казеина с гидрофобным субстратом ПНФЛ. По всей видимости, происходит сольubilизация субстрата молекулами бета-казеина, в результате чего уменьшается его доступность для липазы.

1. Захарченко Н. Л., Коннова Т. А., Гоголева Н. Е., Файзуллин Д. А., Эртле Т., Зуев Ю. Ф. / Биоорг. Химия. 2012. 38. С. 223–228.

**РАСШИРЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ЦИТОБИОХИМИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ФУНКЦИЙ МИТОХОНДРИЙ РАЗРАБОТКОЙ ПРОГРАММЫ ОБСЧЁТА ЦВЕТНЫХ
МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИЗОБРАЖЕНИЙ**

**Extension of facilities of cytobiochemical determination of mitochondrial functions
by elaboration of computation of colour microscopic images**

**Захарченко М.В., Гуляев А.А. Захарченко А.В., Романова О.И., Хундерякова Н.В.,
Серая О.Ю., Маевский Е.И., Кондрашова М.Н.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
теоретической и экспериментальной биофизики РАН
142290, г. Пущино Московской обл., ул. Институтская, 3
Тел. +7 (495) 632-78-69; Факс: +7 (4967) 33-05-53; e-mail: office@iteb.ru

Посвящаем памяти Г.М.Франка,
стимулировавшего компьютеризованные исследования
связи структуры и функции микрообъектов.

Создан оригинальный вариант программы обсчета цветных видеомикроскопических изображений лимфоцитов в мазке крови при определении активности ферментов митохондрий разработанным ранее в нашей группе цитобioхимическим методом [1, 2]. ЦБХ метод обладает значительно большей чувствительностью к изменению состояния митохондрий в организме, благодаря сохранению биофизической структуры митохондрий, чем принятые биохимические и чисто цито-, гисто-химические методы.

По сравнению с традиционной обработкой в градациях серого цвета созданная программа позволяет чувствительнее выявлять отличия трех основных цветов используемых при определении активности дегидрогеназ митохондрий – синего диформаза, пурпурного – моноформаза и нейтрального красного. Существенным продвижением является реализация возможности измерять много уровней интенсивности окраски площади. Обычно они измеряются как суммарная площадь, что является очевидным искажением. Изменения площади митохондрий более чувствительно отражают изменения состояния организма, чем интенсивность окраски. По-видимому, измерения площади отражают изменения нативной структурной организации митохондрий в сеть, реагирующую распадом на возбуждение клетки. Цветная обработка позволяет работать с более короткими сроками инкубации до 15 мин, чем принято в традиционных исследованиях. Это представляет преимущество, так как чем короче срок инкубации, тем ближе измерения передают активность митохондрий в организме. Эта задача является в настоящее время актуальной для биомедицинских исследований как показатель ранних изменений на доклинической стадии заболеваний. Изложенное выше иллюстрируется примерами исследования активности сукцинатдегидрогеназы и α – кетоглутаратдегидрогеназы на животных при воздействии психоэмоционального стресса, у здоровых добровольцев и больных с разной тяжестью заболеваний.

Работа поддержана ФЦП России на 2007-2012 гг., N16.512.11.2117, ПФИ Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине»

1. Kondrashova M.N., Zakharchenko M.V., Khundryakova N.V. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2009, (41), С.:2036-2050.

2. Захарченко М.В., Хундерякова Н.В., Кондрашова М.Н. Биофизика, 2011, т.56(5), С.:840-847.

АКТИВАЦИЯ СИНТЕЗА АТФ ИОНАМИ БИКАРБОНАТА В ХЛОРОПЛАСТАХ: РОЛЬ КАРБОАНГИДРАЗЫ**Золотарёва Е.К., Онойко Е.Б., Полищук А.В., Семенихин А.В.**Институт ботаники им. Н.Г.Холодного НАН Украины, г. Киев, Украина, 01601
Тел: +380(44)272-32-31; факс: +380(44) 272-32-31; e-mail: membrana@ukr.net

От содержания HCO_3^- и активности карбоангидразы – фермента, катализирующей гидратацию углекислого газа и дегидратацию бикарбоната, зависит светозависимый протонный обмен в хлоропластах. Можно предполагать, что синтез АТФ стимулируется влствие активации протонного транспорта анионами HCO_3^- , однако до настоящего времени взаимосвязь этих процессов в условиях вариации концентрации $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ детально не изучена. В данной работе изучалась зависимость скорости фотофосфорилирования в изолированных хлоропластах шпината от рН в присутствии различных концентраций бикарбоната и ингибиторов карбоангидразы.

Хлоропласты класса „С” изолировали из листьев 40-дневных растений шпината (*Spinacea oleracea* L.). Концентрацию хлорофилла определяли по методу Арнона. Скорость фотофосфорилирования оценивали потенциометрическим и гексокиназным методом. Концентрация ингибиторов карбоангидразы ацетазоламида (АЗ) и этоксизоламида (ЭЗ) составляла 0,5 мМ.

В контроле синтез АТФ регистрировался при $\text{pH} > 7,0$, а максимальная его скорость наблюдалась при $\text{pH} 8,3 - 8,4$. В присутствии 3 – 8 мМ NaHCO_3 максимальная скорость синтеза АТФ не отличалась от контрольной, однако в диапазоне $\text{pH} 6,5 - 8,0$ она значительно превосходила контрольные значения. Особенно заметно фотофосфорилирование стимулировалось при $\text{pH} 7,0$ и менее, а по мере возрастания pH реакционной среды стимулирующее влияние добавленного бикарбоната на скорость синтеза АТФ снижалось.

Стимуляция фотофосфорилирования экзогенно добавленным бикарбонатом эффективно устранялась после непродолжительной (в течение 3х минут) инкубации хлоропластов в присутствии ингибиторов карбоангидразы – гидрофильного АА или липофильного ЭА. Эффект ингибиторов карбоангидразы был наиболее заметен при $\text{pH} 7,6$. В этих условиях скорость синтеза АТФ, превышавшая в присутствии 8 мМ бикарбоната контрольную в 2,7 раза, после добавления АА или ЭА снижалась и составила 125 и 130 % от контрольного значения, соответственно. Можно предполагать, что ускорение фотофосфорилирования в присутствии бикарбоната связано с его участием в протонном переносе от H^+ -генерирующих комплексов к АТФ-синтазе. Роль карбоангидразы, снимающей кинетические ограничения, связанные с взаимопревращениями форм угольной кислоты, состоит в этом случае в сохранении достаточно высокой концентрации свободного бикарбоната, акцептирующего протоны в центрах их освобождения. Очевидно, что связывание и перенос протонов парю $\text{HCO}_3^- / \text{H}_2\text{CO}_3$ наиболее эффективны вблизи константы ионизации угольной кислоты ($\text{pK} \sim 6,36$). При pH , сильно отличающихся от pK , количество протонов, связывающихся с бикарбонатом, падает. С этим, по-видимому, связана наблюдаемая в работе pH -зависимость стимулирующего действия бикарбоната на фотофосфорилирование. Данные свидетельствуют в пользу того, что скорость фотофосфорилирования зависит не только от концентрации бикарбоната, но и от активности карбоангидразы, обеспечивающей быструю трансформацию форм угольной кислоты и облегчающую, тем самым, удаление протонов из центров их освобождения.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ КОЛОРАДСКОГО ЖУКА

Physico-chemical characterization of Colorado potato beetle proteolytic enzymes

Ибрагимов Р.И., Цветков В.О., Шпирная И.А., Басырова А.М.

Башкирский государственный университет, 450076, г. Уфа, ул. Валиди, 32.
Тел.: +7(347)229-96-30; e-mail: zvetkovvo@rambler.ru

Гидролитические ферменты насекомых-вредителей представляют собой важное звено при взаимодействии насекомых с растениями, так как обеспечивают эффективное расщепление естественных полимеров, составляющих основу пищевого субстрата. Выделение, очистка, физико-химическая характеристика гидролаз представляет практический интерес с позиции создания экологически-безопасных средств защиты растений.

Целью данной работы было получение очищенных препаратов протеиназ из личинок колорадского жука и исследование их физико-химических параметров.

Выделение ферментов из экстракта тканевых гомогенатов насекомых осуществляли на аффинной колонке с иммобилизованным в ПААГ желатином. Для этого супернатант экстракта в трис-НСI-буфере, рН 8,0, наносили на колонку объемом 20 мл, элюцию осуществляли с помощью ацетатного буфера при рН 5,6. Ферментативную активность во фракциях элюата измеряли по гидролизу синтетического субстрата для протеиназ (БАП-НА). В ходе очистки было достигнуто повышение удельной активности ферментов более чем в 50 раз.

Очищенные ферменты насекомых проявляли активность в слабощелочной области рН, с максимумом значения около 8,5. Наиболее близки к ним по этому показателю аналогичные по функциональной активности катепсиноподобные и трипсиноподобные цистеиновые протеазы млекопитающих. Протеазы личинок проявляли высокую активность в диапазоне температур от 30 до 40 °С, их полная инактивация наступала при выдерживании растворов в течение 10 мин при температуре 70 °С. Молекулярный состав протеаз определяли методом двумерного электрофореза в 10%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. Оказалось, что очищенные ферменты жука представлены двумя гетерогенными группами низкомолекулярных и относительно высокомолекулярных молекул. Было выявлено 3 электрофоретических компонента белков с молекулярными массами около 25 кДа и 5 компонентов с массами около 70 кДа. Изоэлектрические точки всех выявленных белковых молекул находятся в слабокислой области рН (5-6). В соответствии со значениями молекулярных масс и изоэлектрических точек протеиназы жука, по-видимому, представляют собой различные формы катепсиноподобных цистеиновых протеиназ.

КАРДИОЛИПИН-ИНДУЦИРОВАННАЯ КОНДЕНСАЦИЯ ДНК**Cardiolipin-induced DNA assembly****Ибрагимова М.Я.^{1,2}, Крылов А.С.², Хохлов А.Р.³, Жданов Р.И.^{1,2}**

1 – Казанский (Приволжский) федеральный университет,
420008, Казань, ул. Кремлевская, 18;

2 – ФГБУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН,
125315, Москва, ул. Балтийская, 8;

3 – Физический факультет Московского государственного университета им. М.В.
Ломоносова, 119991, Москва, ул. Ленинские горы, 1;
Тел.: +7(843)233-73-07; e-mail: zrenad@gmail.com

Экспериментальное изучение взаимодействия кардиолипина с ДНК физико-химическими методами серьезно затруднено из-за различной растворимости этих соединений: ДНК хорошо растворяется в водных растворах, а кардиолипин – в органических растворителях. Успех применения тех или иных методов для исследования такой системы зависит как от подбора растворителей, так и от диапазона концентраций, необходимой для регистрации взаимодействия. Поскольку ассоциация ДНК с липидами специфична [1], для исследования этой системы мы титровали кардиолипином четыре полинуклеотида ДНК с различной последовательностью оснований: гомологичные (dA)_n.T_n и (dC)_n.(dG)_n и гетерологичные (dAT)_n.(TdA)_n и d(CG)_n.d(GC)_n.

Методами жидкостной хроматографии высокого давления и атомно-силовой микроскопии изучено взаимодействие ДНК с кардиолипином. Показано, что комплексы полинуклеотидов ДНК с кардиолипином имеют время выхода и форму пика на хроматограмме с регистрацией хемосенсором, отличающееся от времени выхода и формы пика исходной ДНК. Кристаллы агрегатов ДНК-кардиолипина имеют значительно большие размеры, чем сами нити исходных полинуклеотидов ДНК. Установлено, что кардиолипин способен кристаллизоваться с полинуклеотидами ДНК независимо от последовательности оснований, как с (dAT), так и с d(CG) богатыми. Ассоциация с кардиолипином была показана также методом спектрофотометрии для полинуклеотида (dA)_n.T_n. Этот факт может быть объяснен возможностью для каждой молекулы кардиолипина взаимодействовать одновременно с двумя молекулами ДНК, причем важную роль при этом играют гидрофобные и дисперсионные взаимодействия [2]. Это открывает возможность образования плотных агломератов ДНК. Таким образом, в настоящей работе нами представлено экспериментальное доказательство явления кардиолипин-индуцированной конденсации ДНК.

Работа выполнена в Казанском федеральном университете (гранты № бюджет 12-26, 2012-2014 г.г. и РФФИ 12-03-97089-р_поволжье) и при поддержке Фонда им. А.фон Гумбольдта, Бонн, Германия, грант № V-8121-(RUS)-1032332 (Р.И.).

1. Zhdanov R.I., Strazhevskaya N.B. et al. / J. Biomol. Str. Dynamics, 2002. V. 20. P.232-243.

2. Michanek A., Yanez M. et al. / Langmur, 2012. – Publication date: May 24, 2012. DOI: 10.1021/la204431q.

О СТРУКТУРНОЙ АДАПТАЦИИ АДГЕЗИОННЫХ МОЛЕКУЛ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН К ДЕЙСТВИЮ ОЛИГОПЕПТИДОВ

Иванова В.П.¹, Ковалева З.В.²

1 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова Российской академии наук, 194223, С.Петербург, пр. Тореза, 44;

2 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, 194064, С.Петербург, Тихорецкий пр. 4
Тел.: +7(812)552-79-01; факс: +7(812)552-30-12; e-mail: valet@iephb.ru

Ранее нами был выявлен в первичной структуре α -цепей коллагенов повторяющийся трипептидный модуль GER, способный регулировать адгезионные свойства фибробластов через изменение активности интегриновых рецепторов. Взаимодействие пептида GER с интегриновыми рецепторами возможно либо по RGD-связывающим участкам, либо по участкам, не содержащим RGD-узнающие последовательности. В обоих случаях пептид может блокировать частично сайты связывания у рецепторов или ограничивать доступ естественных лигандов к указанным сайтам взаимодействия, в результате чего происходит ингибирование клеточной адгезии. Оба трипептида GER и RGD имеют некоторое сходство в строении. В состав этих соединений входят остаток глицина, остаток положительно заряженной аминокислоты – аргинина и остаток отрицательно заряженной аминокислоты – аспарагиновой (у RGD) или глутаминовой (у GER) кислоты. Функционально значимыми для проявления химической реакционной способности являются аминокислотные остатки с заряженными боковыми радикалами, в данном случае Arg и Asp/Glu. Несмотря на то, что расположение реакционноспособных остатков у трипептидов RGD и GER отличается, вероятность образования электростатических связей между гуанидиновой группой и COOH-группой соответственно Arg и Glu, входящих в состав пептида GER, с RGD-узнающими последовательностями интегринов достаточно высока. Это связано с высокой конформационной подвижностью коротких пептидов в водных растворах и их способностью ввиду малых размеров приближаться на очень близкие расстояния к активным зонам рецепторных структур и формировать с ними устойчивые химические связи. При взаимодействии пептида GER с молекулами рецепторов возможны два варианта ориентации пептида относительно аминокислотной последовательности интегринов – параллельная или антипараллельная. В обоих случаях ввиду конформационной изменчивости трипептида возможно взаимодействие, как пары заряженных аминокислотных остатков, так и одного из двух указанных остатков (или Arg, или Glu) пептида GER с противоположно заряженными остатками аминокислот, локализованных в полипептидных цепях интегринового рецептора. Подобные взаимодействия приводят к локальному изменению заряда в рецепторной молекуле, а значит и к местным конформационным изменениям, которые в зависимости от условий окружения могут маскировать или демаскировать в интегринных эпитопы связывания, тем самым ослаблять или усиливать функциональную активность рецепторов.

ПЛАСТОКИНОН – УЧАСТНИК ВОССТАНОВЛЕНИЯ КИСЛОРОДА И РЕДОКС СИГНАЛИЗАЦИИ В ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ**Plastoquinone is the participant of both oxygen reduction and redox signalling in the photosynthetic plant cells****Иванов Б.Н., Борисова М.М., Козулева М.А., Найдов И.А., Хоробрых С.А.**Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 142290, Пущино
e-mail: ivboni@rambler.ru

Фотосинтетическая электрон-транспортная цепь (ФЭТЦ) хлоропластов – не только преобразователь световой энергии, но и чувствительный датчик изменений, происходящих в окружающей среде и в метаболизме растений. Одна из основных систем сигнализации в клетках растений, сопряженная с другими сигнальными системами, → система редокс сигнализации с участием активных форм кислорода (АФК). Хлоропласты – основной источник АФК в растениях на свету, поскольку кислород, всегда присутствующий в фотосинтезирующих клетках, – естественный акцептор электронов в ФЭТЦ.

Ферредоксин, часто предполагавшийся как основной восстановитель O_2 в хлоропластах, почти не участвует в этом процессе в присутствии НАДФ+. Акцепторная сторона Фотосистемы 1 (ФС1) и пластохиноновый пул (ПХ-пул) → места первичного восстановления O_2 в ФЭТЦ высших растений до супероксидного анион-радикала, $O_2^{\cdot-}$. С помощью ЭПР-спектроскопии и детекторов $O_2^{\cdot-}$, различающихся липофильностью, показано, что значительная часть супероксидных радикалов образуется внутри тилакоидной мембраны. Экспериментальные результаты свидетельствуют, что свободный пластосемихинон служит непосредственным восстановителем O_2 до $O_2^{\cdot-}$ в ПХ-пуле.

Вклад ПХ-пула в восстановление кислорода в ФЭТЦ до H_2O_2 существенно выше, чем его вклад в первичное восстановление молекул O_2 , и составляет более 50% при высокой интенсивности света. Найдено, что большая часть молекул H_2O_2 , как и супероксидных радикалов, образуется внутри тилакоидной мембраны. Полученные данные свидетельствуют о протекании в мембране тилакоидов реакции между $O_2^{\cdot-}$ и пластогидрохиноном, которая обеспечивает удаление радикалов $O_2^{\cdot-}$ и продуцирует менее реакционноспособные молекулы H_2O_2 . Двухфазная кинетика окисления восстановленного ПХ-пула в темноте хорошо описывается кинетической схемой, включающей эту реакцию.

Окислительно-восстановительное состояние ПХ-пула управляет многими адаптационными реакциями в растениях, например, 'приобретаемой системной акклиматизацией', и контролирует экспрессию хлоропластных и ядерных генов, кодирующих, в частности, апопротеины реакционных центров Фотосистем 1 и 2 и светособирающего комплекса II. Выдвигается предположение, что именно АФК являются первичными мессенджерами в сигнальных путях от ПХ-пула к хлоропластному и ядерному геномам, и что внутримембранная продукция H_2O_2 , наиболее важной сигнальной молекулы в клетке, обеспечивает специфическую сигнализацию как внутри хлоропласта, так и вне его. Показано, что выход H_2O_2 из хлоропластов в цитоплазму происходит через аквапорины.

ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ДЛЯ КИСЛОРОДА; ОЦЕНКА МЕТОДОМ ОСТАНОВЛЕННОГО ПОТОКА

Oxygen permeability of red blood cells membrane estimated by the stopped-flow method

Иванов И.И., Локтюшкин А.В., Гуськова Р.А., Федоров Г.Е., Васильев Н.С.

Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова,
119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12
Тел.: +7(495)939-33-15; факс: +7(495)939-11-15; e-mail: allokt@gmail.com

Мембранный транспорт малых незаряженных молекул, в том числе газов, все еще остается одним из наименее изученных разделов мембранного транспорта. Это обусловлено методическими трудностями измерения потока незаряженных частиц, а также недостатками теоретических представлений о природе процесса. Широкий ассортимент электрических методов регистрации мембранного транспорта не пригоден для изучения характеристик этого процесса, важных для понимания его механизма. Результаты же, полученные с помощью других методов (обычно косвенных) сильно различаются. В наибольшей степени это проявляется при определении характеристик проницаемости мембран для кислорода. Так, коэффициент проницаемости липидных мембран для кислорода, вычисленный из скорости его взаимодействия в мембранах с парамагнитными или флуоресцентными зондами, достигает ~ 2 м/с. Тот же параметр, полученный для синглетного кислорода, оценен как $\geq 2 \cdot 10^{-2}$ м/с. Близкая диффузионная подвижность кислорода в мембранах получена методом молекулярной динамики. Коэффициенты проницаемости искусственных липидных мембран, вычисленные непосредственно из их влияния на интенсивность трансмембранного потока кислорода, оказались еще ниже $\sim 10^{-4}$ м/с. Это побудило нас исследовать скорость переноса кислорода через мембрану эритроцита при оксигенации гемоглобина в клетке с помощью метода быстрого перемешивания (остановленного потока). Ранее в ряде лабораторий было показано, что корректное измерение барьерных свойств мембран эритроцитов для кислорода с помощью этого метода затруднено в результате влияния неперемешиваемого слоя на скорость процесса. Происходит это в результате того, что диффузия кислорода в окружающем клетку растворе не успевает за скоростью поглощения кислорода клеткой. В настоящей работе мы показали, что конвекционные потоки в турбулентном режиме перемешивания резко ускоряют поступление кислорода к поверхности клетки и измерили коэффициент проницаемости кислорода через мембрану эритроцитов в этих условиях. Величина коэффициента пропускания в норме составила $\leq 4 \cdot 10^{-3}$ м/с. С учетом полученной величины обсуждается проблема проницаемости биологических мембран для кислорода.

НОВЫЙ ИНГИБИТОР ТРИПСИНА ИЗ *SOLIDAGO CANADENSIS* L.**A novel trypsin inhibitor from *Solidago canadensis* L.****Иванов О.А.¹, Домаш В.И.¹, Гвоздева Е.Л.², Иевлева Е.В.², Валуева Т.А.²**

¹ – Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, 220072, Минск, ул. Академическая, 27

² – Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский проспект, 33, стр. 2

Тел.: +375(017) 284 20 34; факс +375(017) 284 18 53; e-mail: chem_10@tut.by

Solidago canadensis L. (золотарник канадский), – представитель семейства Asteraceae, – рассматривается как агрессивный инвазивный вид во многих странах Европы. В ранее проведенных нами исследованиях в корневищах этого вида растения была обнаружена значительная ингибиторная активность в отношении серинового протеиназы трипсина и показано, что она связана с основным белком корневищ. Это дало основания более подробно охарактеризовать белок-ингибитор из золотарника. Для его выделения и очистки использовалась ионообменная хроматография на DEAE-Sepharose fast flow со ступенчатым градиентом NaCl и двойная гель-хроматография на акрилексе P-30. В результате трехстадийной очистки белок-ингибитор был выделен в гомогенном состоянии, что было подтверждено при помощи SDS-ПААГ-электрофореза. Выделенный ингибитор обозначен нами как ScTI (*Solidago canadensis* Trypsin Inhibitor). По результатам проведенного MALDI масс-спектрометрического анализа установлено, что молекулярная масса белка составила 15 888 Да. Обнаружено, что в состав его молекулы входит 6 остатков цистеина, которые потенциально способны образовывать 3 дисульфидные связи. Частично расшифрована аминокислотная последовательность ScTI. Сравнение аминокислотной последовательности белка с последовательностями других ингибиторов из растений, выполненное с использованием базы данных MEROPS, показало, что ScTI относится к белкам-ингибиторам из семейства Кунитца. Это второй случай обнаружения ингибиторов этого семейства у Asteraceae.

Для изучения вторичной структуры ScTI использовался метод спектроскопии КД в дальней ультрафиолетовой области. Анализ полученного спектра КД показал, что в основе вторичной организации молекулы исследуемого ингибитора лежат β -слои ($39 \pm 4,3\%$), участки нерегулярной структуры ($43 \pm 3,8\%$) и β -изгибы ($9 \pm 3,3\%$). Так же в молекуле белка в незначительном количестве представлены α -спиралевидные участки ($5 \pm 3\%$) и 310-спирали ($3 \pm 2,5\%$).

Изучение специфичности действия ScTI на сериновые протеиназы выявило, что этот ингибитор эффективно подавляет активность трипсина и α -химотрипсина, но не обладает активностью по отношению к субтилизину и тромбину. При титровании ScTI как трипсином, так и α -химотрипсином установлено, что ингибитор взаимодействует с этими протеиназами в молярном отношении, равном 1 : 1.

При анализе некоторых физико-химических свойств ScTI было показано, что выделенный ингибитор является ограниченно термостабильным, но pH-устойчивым белком, в функциональную стабильность которого определенный вклад вносят дисульфидные связи.

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НОВЫХ КАТИОННЫХ ПАВ НА ОСНОВЕ ИЗОСТЕВИОЛА С
ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНОЙ****Interaction of new cationic isosteviol-based surfactants with lipid membrane**

**Идиятуллин Б.З.¹, Файзуллин Д.А.¹, Воронин М.А.², Захарова Л.Я.²,
Стробыкина И.Ю.²,
Катаев В.Е.², Зуев Ю.Ф.¹**

¹ – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д.2/31;

² – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра Российской академии наук, 420088, г. Казань, ул. Арбузова, дом 8
Тел.: +7(843)231-90-36; факс: +7(843) 292-73-47; e-mail: yufzuev@mail.ru

В качестве альтернативы вирусным векторам поиск новых катионных систем-переносчиков генов является актуальной задачей для генной терапии и для решения различных молекулярно-биологических задач. В частности для этого используют катионные поверхностно-активные вещества (ПАВ) [1], которые связываются с ДНК посредством электростатических взаимодействий. Катионные агенты защищают ДНК от деградации нуклеазами и являются посредником при проникновении в клетку и последующем высвобождении из эндосом, что повышает эффективность трансфекции.

Целью настоящей работы является исследование взаимодействия новых катионных ПАВ бромида и тозилата 19-нор-4альфа [9-(триэтиламмонио)-1,4,7-триоксанонилкарбонил] – 16-оксо-энт-бейерана (1) с модельными липидными мембранами. Отличительной особенностью 1 является наличие смешанной (ионной и неионной) головной группы и природного изостевиольного фрагмента. Органический тозилат- и неорганический бромид-противоионы различаются размером и прочностью связи с 1.

Методами тензиометрии, кондуктометрии, динамического светорассеяния и ЯМР-самодиффузии определены критическая концентрация мицеллизации обеих форм 1 и гидродинамический диаметр ассоциатов.

На основе данных УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии установлено, что 1 связывается с липидным бислоем дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ), причем бромид-1 понижает температуру фазового перехода, а тозилат-1 незначительно повышает ее. При мольном отношении бромид-1/ДПФХ больше 1:10 происходит процесс сольubilизации липида мицеллярными агрегатами ПАВ и разрушения бислоя.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 12-03-01085-а).

**КИНЕТИКА КВАЗИСТАТИЧЕСКОГО ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ
ЭЛЕКТРОННОГО ВОЗБУЖДЕНИЯ МЕЖДУ ПОДВИЖНЫМИ ФРАГМЕНТАМИ
БЕЛКОВЫХ ЦЕПЕЙ**

**Quasistatic electronic excitation energy transfer kinetics between mobile peptide
chain fragments**

Измоденова С.В., Кучеренко М.Г., Кручинин Н.Ю.

Оренбургский государственный университет, 460018, г. Оренбург, ГСП, пр. Победы, 13
Тел.: +7(3532) 37-24-57; факс: +7 (3532) 72-37-01; e-mail: rphys@mail.osu.ru

Исследована кинетика безызлучательного переноса энергии электронного возбуждения между молекулами, размещенными на подвижных фрагментах макромолекулярной цепи, адсорбированной на поверхности сферической (цилиндрической) нанополости (наночастицы). Произведено построение математической модели, включающей в себя два варианта радиального распределения звеньев полимера: с притяжением сегментов к стенкам поры и отталкиванием их от стенок с формированием максимума плотности в центре полости. Модель учитывает случайные изменения конформации макромолекулы, которые приводят к модуляции радиуса донор-акцепторного распределения в полости. Конформационная динамика фрагментов цепи представлена случайным блужданием с коэффициентом диффузии выделенного звена в окрестности минимума некоторого потенциального поля простой симметрии (сферическая прямоугольная или параболическая яма, двумерная миграция конца подвижного фрагмента на сфере). Получены выражения для кинетики распада возбужденного состояния донорного центра, закрепленного на мобильном сайте, в режиме его малоамплитудных смещений, в системе иммобилизованных на стенках полости акцепторных молекул. В инвертированной варианте задачи с подвижными фрагментами полимера связываются центры тушения, а электронно-возбужденные молекулы донора размещены на поверхности поры или наночастицы. В этом случае кинетика дезактивации системы существенно отличается от кинетики распада доноров, смещающихся вместе с подвижными участками макроцепи. Расчеты временных зависимостей населенностей возбужденных молекул люминесцентного зонда производились для различных коэффициентов диффузии фрагментов цепи и различных типах радиального размещения звеньев полимера в центральносимметричной или осесимметричной наноструктуре.

Измерения кинетики свечения бимолекулярного люминесцентного зонда в белок-захваченных адсорбентах могут дать информацию о структурных особенностях таких систем, а также о динамических свойствах адсорбированных макроцепей в белковых конъюгатах с фуллереновыми или тубуленовыми ядрами.

1. Кучеренко М.Г., Кручинин Н.Ю., Чмерева Т.М. / Вестник ОГУ, 2010. №5. С.124-135.

2. Измоденова С.В., Кучеренко М.Г. / Матер. всероссийской конференции «Фотоника органических и гибридных наноструктур». г. Черноголовка: ИПХФ РАН. 2011. С. 69.

**ПРИМЕНЕНИЕ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ДЛЯ
АНАЛИЗА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ ПО ВОДНО-ЭЛЕКТРОЛИТНОМУ
ОБМЕНУ КЛЕТКИ**

**The application of mathematical modeling for analysis of experimental data on cell
water-electrolyte balance**

Ильяскин А.В.¹, Карпов Д.И.², Ершов А.П.², Медведев Д.А.², Соленов Е.И.¹

1 – Институт цитологии и генетики СО РАН,
630090, Новосибирск, пр-т акад. Лаврентьева, 10;

² – Институт гидродинамики им. Лаврентьева СО РАН,
630090, Новосибирск, пр-т акад. Лаврентьева, 15

Тел.: +7(383)363-49-71; факс: +7(383)333-12-78; e-mail: ilyaskin.alex@yahoo.com

В основе осморегулирующей функции почек лежат процессы транспорта воды и осмотов в эпителии нефронов и собирательных трубок. Главные клетки собирательных трубок почки играют роль в регуляции реабсорбции и секреции ионов натрия и калия, поэтому изучение транспорта ионов через плазматическую мембрану данных клеток является актуальной проблемой физиологии водно-солевого обмена. Нами была создана математическая модель, которая представляет собой систему обыкновенных дифференциальных уравнений, описывающих трансмембранные потоки ионов в главных клетках эпителия собирательных трубок почки. Проведенный анализ пространства параметров полученной модели показал, что каждая точка пространства параметров проницаемости однозначно соответствует определенному стационарному состоянию системы, которое характеризуется тремя величинами: внутриклеточной концентрацией натрия, хлора и значением трансмембранного потенциала. Экспериментальная работа заключалась в измерении внутриклеточной концентрации натрия и клеточного объема флуоресцентными методами. Разработаны подходы к оценке внутриклеточной концентрации натрия и хлора, изучена динамика внутриклеточной концентрации натрия при действии среды с низким содержанием натрия, а также изучено влияние замещения ионов хлора в среде на объем клеток. Полученные экспериментальные данные и анализ пространства параметров проницаемости модели послужили основой для количественной оценки ионной проницаемости мембраны изучаемых клеток. В результате, были получены значения проницаемостей мембраны для ионов натрия ($P_{Na}=2.7 \times 10^{-6}$ см/с), калия ($P_{K}=1 \times 10^{-5}$ см/с), хлора ($P_{Cl}=3 \times 10^{-6}$ см/с) и плотности Na/K-насоса в мембране ($N_{pump}=2.7 \times 10^{-12}$ моль/см²). Таким образом, в работе предложен новый экспериментально-теоретический подход к количественной оценке физиологических характеристик клетки, недоступных для непосредственного измерения в эксперименте.

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЦЕПИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ
МИТОХОНДРИЙ С КАТИОННЫМ ПРОИЗВОДНЫМ АЗОБЕНЗОЛА, ОБЛАДАЮЩИМ
ФОТОКОНТРОЛИРУЕМОЙ СТРУКТУРОЙ**

**The interaction between mitochondrial oxidative phosphorylation chain and the
cationic derivative of azobenzene with photocontrollable structure**

Исмайлова Ш.Р.¹, Мотовилов К.А.^{1,2}, Ягужинский Л.С.,^{1,2} Агладзе К.И.^{1,3}

¹ – НОЦ «Бионанофизика», МФТИ (ГУ), 141700, г. Долгопрудный Московской области, Институтский переулок, дом 9;

² – НИИ ФХБ МГУ им. М.В. Ломоносова, 119899, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 44;

³ – Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan
Тел.: +7(495)408-46-45; e-mail: oven24@gmail.com

АЗОТАБ представляет собой производное азобензола, содержащие катион тетера-alkиламмония. АЗОТАБ можно использовать в качестве агента для фотоконтроля возбудимости кардиомиоцитов. В связи с перспективностью использования веществ этого типа для широкого класса задач, связанных с возбудимыми клеточными культурами, требовалось исследовать, как АЗОТАБ влияет на работу дыхательной цепи митохондрий, поскольку поддержание нормального гомеостаза активных возбудимых клеточных систем напрямую связано состоянием их энергетики. В результате проведенной работы выяснилось, что Транс-АзоТАБ является ингибитором дыхательной цепи митохондрий, подавляющим оба дегидрогеназные звена комплексы I и II. Сродство транс-АзоТАБа к NADH-дегидрогеназе значительно превышает его же сродство к сукцинатдегидрогеназе, что согласуется с теоретическими предпосылками, сделанными на основании предыдущих исследований лаборатории Л.С. Ягужинского. Степень ингибирования дыхательной активности митохондрий под действием транс-АзоТАБа зависит от того, какая из дегидрогеназ является основным донором электронов в цепь окислительного фосфорилирования, а не от того, является дыхание разобщенным или фосфорилирующим. Это свидетельствует в пользу того, что транс-АзоТАБ в тех концентрациях, которые использовались в эксперименте (до 500 мкМ), не влияет на работу АТФ-синтетазы. Цис-АзоТАБ не является ингибитором дыхательной цепи митохондрий. Связывание транс-АзоТАБа с различными мембранными системами митохондрий носит неспецифический характер. Цис-АЗОТАБ ускоряет фосфорилирующее (но не разобщенное) дыхание митохондрий на обоих субстратах. Интерпретировать последний факт можно двояко. Во-первых, возможно ускорение латерального переноса примембранных протонов, непосредственно участвующих в синтезе АТФ пятым комплексом. Во-вторых, присутствие цис-АЗОТАБа может ускорять процесс набухания митохондрий, что также ведет к ускорению дыхания в третьем состоянии.

ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК ФОТОБАКТЕРИЙ.

Исмаилов А.Д.¹, Ефременко Е.Н.²

Московский Государственный Университет имени Ломоносова М.В, биологический (1) и химический (2) факультет, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12.
Тел.: +7 (495) 939-34-50; +7 916-907- 77-58; e-mail: anvaris@list.ru.

В настоящей работе представлены данные по использованию различных типов носителей для иммобилизации светящихся бактерий. Для иммобилизованных в агаре, агарозе, в т.ч. низкоплавной агарозе, клеток характерна недостаточно высокая стабильность свечения, связанная с чувствительностью клеток к относительно высоким (30–50°C) температурам гелеобразования. Са, Sr – альгинатные гели частично дестабилизируются в солевых растворах за счет замещения в геле Са на ионы Na. Люминесцентная активность иммобилизованных на альгинатных носителях клеток сохраняется в течение 1–4 недель. Разработаны технологические операции по иммобилизации фотобактерий в криогеле поливинилового спирта (ПВС), процедуры хранения и применения препаратов в дискретном и непрерывном биомониторинге токсинов. Основными преимуществами ПВС как носителя являются: 1) процесс гелеобразования осуществляется при отрицательных температурах; 2) носитель устойчив к биоповреждениям микроорганизмами и грибами; 3) криогель нетоксичен по отношению к включенным микроорганизмам; 4) оптически прозрачен; 5) нет диффузионных ограничений за счет наличия макропор; 5) реологические характеристики геля стабильны в широком диапазоне положительных температур. Иммобилизованные клетки обладают более пролонгированным свечением, чем свободные клетки всех использованных штаммов. Наиболее пролонгированным и интенсивным свечением обладают иммобилизованные клетки *P. phosphoreum*, наименьшим, – *V.harveyi*. Температурный фактор оказывает существенное влияние на иммобилизованные препараты при превышении специфического для каждой бактерии максимума. Иммобилизация повышает термостабильность люциферазной реакции. Результаты анализа удельной активности гранул, непосредственно после размораживания показали, что наиболее эффективной средой формирования гелей является полная среда культивирования. В данной среде после проведения криогенной иммобилизации и размораживания, бактерии сохраняли практически 100% уровень люминесцентной активности. Исключение из среды формирования геля пептона вызывает снижение удельной люминесцентной активности на 1 – 1,5 порядка. Наиболее существенный спад уровня свечения (в 103-104 раз) наблюдался при иммобилизации в гелях, сформированных на основе 3% NaCl. Концентрация геля (5,7,10%) несущественно сказывается на кинетических и эмиссионных параметрах.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА МОЛЕКУЛ ГЛИПРОЛИНОВ**Spatial structure of the glyprolin molecules****Исмаилова Л.И., Аббаслы Р.М., Ахмедов Н.А.**

Бакинский государственный университет, Институт Физических Проблем,
AZ-1148, Баку, ул. Ак. З.Халилова 23
Tel. (+994412)510 18 22, Fax(+99412)498 33 76, e-mail: Abbasli_Rena@mail.ru

Короткие пептиды, включающие глицин и пролин, в настоящее время привлекают большое внимание. Они влияют на систему свертывания крови, модулируют работу иммунной и нервной систем. Поэтому, актуальным представляется проведение структурно-функциональных исследований глипролинов. Целью данной работы является определение пространственного строения ди-, три-, тетра и гексапептидных молекул с чередующимися остатками Gly и Pro, молекул Met1-Glu2-His3-Phe4-Pro5-Gly6-Pro7 (семакс) и Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (силанк). Для нахождения трехмерной структуры пептидов, использовался теоретический подход, позволяющий рассчитывать ее исходя из известной аминокислотной последовательности. Расчет выполнялся в рамках механической модели молекул с учетом невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и энергии водородных связей.

Исследование пространственной структуры ди-, три-, тетра- и гексапептидов с чередующимися остатками Gly и Pro показало, что свернутые формы являются для этих молекул самыми низкоэнергетическими. Экспериментальные исследования показали, что наличие C-концевой последовательности Gly-Pro является необходимым условием для проявления защитного действия клетки. Такой участок присутствует в каждой из исследуемых молекул.

Низкой энергией для гептапептидной молекулы Семакс, обладающей ноотропным и нейрорепроторным действием, являются пространственные структуры BRRBRPR, BRRBRLR, BRRBBLB, BRRBBPR, RRRBRRR с полусвернутым концевым трипептидным фрагментом. В низкоэнергетических структурах была оценена конформационная подвижность боковых цепей аминокислотных остатков путем построения конформационных карт. Низкоэнергетические конформации молекулы Семакс послужили основой для изучения пространственной структуры ее аналогов.

Для молекулы селанк, созданной для лечения тревожных и стрессовых состояний, самыми низкоэнергетическими оказались конформации RBRBBLR, BBRBRLR и RBRBBPR. Пролонгированное действие препарата селанк объясняется присутствием именно участка Pro-Gly-Pro. Сохраняя функциональные особенности молекулы селанк, одновременно этот трипептидный участок не дает молекуле быстро деградировать. Проведенные расчеты трехмерной структуры пептидных молекул позволяют определить количественно их геометрические и энергетические параметры, значения двугранных углов основной и боковых цепей всех аминокислот, а также энергетические вклады внутримолекулярных взаимодействий. Полученные результаты могут быть использованы для конструирования новых аналогов иммуномодулирующих пептидных молекул.

**РОЛЬ БОЛЬШИХ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ДИПОЛЬНЫХ МОМЕНТОВ НУКЛЕИНОВЫХ
КИСЛОТ В ПРОЦЕССАХ БЕЛОК-ДНК УЗНАВАНИЯ.
MOZYME КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ**

**The role of large permanent electric dipole moment of nucleic acids in DNA-protein
recognition process. MOZYME quantum-chemical study**

Кабанов А.В., Комаров В.М.

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, ул.Институтская, 3.
Тел.: +7 (4967) 73-94-16; факс: +7 (4967) 33-05-09 E-mail: komarov@icb.psn.ru

Исследование проявлений взаимодействия молекулярных электростатических полей в клетке остается одной из актуальнейших тем в физико-химической биологии. Считается, например, что инициация таких важнейших генетических процессов как репликация и транскрипция возможна только за счет точного контактного узнавания белком конкретной нуклеотидной последовательности двойной спирали ДНК. Оно реализуется при высокой комплементарности распределения положительных и отрицательных зарядов во взаимодействующих центрах связывания. Вместе с тем природа дальнедействующей стадии процесса молекулярного узнавания, фактически предопределяющая наблюдаемую аномально высокую скорость ассоциации репрессора и ДНК-мишени по отношению к скорости традиционных диффузионно-лимитированных реакций связывания, остается до сих пор не выясненной. Поэтому установление возможной физической первопричины направленного стремления белка к своей ДНК-мишени является весьма актуальной задачей.

В работе с целью поиска вероятного дальнедействующего фактора направленно-сти данного процесса развивается, прежде всего, идея о существовании в изолированных структурах двойных спиралей нуклеиновых кислот большого постоянного электрического дипольного момента m , направленного вдоль оси спирали. Ранее, исходя из квантово-химических расчетов, мы уже показали, что в этих молекулах за счет изначально неплоской геометрии уотсон-криковского спаривания оснований возможно накопление нескомпенсированной внеплоскостной составляющей дипольного момента оди-ночных пар вдоль оси спирали. Причем прирост дипольного момента может достигать до $1.0 \div 1.5$ D (Дебай) на одну АТ или GC пару. В данном исследовании, выполненном с привлечением современного полуэмпирического квантово-химического метода MOZYME были изучены относительно длинные цепочки олигонуклеотидов с линейными размерами доходящими до удвоенной персистентной длины (~ 260 пар оснований). Расчет показал возрастание величины такого дипольного момента m до значений в 500 D. Ясно, что с дальнейшим ростом линейных размеров ДНК-цепи этот важный параметр также будет пропорционально расти. Эти результаты оказались в хорошей корреляции с наблюдаемыми данными о существовании гигантских постоянных электрических дипольных моментов в ДНК. На базе полученных результатов и известных данных по величинам электрических дипольных моментов для ДНК-связывающих белков, у которых дипольный момент m как правило превышает 100 D, были проведены модельные оценки энергий дальних диполь-дипольных ДНК-белок взаимодействий для расстояний порядка ~ 500 Å. Полученные величины таких дальних связывающих взаимодействий оказались не малыми, порядка $10-20$ кДж/моль. Они явно превышают энергию тепловых флуктуаций ~ 2 кДж/моль и указывают на принципиальную возможность инициации процесса белок-нуклеинового узнавания по данному каналу.

АМИЛОИДЫ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ДРОЖЖЕЙ: ДИНАМИКА ФОРМИРОВАНИЯ, СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ**Yeast cell wall amyloid proteins: assembly, structure and functions****Калебина Т.С.**

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,
119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12.
Тел.: +7(495)939-50-75; e-mail: kalebina@gmail.com

Доклад суммирует результаты последних лет исследований, посвящённых идентификации, изучению структуры и анализу функций белков клеточной стенки (КС) дрожжей, способных формировать фибриллы амилоидного типа. Представлены свидетельства важной роли амилоидных белков для формирования механически прочной, но также способной динамически изменяться в процессе роста и деления клетки молекулярной структуры КС дрожжей различной таксономической принадлежности. Результаты получены при анализе штаммов дрожжей с нарушенным процессом формирования амилоидов клеточной стенки или лишённых таковых. На основании собственных данных, а также результатов, представленных в литературе, выдвинута гипотеза о роли процесса фибриллообразования для регуляции активности глюкангидролаз, локализованных в КС дрожжей в тесной ассоциации со своим субстратом – глюканом. Представлены экспериментальные доказательства данной гипотезы, полученные в результате исследования активности глюкангидролазы Bgl2p. Предложена модель строения КС дрожжей, учитывающая роль белков амилоидного типа для формирования её молекулярного ансамбля.

**ИЗМЕНЕНИЕ ПРОТОННОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ И УРОВНЯ АФК
В ВЕЗИКУЛАХ ПЛАЗМАЛЕММЫ РАСТЕНИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ МАЛЫХ ДОЗ
ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ**

**The Effect of Radiation Low Doses on the Changes of Proton Permeability and ROS
Level in Plant Plasma Membrane Vesicles**

Калинин В.А., Орлова О.В., Н.А. Глазкова Н.А., Тимофеева О.Д.

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
603950 Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23
Тел.: 8 (831) 4656106, e-mail: Orlova_OV@inbox.ru

Мембранную фракцию везикул плазмалеммы из клеток стеблей 12-дневных проростков тыквы облучали источником β -радиации ^{90}Sr - ^{90}Y с мощностью дозы 4 мГр/час. О пассивной протонной проницаемости везикул (рН внутри 8,0) судили по степени диссипации градиента, возникающего при добавлении мембранной фракции в слабоабUFFERенную среду (рН 5,5). Величину DpH оценивали с помощью флуоресцентного зонда 9-аминоакридина. Показано, что однократное облучение возрастающими дозами ионизирующей радиации (ИР) приводило к нелинейному увеличению протонной проницаемости везикул. После 5-минутного облучения (0,33 мГр) исходный градиент в 2,5 единицы в среднем уменьшался до 1,6 единиц, а при дозе в 0,66 мГр величина DpH оказывалась равной 1,9 единицы. 20-минутное воздействие ИР (1,33 мГр) сопровождалось максимальной потерей DpH везикулами до 0,6 единиц, величина которого не изменялась после 40 минут облучения (2,66 мГр). Кинетика диссипации градиента, индуцированного ИР, носила релаксирующий характер, скорость снижения которого составляла около 0,6 и 0,25 $\text{DpH}/\text{мин}$ соответственно для доз 0,33 и 0,66 мГр и 0,1 $\text{DpH}/\text{мин}$ при дозе 1,33 мГр. С хемилюминесцентным индикатором – люминолом зафиксировано резкое возрастание уровня АФК в везикулах, подвергнутых действию ИР. Интенсивность ХЛ облученных везикул на 65 и 50% превышала контроль для доз в 0,33 и 0,66 мГр и не отличалась от такового при дозах 1,33 и 2,66 мГр. Определение с тиоцианатом аммония содержания гидроперекиси липидов не обнаружило достоверного их возрастания у облученных везикул по сравнению с контрольными. Увеличение продукции АФК сопровождается активацией плазмалеммной пероксидазы, достоверный рост активности которой (на 21%) выявляется после облучения дозой 0,66 мГр с достижением максимума (до 28%) при дозе в 2,66 мГр. Исходя из высокой реакционной способности АФК по отношению к сульфгидрильным группам, с флуоресцеинмеркурияацетатом была проанализирована степень окисленности поверхностных SH-групп мембраны везикул при действии ИР. Установлено уменьшение количества восстановленных SH-групп в облученных везикулах по сравнению с интактными в среднем на 42% в интервале доз от 0,33 до 0,66 мГр и частичная их репарация на 23 и 30% соответственно для доз 1,33 и 2,66 мГр.

Полученные данные указывают на возможную роль АФК в инициации ранних мембранных механизмов адаптации клеток растений к действию низкоинтенсивной ИР.

**ОПТИКО-БИОСЕНСОРНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ЦИТОХРОМОМ
P450(51) ЧЕЛОВЕКА**

**Optical biosensor assay for analysis of small compounds interaction with human
cytochrome P450(51)**

**Калужский Л.А.¹, Гнеденко О.В.¹, Мольнар А.А.¹, Иванов А.С.¹, Усанов С.А.²,
Арчаков А.И.¹**

¹ – ФГБУ «ИБМХ» РАМН, 119121, Москва, Погодинская ул., д. 10

² – ИБХ НАН Беларуси, 220141, Минск, ул. Акад. В.Ф.Купревича, 5, корп. 2

Тел.: +7(499)246-71-15; e-mail: alexei.ivanov@ibmc.msk.ru

Цитохромы P450 семейства 51 (CYP51) обнаружены во многих живых организмах. У человека CYP51 (ланостерол-14-альфа-деметилаза) катализирует одну из заключительных стадий биосинтеза холестерина. Поэтому CYP51 человека рассматривается как крайне перспективная молекулярная мишень для действия новых лекарств, снижающих уровень холестерина в организме. Недавно была получена пространственная структура CYP51 человека [1], что открывает возможность поиска прототипов новых лекарств на основе строения белка-мишени [2].

Для анализа взаимодействия низкомолекулярных соединений с CYP51 нами была создана тест-система на базе оптического биосенсора Biacore T200 (GE Healthcare), работающего на эффекте поверхностного плазмонного резонанс (SPR).

Рекомбинантный CYP51 человека (получен в ИБХ НАН Беларуси) был иммобилизован на поверхности оптического чипа CM5. Анализ межмолекулярных взаимодействий производился в автоматическом режиме путем последовательных инъекций растворов тестовых соединений через измерительный и контрольный каналы биосенсора.

В качестве положительного контроля был использован известный ингибитор CYP51 кетоконазол. Ограниченная тестовая выборка содержала 19 различных стероидных и тритерпеновых соединений. Было обнаружено, что некоторые соединения взаимодействуют с CYP51. Далее было исследовано взаимодействие данных соединений с CYP51 при разных температурах и рассчитаны термодинамические параметры. Оказалось, что ведущую роль во взаимодействии ряда соединений (голотурин А, глицирризиновая кислота, кетоконазол) играет энтропийный компонент, в то время как при взаимодействии других соединений (бетулофолиентриол и теасапонин) ведущую роль играет энтальпийная составляющая.

Работа поддержана РФФИ (грант 11-04-01107-а) и Министерством образования и науки РФ (ГК №16.552.11.7001).

1. Strushkevich N, Usanov SA, Park HW / Journal of molecular biology, 2010, 397, 1067-1078.

2. Veselovsky A.V., Ivanov A.S. / Current drug targets. Infectious disorders, 2003, 3, 33-40.

**ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ КАРНОЗИНА, ТАУРИНА
И ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА В МОДЕЛИ АКТИВИРОВАННЫХ
ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ КРЫС IN VITRO**

**In vitro anti-inflammatory activities of the antioxidants (carnosine, taurine and
reduced glutathione) in hydrogen peroxide-stimulated peritoneal macrophages of rats**

Камалетдинова Т.Р., Байжуманов А.А., Юсипович А.И., Максимов Г.В.

Кафедра биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова
Тел.: +7(495)939-19-66; факс: +7(495)939-11-16; e-mail: kamaletdinovat@gmail.com

В работе изучали противовоспалительные свойства антиоксидантов: карнозина, таурина и восстановленного глутатиона в экспериментах *in vitro*. Активацию перитонеальных макрофагов крыс проводили при помощи перекиси водорода (конечная концентрация составляла 0,8 мМ). Конечная концентрация антиоксидантов в пробах составляла 1 мМ. Количество активированных и мертвых клеток оценивали на основании фазовых изображений фиксированных макрофагов, полученных при помощи лазерной интерференционной микроскопии. Установлено что при добавлении карнозина и таурина снижается количество активированных макрофагов в культуре, добавление восстановленного глутатиона, наоборот, приводит к увеличению доли активированных и мертвых клеток в популяции. Карнозин обладает более высокой противовоспалительной активностью, чем таурин. При этом в случае действия таурина, наблюдается повреждение мембран (оценка повреждений мембран проводилась согласно стандартной методике [1], используя перекрестную окраску двумя флуоресцентными зондами: бромистым этидием и флуоресцеиндиацетатом в конечной концентрации 5 мкг/мл).

1. Туровецкий В. Б., Золотилин С.А., Сарычева Н.Ю. и др. // Булл. эксп. биол. и мед. 1994. №3. С. 265-267.

**ПОИСК И АНАЛИЗ СТРУКТУР, ОБРАЗОВАННЫХ НА РАННИХ СТАДИЯХ
СВОРАЧИВАНИЯ БЕЛКОВ****Searching for and analysis of structures formed at early steps of protein folding****Каргатов А.М., Ефимов А.В.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
белка Российской академии наук,
142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, 4.
Тел.: +7(4967)31-84-63; факс: +7(495)514-02-18; e-mail: kargatov@rambler.ru

Последовательность событий при сворачивании белка играет важную роль в отборе как путей сворачивания, так и получаемых уникальных структур. К сожалению, прямых экспериментальных методов, которые позволяли бы исследовать процесс сворачивания белка в реальном времени, до сих пор нет. Одним из подходов к решению этой задачи является теоретическое моделирование с помощью построения и анализа структурных деревьев белков, однако во многом этот подход остаётся гипотетическим.

В настоящей работе мы использовали топологический подход для поиска структур, которые свернулись явно раньше, чем остальная часть белка. Суть подхода можно продемонстрировать с помощью следующей аналогии. Очевидно, что снять рубашку, не снимая пиджака, невозможно. Понятно, что рубашка надета раньше пиджака.

В результате анализа известных белков из Банка белковых данных (PDB) нами найден целый ряд белков, в которых имеются структуры – аналоги «рубашек», образованные явно раньше, чем «намотанные» на них остальные части молекул («пиджаки»). Анализ этих структур показал, что во многих случаях это – корневые структурные мотивы, которые мы использовали в качестве «зародышей» при построении структурных деревьев, такие, например, как abcd-единица, 3 β -уголок, α - α -уголок, скрученная β -шпилька и др.

Работа поддержана грантом РФФИ: № 10-04-00727-а.

МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МОТОРОВ: F1АТФАЗЫ И КИНЕЗИНА

Mathematical models of molecular motors: F1Аtpase and Kinesin

Карговский А.В., Романовский Ю.М.

МГУ. Физический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1
Тел.: +7 (495) 9392612; факс +7(495) 9393113; e-mail : yuromanovsky@yandex.ru

Поддавляющее число молекул АТФ образуется протонными АТФ-синтазами, являющимися самыми маленькими в природе наноразмерными молекулярными электромоторами-генераторами. Более 50 кг молекул АТФ производится ими в день в организме человека и тратится живыми клетками на совершение работы. Одними из основных потребителей АТФ являются молекулярные моторы: миозин, кинезин, динеин. В докладе представлены математические модели F1АТФазы (составной части АТФ синтазы) и кинезина. F1АТФаза работает как механо-химический трехтактный двигатель, осуществляющий вращение ротора с нагрузкой [2,3,4]. Кинезин – двухтактный шагающий двигатель, обеспечивающий транспорт различных «грузов» (митохондрий, лизосом, белковых комплексов) вдоль направляющих «рельс» – табулиновых трубочек в различных клетках [1]. Модели строятся на основе конкретных экспериментальных данных и сводятся к системам обобщенных уравнений Ван-дер-Поля или Релея. При этом силовые моменты описываются полиномами высокого порядка, силы упругости нелинейны, а инерция определяется временем гидролиза АТФ. Результаты моделирования сопоставляются с экспериментальными развертками вращения ротора F1АТФазы и записями шагов кинезина во времени. Предложенный подход может быть использован для построения модели миозинаV и динеина. В моделях могут быть учтены и шумы разной природы: флюктуации, возникающие из-за случайного характера сорбции АТФ в активные центры моторов, мультипликативные шумы из-за разброса времен гидролиза АТФ и естественные тепловые шумы. Ниже приведен пример системы безразмерных уравнений для изменений углов β , характеризующих открытие активных центров β -субъединиц F1АТФазы, которые взаимодействуют между собой через ротор (γ – субъединицу):

$$\xi \frac{d^2\beta_1}{dt^2} - (1 - \xi - \beta_1^{n-1}) \frac{d\beta_1}{dt} \left[(k-1) \frac{\beta_1^{n-1}}{n} \right] \beta_1 + \tau_0 + \varepsilon \xi \frac{d^2\beta_3}{dt^2} = 0$$

$$\xi \frac{d^2\beta_2}{dt^2} - (1 - \xi - \beta_2^{n-1}) \frac{d\beta_2}{dt} \left[(k-1) \frac{\beta_2^{n-1}}{n} \right] \beta_2 + \tau_0 + \varepsilon \xi \frac{d^2\beta_1}{dt^2} = 0$$

$$\xi \frac{d^2\beta_3}{dt^2} - (1 - \xi - \beta_3^{n-1}) \frac{d\beta_3}{dt} \left[(k-1) \frac{\beta_3^{n-1}}{n} \right] \beta_3 + \tau_0 + \varepsilon \xi \frac{d^2\beta_2}{dt^2} = 0$$

Здесь $\xi \ll 1$ пропорционален отношению времени закрытия активного центра к времени гидролиза АТФ, k – обобщенный коэффициент упругости, τ_0 – остаточное напряжение, $\varepsilon \ll 1$, $n = 9, 11, 13$. Можно высказать положение о том, что обобщенные уравнения Релея описывают поведение не только молекулярных моторов, но и многих автоколебательных процессов: броселлятора, реакции гликолиза, динамику нейронов [5].

1. Hwang, M.J. Lang, and M. Karplus/ Structure 2008, V 16, C 62–71,
2. М. Романовский, А.Н.Тихонов/ УФН 2010, 180, С. 931–956,
3. В. Карговский, Ю. М. Романовский, А. Н. Тихонов/ Биофизика, 2009, Т. 54, 5–12,
4. J. Xing, J.C. Liao, G. Oster. / PNAS. V 102, 2005, С 16539,
5. А.И.Лаврова, Е.В.Постников, Ю.М.Романовский/ УФН, 2009, Т. 52, С. 1239–1244.

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ДНК НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНО ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ОКСАЛАТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ПАЛЛАДИЯ(II)**Study of the interaction with the DNA molecule potential antitumor drugs – new palladium(II) oxalate complexes****Касьяненко Н.А.¹, Реверук З.В.¹, Ефименко И.А.², Шишилов О.Н.²**¹ СПбГУ, 198504, Санкт-Петербург, Петродворец, Ульяновская ул. 1;² Институт общей и неорганической химии имени Н.С.Курнакова, 119991, Москва, Ленинский просп. 31.

Тел: +7(812)428-43-88, факс: +7(812)428-72-40, e-mail: anbit@rambler.ru

Препараты платины – цисплатин, крабоплатин и оксалиплатин являются признанными противоопухолевыми средствами. Но они имеют ряд хорошо известных серьезных недостатков. Среди других металлов платиновой группы наиболее обнадеживающие результаты показывают препараты на основе палладия и рутения. Отмечается, что соединения палладия обладают значительно меньшей токсичностью, чем соединения платины, а индуцированные ими повреждения ДНК репарируются труднее. Для использования препаратов палладия в качестве химиотерапевтических средств необходимо всестороннее понимание механизма их действия. При изучении молекулярного механизма действия лекарственных препаратов удобно использовать модельные системы, представляющие собой водно-солевые растворы ДНК. Анализ влияния новых соединений на объем, вторичную структуру, зарядовые свойства и конформацию макромолекулы, а также сравнение их действия с результатом комплексообразования ДНК с известными противоопухолевыми препаратами может дать сведения об их потенциальной противоопухолевой активности. Целью работы является изучение молекулярного механизма действия препаратов и выявление влияния структуры и состава соединения на биологическую активность.

В работе были использованы оксалатные комплексы палладия с протонированным морфолином – $(C_4H_{10}NO_2)_2[Pd(Ox)_2]$, протонированным метилморфолином – $(C_5H_{12}NO_2)_2[Pd(Ox)_2]$ и $K_2[Pd(Ox)_2]$.

С помощью различных методов: УФ спектрофотометрии, кругового дихроизма, низкоградиентной вискозиметрии показано, что все соединения образуют комплексы с молекулой ДНК, причем большинство из них реализуется благодаря образованию координационной связи между N7 гуанина и атомами Pd. С помощью атомной силовой микроскопии было выявлено образование компактных и особых (получили название – «бусины на нити») структур при различных концентрациях препаратов, возникающих, по-видимому, из-за связывания соединений с функциональными группами макромолекулы, влияющих на ее вторичную и третичную структуру. Проведен анализ влияния ионной силы раствора и концентраций соединений на характер комплексообразования и предложены механизмы образования комплексов. Полученные результаты сравниваются с аналогичными данными для цис- и транс-ДДП.

РЕГУЛЯЦИЯ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ ПЛАЗМАЛЕММЫ КЛЕТОК ХАРОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМ КАЛЬЦИЕМ

Regulation of calcium channels of characeae cell plasmalemma by intracellular calcium

Катаев А.А.¹, Жерелова О.М.², Грищенко В.М.³

¹ Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, Моск. обл.
Тел. 8 (4967)73-91-55; факс: 8 (4967)33-05-09; E-mail: aakka@rambler.ru,

² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пущино, Моск. обл.

³ Институт биологического приборостроения РАН, 142290, Пущино, Моск. обл.

На животных клетках показано, что инактивация кальциевых каналов зависит от концентрации свободного внутриклеточного кальция, более того, повышение концентрации кальция может приводить к их обратимому блокированию [3]. Нами было показано, что потенциалзависимые кальциевые каналы перфузированной плазмалеммы клеток харовых водорослей требуют для поддержания активации присутствия во внутриклеточном растворе ионов Mg^{2+} и АТФ [4].

Настоящая работа посвящена исследованию влияния свободного внутриклеточного кальция на активацию кальциевых каналов плазмалеммы водоросли *Nitellopsis obtusa*. Исследование проводили с использованием режима фиксации потенциала на плазмалемме в условиях внутриклеточной перфузии [4]. Для внутриклеточной перфузии были составлены ЭГТА-буферные растворы с различным содержанием свободного кальция, рассчитанным по данным [5]. Входящие токи через кальциевые каналы регистрировали в ответ на деполяризующее смещение фиксированного потенциала на мембране. Процедуру получения и регистрации токов повторяли при замене внутриклеточного раствора с различными концентрациями кальция.

Изменение внутриклеточной концентрации свободного кальция от 10^{-9} до 10^{-7} М приводило к увеличению амплитуды I_{Ca} ; максимум вольт-амперной характеристики при этом смещался в сторону более отрицательных потенциалов. При $[Ca^{2+}] \sim 10^{-6}$ М появлялась компонента Ca^{2+} – индуцированного хлорного тока [6]. Дальнейшее увеличение концентрации свободного кальция внутри клетки до уровня 10^{-6} М приводит к уменьшению амплитуды кальциевого тока. Обнаружен узкий диапазон изменения концентрации внутриклеточного кальция, при котором амплитуда кальциевых токов максимальна. Таким образом, зависимость амплитуды кальциевого тока от внутриклеточной концентрации ионов $[Ca^{2+}]_{in}$ от 10^{-9} до 10^{-6} М имеет колокообразный вид с максимумом при $[Ca^{2+}] \approx 6 \cdot 10^{-7}$ М.

Наши результаты о влиянии свободного внутриклеточного кальция на активацию кальциевых каналов плазмалеммы клеток *Nitellopsis obtusa*, а также данные, полученные на животных клетках [1-3], показывают, что кальций может быть не только токозадающим ионом, но и выступать в качестве внутриклеточного «мессенджера», осуществляющего регуляцию функционального состояния кальциевых каналов.

1. Brehm P., Eckert R., Tillotson D. J. *Physiol.*, 1980, v. 306, p. 193.

2. Plant T. D., Standen N. B., Word T. A. *Ibid.*, 1983, v. 334, p. 189.

3. Kostyuk P. G., Krishtal O. A. *Ibid.*, 1977b, v. 276, p. 569.

4. Жерелова О. М., Катаев А. А., Берестовский Г. Н. Докл. АН СССР, 1985, т. 281, № 1, с. 181.

5. Portzehl H., Caldwell P. C., Ruegg J. C. *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, v. 79, p. 581.

6. Kataev A. A., Zherelova O. M., Berestovsky G. N. *Gen. Physiol. Biophys.*, 1984, v. 3, p. 447.

**ОЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА – МОДУЛЯТОР ИОННЫХ КАНАЛОВ ПЛАЗМАЛЕММЫ
КЛЕТОК ХАРОВОЙ ВОДОРΟΣЛИ CHARA CORALLINA****Effect of oleic acid on ionic channels of plasma membranes of green alga
*Chara corallina*****Катаев А.А.¹, Жерелова О.М.², Грищенко В.М.³**

¹ – Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, Моск. обл.
Тел. 8 (4967)73-91-55; факс: 8 (4967)33-05-09; E-mail: aakka@rambler.ru,

² – Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пущино, Моск. обл.

³ – Институт биологического приборостроения РАН, 142290, Пущино, Моск. обл.

Свободные (неэтерифицированные) ненасыщенные жирные кислоты (НЖК) обладают всеми свойствами эндогенных биорегуляторов с широким спектром действия. НЖК (в том числе и олеиновая кислота, О.К.; C18:1:9cys) являются активными модуляторами концентрации свободных ионов в клетке

Несомненный интерес представляют экспериментальные данные о химиотерапевтических и фармакологических свойствах О.К. Ранее было показано, что α -лактальбумин из человеческого и коровьего молока и О.К. образуют молекулярный комплекс, названный HAMLET или BAMLET (human or bovine alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells), обладающий цитотоксической и противоопухолевой активностями. Известно, что О.К. обладает собственной цитотоксичностью и противораковой активностью.

Предлагаемая работа посвящена изучению влияния различных концентраций экзогенной О.К. (от 5 до 100 мкМ) на ионные токи и структурные характеристики плазмалеммы клеток *Chara corallina*, которые являются реальной моделью для изучения механизмов взаимодействия биологически активных соединений с ионными каналами и их транспорта через плазматические мембраны.

Из полученных нами результатов можно сделать следующие выводы:

1. Действие О.К. на плазмалемму клеток *Chara corallina* в интервале концентраций от 5 до 50 мкМ имеет дозо- и время-зависимый характер и не влияет на целостность плазматической мембраны и на фазовое состояние её липидного матрикса.

2. Действие О.К. направлено на активацию или инактивацию Ca^{2+} – и Ca^{2+} – зависимых Cl^- – каналов плазмалеммы. Блокирование Ca^{2+} –каналов имеет обратимый характер. Транспортные функции Ca^{2+} –каналов восстанавливаются после удаления О.К. из омывающего клетку раствора.

3. Увеличение внеклеточной концентрации О.К. от 50 до 100 мкМ приводит к инаktivации входящих токов и нарастанию неспецифичного тока утечки за счет микродефектов на мембране, ведущих к нарушению целостности липидного матрикса плазмалеммы и его перфорации.

Сравнение представленных здесь результатов с ранее полученными нами и другими авторами данными даёт основание предположить, что решающая роль в транспорте HAMLET – подобных комплексов в клетку принадлежит олеиновой кислоте, которая дозависимо разрушает липидный матрикс мембраны и вследствие этого проникает в цитоплазму клетки.

РОЛЬ ИОНОВ Ca^{2+} В ПРОЦЕССЕ ГЕНЕРАЦИИ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СИГНАЛОВ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Role of calcium ions in the electrical reactions generation in higher plants

Катичева Л.А.¹, Сергеева Е.А.², Грибков А.Л.^{1,2}, Воденев В.А.¹

¹ – Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского, Россия, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23

² – Институт прикладной физики РАН, Россия, Нижний Новгород, ул. Ульянова, 46
Тел: 8(831)465-43-90, katicheva_la@mail.ru

Ионы кальция, являясь первичными и вторичными мессенджерами, играют ключевую роль в процессах передачи сигналов у живых организмов. Однако, участие кальциевой сигнальной системы в процессах формирования электрических ответов на внешнее повреждение остаётся малоизученным. Таким образом, целью данной работы явилась оценка вклада ионов кальция в процесс развития электрической реакции высшего растения на ожог – вариабельного потенциала (ВП).

Для анализа был использован метод кальциевого имиджинга, адаптированный к использованию на клетках интактного растения. Изменения концентрации ионов кальция регистрировали с помощью Ca^{2+} -чувствительного флуоресцентного зонда Fluo-4/AM, методом лазерной сканирующей микроскопии. В результате одновременной регистрации кальциевой динамики и развития ВП было показано увеличение содержания ионов Ca^{2+} в цитоплазме при генерации реакции. Для анализа природы транспорта кальция во внутриклеточное пространство был применён метод ингибиторного анализа и метод микроэлектродной регистрации потенциала, позволяющий измерять параметры ВП от отдельной клетки. В ходе анализа параметров развивающегося в ответ на повреждение ВП при внесении в раствор, омывающий проросток, ЭГТА в концентрации 1 мМ, было показано, что в отсутствии ионов Ca^{2+} во внеклеточном пространстве амплитуда электрической реакции заметно снижается. Таким образом, в процесс развития ВП на клетке вносит вклад работа кальциевых каналов плазматической мембраны. Для уточнения результатов и выявления непосредственной стадии участия кальциевых каналов в генерации электрической реакции, через 10, 20, 30 и 40 секунд после индукции ВП в бескальциевой среде в омывающий раствор вносили кальций (10-3 М). Максимальное увеличение амплитуды ВП после внесения ионов Ca^{2+} в среду наблюдалось на 10 и 20 секундах, после индукции реакции. По результатам всей работы можно сделать вывод о непосредственном участии ионов Ca^{2+} в развитии ВП, при этом имеются основания полагать, что работа кальциевой сигнальной системы в данном случае является пусковым механизмом в генерации электрического ответа.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (12-04-00837-а).

ТРЕХПУЛОВАЯ КИНЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ АКТИВАЦИИ ПРЕСИНАПТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ

Three-pool kinetic model of presynaptic membrane activation

Кисляк С.В.¹, Васильева А.Н.²

¹ – Национальный технический университет Украины “КПИ”, медико-инженерный факультет, кафедра медицинской кибернетики и телемедицины, Киев 03056, ул. Янгеля 16/2, Тел/факс: +38(044) 406-85-74; e-mail: kisluk@mail.ru; ² – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, физический факультет, кафедра теоретической физики, Киев 01601, ул. Владимирская 64; e-mail: vasilev@univ.kiev.ua

Предлагается модель, которая описывает процесс активации пресинаптической мембраны. При этом учитывается пуловая организация везикул пресинаптической мембраны. В частности, мы исходим из того, что везикулы в структуре пресинаптической мембраны распределены неравномерно и формируют три группы или пула. Везикулы первого пула наиболее мобильны и готовы к эндоцитозу при деполяризации. Пополнение везикул первого пула происходит за счет второго пула. В свою очередь второй пул восстанавливается за счет везикул третьего пула, который, как полагается в модели, имеет бесконечное количество везикул. Представленная модель базируется на кинетических уравнениях, описывающих изменение со временем количества везикул с медиатором для трех пулов. Модель учитывает межпуловые перемещения везикул. Если через $x(t)$ обозначить количество везикул во втором пуле, то в рамках предложенной модели динамика этого параметра будет определяться на основе уравнения:

$$\frac{dx}{dt} = -k_1 J(t)x(t)(y_0 - y(t)) + k_2(1 - J(t))(x_0 - x(t)) \quad 1)$$

где $J(t)$ – функция-индикатор поступления на пресинаптическую мембрану нервного импульса. При $J(t)=1$ – импульс есть, а при $J(t)=0$ импульс отсутствует. Пополнение везикул за счет резервных пулов наблюдается при отсутствии импульса, а при его наличии, везикулы могут только перемещаются в сторону синаптической щели. Первое слагаемое (с феноменологическим коэффициентом k_1) описывает освобождение везикул второго пула при наличии вакантных мест в первом пуле. Второе слагаемое (с феноменологическим коэффициентом k_2) описывает процесс восстановления второго пула за счет резервного третьего пула. Параметры модели y_0 и x_0 определяют максимальное количество везикул в первом и втором пулах соответственно. Если через $y(t)$ обозначить количество везикул в первом пуле, то динамику изменения этого параметра в рамках модели будет определять уравнение:

$$\frac{dy}{dt} = -k_3 J(t)y(t) + k_4(1 - J(t))x(t)(y_0 - y(t)) \quad 2)$$

где первое слагаемое (с феноменологическим коэффициентом k_3) соответствует количеству освободившихся везикул первого пула. Второе слагаемое (с феноменологическим коэффициентом k_4) описывает процесс пополнения первого пула везикулами второго резервного пула. Через $z(t)$ обозначим количество везикул в синаптической щели. Динамику изменения этого параметра определим из уравнения:

$$\frac{dz}{dt} = k_1 J(t)x(t)(y_0 - y(t)) + k_3 J(t)y(t) - k_5(1 - J(t))z(t) \quad 3)$$

где третье слагаемое (с феноменологическим коэффициентом k_5 соответствует процессу гидролиза медиатора в синаптической щели. Уравнения (1-3) полностью определяют кинетические свойства системы при условии трехпуловой организации везикул в структуре пресинаптической мембраны.

РОЛЬ БИКАРБОНАТА В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОМ ОКИСЛЕНИИ ВОДЫ

Role of bicarbonate in the mechanism of photosynthetic water oxidation

Климов В.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук, Пущино, 142290, Россия; email: klimov@issp.serpukhov.su

Обсуждается возможность участия ионов бикарбоната в фотосинтетическом окислении воды в качестве основания, акцептирующего выделяющиеся в этом процессе протоны, и в качестве лиганда для катионов марганца в процессе фотоформирования неорганического ядра водоокисляющего комплекса.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И СОСТАВА ПРИРОДНЫХ ЛИПИДОВ И ХАРАКТЕРИСТИК СФОРМИРОВАННЫХ ИЗ НИХ ЛИПОСОМ**Interrelation between the physicochemical properties and composition of natural lipids and characteristics of liposomes formed from them****Климович М.А., Козлов М.В., Шишкина Л.Н.**Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,
119334, Москва, ул. Косыгина, 4

Тел.: +7(495)939-7186; Факс: +7(499)137-41-01; e-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru

Поверхностно-активные свойства фосфолипидов, являющихся одними из основных структурных компонентов биомембран, широко используются для формирования из них липосом. Поскольку физико-химические свойства ПАВ в растворе зависят от соотношения размеров их гидрофобной и полярной групп, то можно предположить, что состав и свойства липосом обусловлены природой исходных липидов. Целью работы являлось изучение взаимосвязей между физико-химическими свойствами и составом природных липидов и характеристиками сформированных из них липосом.

Липосомы формировали из липидов печени и головного мозга самок беспородных мышей. Физико-химические свойства и состав липидов органов животных модифицировали проведением экспериментов в осенний и весенне-летний сезоны. Выявлены достоверные различия между показателями липидов органов мышей и аналогичными характеристиками сформированных из них липосом. Так, липиды липосом обладали сниженной способностью разлагать пероксиды по сравнению с величиной антипероксидной активности (АПА) для исходных липидов. Кроме того, при формировании липосом выявлено увеличение доли лизоформ и сфингомиелина (СМ) в составе ФЛ липосом из липидов головного мозга в осеннем сезоне, а липосом из липидов печени в весеннем сезоне. Формирование липосом из липидов органов животных вызывало повышение жёсткости мембраны и снижение способности липидов к окислению. Наиболее выраженными эти изменения были в липосомах, сформированных из липидов головного мозга.

Показано, что включение холестерина в состав билayers липосом существенно зависит от степени ненасыщенности исходных липидов. Обнаружены прямые корреляционные взаимосвязи между относительным содержанием лизоформ в ФЛ липосом и их средним размером, а также между долей стерина в исходных липидах и размером сформированных из них липосом. Выявлены устойчивые и однотипные взаимосвязи между содержанием диеновых конъюгатов и кетодиенов; диеновых конъюгатов и стерина; долей лизоформ и СМ; содержанием пероксидов в липидах или АПА и количеством кетодиенов как в липидах органов мышей, так и сформированных из них липосом. Это свидетельствует о наличии единого механизма функционирования физико-химической системы регуляции перекисного окисления липидов как на уровне мембран, так и на органном уровне, что позволяет использовать липосомы, сформированные из природных липидов в качестве адекватной модели для изучения механизма регуляции метаболизма в норме и при повреждающих воздействиях.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПОЛИМЕРОВ

Development of technology of receiving pharmaceutical preparations with application of biodegraded polymers

Ковалева Т.А., Макарова Е.Л.

Воронежский государственный университет,
394006, Воронеж, Университетская площадь, 1.
Тел.: +7(4732)208-586; +7(4732)208-578; факс: +7(4732)208-308;
e-mail: makarova7809@mail.ru

Технологии контролируемого высвобождения лекарств актуальны для направленно-го транспорта биологически активных веществ. Препараты равномерно распределяются по всему организму: попадают в очаги болезни и в здоровые органы. Проблему можно решить при помощи направленной доставки фармацевтических препаратов пролонгированного действия вместе с биodeградируемым полимером — тогда лекарство высвобождается не моментально, а по мере деградации носителя.

Гидролитические ферментные препараты используют как замещающие терапевтические средства для коррекции гипо- и дис-ферментозов желудочно-кишечного тракта. Использование белков в качестве носителей для иммобилизации ферментов представляет интерес, как для фундаментальных исследований, так и для практических целей. Этот интерес обусловлен тем, что многие ферменты в клетке функционируют в тесном контакте с другими компонентами, в частности с липидами и белками. Уникальная структура белка коллагена позволяет ему быть носителем и протектором лекарственных веществ, пролонгируя их нахождение в организме. В отличие от других полимеров, применяемых с этой целью, коллаген полностью утилизируется организмом, что исключает опасность его накопления в органах и тканях. Возможность регулирования лизиса коллагена посредством модификации его дублированием позволяет создать пролонгированные препараты с разным сроком действия лекарственных препаратов.

В связи с вышеизложенным нами была проведена адсорбционная иммобилизация глюкоамилазы (α -1,4:1,6 глюкан-4,6-глюкогидролаза, КФ 3.2.1.3) на коллагене, выделенном из соединительной ткани крупного рогатого скота.

Показано, что иммобилизованная глюкоамилаза сохраняла 70 % каталитической активности свободного энзима, обладала достаточной прочностью и не разрушалась при гидролизе крахмала, в реакторе периодического действия при многократном применении (в количестве 15 раз).

Установлено, что иммобилизованный фермент проявляет максимальную каталитическую активность при температуре 550С, что на 5 °С выше, чем для свободного энзима.

При иммобилизации глюкоамилазы на коллагене наблюдается расширение диапазона значений pH (4,5-5,0), при которых имеет место максимальная каталитическая активность.

Способность коллагена к биodeградации открывает перспективы создания лекарственных препаратов пролонгированного действия, в которых коллаген играл бы роль депо.

**КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
КОМПЛЕКСОВ БЕЛКОВ ПРИ ФОТОСИНТЕЗЕ****Computer simulation of protein-protein complex formation in photosynthesis****Коваленко И.Б., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б.**Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова,
119192, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

Тел.: +7(495)939-02-89; факс: +7(495)939-11-15; e-mail: ikovalenko78@gmail.com

Разработан новый метод компьютерного моделирования диффузии и взаимодействия белков в субклеточных компартментах. В этом методе явным образом описываются диффузия, электростатические взаимодействия белков и образование предварительного комплекса. Взаимодействующие молекулы представляются как твердые тела с определенным распределением зарядов на них. Молекулы белков рассматриваются как броуновские частицы, совершающие поступательное и вращательное движение в вязкой среде. Для описания процесса движения используется уравнение Ланжевена, описывающее изменение каждой координаты со временем под действием случайной и электростатической сил. Для вычисления коэффициентов вязкого трения в модели форма молекулы белка аппроксимируется эллипсоидом вращения.

Метод позволяет корректно описать процесс образования комплексов фотосинтетических электрон-транспортных белков при различных значениях ионной силы и pH раствора [1, 2]. Модель демонстрирует немонотонные зависимости скорости образования комплексов белков пластоцианина и ферредоксина с фотосистемой 1 как результат электростатических взаимодействий [3]. Модель позволяет описать взаимодействие пластоцианина и цитохрома *f* в люмене тилакоида хлоропласта, учитывая электростатические взаимодействия между белками и тилакоидной мембраной [4, 5]. Таким образом, предлагаемый метод моделирования позволяет выявить межмолекулярные взаимодействия, лежащие в основе регуляции фотосинтетического электронного транспорта.

Работа поддержана грантами РФФИ 11-04-01019 и 11-04-01268.

1. Kovalenko I.B. et al. / Phys. Biol, 2006. V. 3. P. 121-129.
2. Kovalenko I.B. et al. / Phys. Biol., 2010. V. 7, 26001.
3. Kovalenko I.B. et al. / BioSystems 2011. V. 103. P. 180-187.
4. Князева О.С., Коваленко И.Б. и др. / Биофизика, 2010. Т. 55. С. 259-268.
5. Коваленко И.Б., Абатурова А.М. и др. / Биофизика, 2008. Т. 53. С. 261-270.

**ЛИПИДЫ В ЕСТЕСТВЕННОМ И ИСКУССТВЕННОМ ГИПОБИОЗЕ
МЛЕКОПИТАЮЩИХ****Lipids in natural and artificial mammalian hypobiosis****Коломийцева И.К., Маркевич Л.Н., Перепелкина Л.Н., Быкова О.В.**

Федеративное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук (ИБК РАН), 142290, Московская обл., г. Пущино, ул.Институтская,3.
Тел.: +7(4697)73-93-26; e-mail: kolomiytsevsikra@rambler.ru

Липиды играют важную роль в адаптации эктотермов к температурам окружающей среды, влияя на вязкостные свойства мембран. В адаптации млекопитающих, относящихся к категории эндотермов, на первый план выступает структурно-функциональная роль липидов, как участников сигнальных систем клетки и модуляторов биологических структур. Естественный гипобиоз мелких млекопитающих – оцепенение (баут) зимней спячки (гибернации) протекает при падении T тела до -2 °С. В ходе гибернации млекопитающих наблюдали сезонные изменения регуляции метаболизма липидов, касающиеся и активных, и спящих животных. Активировался липолиз в жировых депо, в крови возрастало количество жирных кислот и холестерина. Изменения липидного состава тканей специфичны: количество жирных кислот увеличено в печени и не изменялось в неокортексе; в ткани, эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) и синапсосомах неокортекса летом резко увеличено количество сфингомиелина и уменьшено количество фосфатидилхолина. В ЭР печени и почек, а также в митохондриях печени при гибернации наблюдалось высокое содержание холестерина. В неокортексе отсутствовали сезонные изменения моно и диглициридов, в печени их количество резко увеличивалось. Баут гибернации не влиял на липидный состав мембран ЭР и митохондрий печени. В ЭР неокортекса, напротив, при оцепенении животного падало количество холестерина, лизофосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина. Оцепенение сопровождалось активацией метаболизма жирнокислотных компонентов фосфолипидов неокортекса. Прослеживалась зависимость между функцией органа или органеллы в гибернации и изменениями липидного состава. Высказано предположение о роли липидов во взаимодействии вода/белки при оцепенении в ходе баута. Состояние искусственного гипобиоза у крыс наступает в условиях гипоксии/гиперкапнии при снижении T тела до 14-22 °С. Повышение количества жирных кислот при искусственном гипобиозе органоспецифично. В крови, тимусе и сердечной мышце отмечено повышение количества жирных кислот, в неокортексе количество жирных кислот не менялось. Изменения липидного состава в мембранах и органеллах неокортекса крыс при искусственном гипобиозе резко отличались от изменений липидов мембран неокортекса гибернирующих сусликов. В ЭР неокортекса уменьшалось количество фосфатидилинозитола. В ядрах нейронов и глии неокортекса росло отношение холестерин/фосфолипиды, а в ядрах глии достоверно росло количество холестерина и сфингомиелина. В тимусе состояние искусственного гипобиоза вызывало рост количества массовых фосфолипидов и фосфатидилинозитола. Установлен эффект последствия состояния искусственного гипобиоза: через 48 ч после окончания охлаждения на 50-60% росло количество белка и фосфолипидов в ЭР неокортекса. В тимусе через 24 ч после охлаждения количество жирных кислот и массовых фосфолипидов приходило в норму с одновременным ростом диглициридов и фосфатидилсерина. Искусственный гипобиоз вызывает стресс ответ.

Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-00993-а, 2009-2011 гг.

РАЗНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕМЕЩЕНИЯ ГОРМОН-РЕЦЕПТОРНЫХ КОМПЛЕКСОВ ПРИ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ НА МЕМБРАНЕ ГЕПАТОЦИТОВ В ХОДЕ ЭНДОЦИТОЗА РЕЦЕПТОРОВ ИНСУЛИНА И ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА-I.

Different mechanism of hormone-receptor complexes translocation at low temperature during insulin and insulin-like growth factor I receptors endocytosis on rat plasma membrane hepatocytes.

Колычев А.П., Терновская Е.Е

ИЭФБ РАН, 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44
Тел.: +7(812) 5523117; факс: +7(812) 5523012; e-mail: kolychev.ap@mail.ru

Инсулин вызывает лиганд-стимулируемый эндоцитоз рецептора, приводящий к интернализации инсулин-рецепторного комплекса (ИРК) в клетку – процессу, имеющему ряд специфических стадий. Эндоцитоз рецепторов пептидных гормонов рассматривается как процесс универсальный без должного внимания к специфическим особенностям лиганд-зависимого эндоцитоза. Различие же функциональных ролей инсулина и инсулиноподобного фактора роста-I (ИФР-I) требует исследования особенностей интернализации и процессинга гормон-рецепторных комплексов (ГРК), образованных двумя структурно и функционально родственными гормонами. С целью выяснения отличий основных этапов интернализации двух родственных гормонов на изолированных гепатоцитах крыс прослежена динамика интернализации 125I-инсулина и 125I-ИФР-I при 37 и 120С. Динамика интернализации 125I-инсулина и 125I-ИФР-I в условиях низкой температуры не совпала с изменениями рецепторного связывания. Если уровень интернализации 125I-ИФР-I, несмотря на снижение рецепторного связывания, оставался неизменным, то уровень интернализации 125I-инсулина заметно снижался вопреки повышению его рецепторного связывания в данных условиях. Анализ выявил разные формы распределения 125I-инсулина и 125I-ИФР-I внутри клетки и на мембране в ходе интернализации. При 370С только часть 125I-инсулина, относительно меченого гормона, расположенного на поверхности клетки (<70%) попадала в неё, тогда как доля 125I ИФР-I в клетке имела тенденцию превышения над уровнем 125I ИФР-I на поверхности. При 120С отмечалось взаимосвязанное перераспределение 125I-инсулина. Увеличивался уровень 125I-инсулина, связанного на плазматической мембране (на 42%, $p < 0,008$), а доля его в клетке снижалась (на 40%, $p < 0,03$). Форма распределения 125I-ИФР-I при 120С не менялась и низкая температура не влияла на эндоцитоз ИФР-I рецептора. Низкая температура, таким образом, запускала «механизм торможения» ИРК на мембране на участке до поступления комплексов в клатриновые ямки. В то же время эндоцитоз 125I-ИФР-I через клатриновые ямки, несмотря на снижение рецепторного связывания (на 26%) и уменьшение доли внутриклеточного 125I-ИФР-I в гепатоцитах (на 20%), не менялся. Каждый из родственных пептидов запускает специфический механизм перемещения ГРК по плазматической мембране. Если при низкой температуре на мембране гепатоцитов включается механизм торможения эндоцитоза рецепторов инсулина, то в эндоцитозе ИФР-I рецепторов предусмотрены механизмы его стабилизации.

**НОВЫЕ РАЗОБЩАЮЩИЕ БЕЛКИ UCPs НЕ ПРОЯВЛЯЮТ СВОЙСТВ ТИПИЧНЫХ
ДЛЯ UCP1 ИЗ БУРОГО ЖИРА, ВКЛЮЧАЯ КАК ПРОТОНОФОРНУЮ АКТИВНОСТЬ,
ТАК И СПОСОБНОСТЬ ТРАНСПОРТИРОВАТЬ АНИОНЫ ХЛОРА И ПИРУВАТ**

**Novel uncoupling proteins UCPs do not exhibit features typical for UCP1 from brown
adipose tissue, including protonophore activity and ability to transport chlorine anions
and pyruvate**

Комелина Н.П., Амерханов З.Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
биофизики клетки Российской академии наук, 142290, Пушкино, ул. Институтская, 3.
Тел: 7(095) 925-59-84, Факс: (4967) 33-05-09, email: komelinanp@mail.ru

У животных в различных тканях обнаружены белки UCP2 и UCP3 высоко гомологичные разобщающему белку из бурой жировой ткани UCP1. Нам, как и некоторым другим исследователям не удалось обнаружить проявлений функциональной активности UCP2 и UCP3, которую можно было связать с их разобщающими свойствами на интактных препаратах митохондрий из различных тканей крыс и гибернирующих сусликов, где во время зимней спячки экспрессия этих белков повышена. Недавно было обнаружено, что экспрессия UCP2 в культуре клеток животных снижает их способность утилизировать углеводы, и способствует утилизации жиров [1]. Была предположена гипотеза о том, что UCPs являются метаболическим сенсором, способным переключать углеводный на жировой метаболизм, транспортируя пируват из митохондрий.

В митохондриях из бурого жира транспорт пирувата через UCP1 действительно легко обнаруживается по GDP чувствительному набуханию в калиевой соли пирувата, индуцированному валиномицином. Такой транспорт не ингибируется α -СНС, специфическим ингибитором пируватного переносчика, что говорит об участии именно UCP1. В данной работе мы исследовали данную гипотезу в отношении UCP3 и UCP2. Однако в митохондриях скелетных мышц и печени гибернирующих сусликов мы не обнаружили сколько-нибудь заметного транспорта пирувата в аналогичных условиях. В то время как электронейтральное поглощение пирувата, индуцированное нигерицином в пирувате калия, осуществляемое пируватным переносчиком, наблюдается и ингибируется его специфическим ингибитором α -СНС. В митохондриях печени и скелетных мышц нам не удалось обнаружить проводимость для ионов хлора, которая характерна для митохондрий бурого жира, содержащих UCP1.

Таким образом, мы обнаружили, что UCP2 и UCP3 не способны транспортировать пируват и хлор в митохондриях печени и скелетных мышц гибернирующих сусликов, в отличие от UCP1 из бурой жировой ткани. Полученные результаты выявляют существенные различия в транспортных свойствах между UCP1 и его гомологами из других тканей, и указывают на необходимость более тщательного изучения биохимических свойств разобщающих белков UCP2 и UCP3.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта по Программе Президиума РАН «Механизмы интеграции молекулярных систем при реализации физиологических функций»

[1] F. Bouillaud, Biochim. Biophys. Acta 1787 (2009) 377–383.

ТОРСИОННАЯ ЛАБИЛЬНОСТЬ ПЕПТИДНОЙ ГРУППЫ И БИФУРКАЦИОННОЕ ВОДОРОДНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ КАК ФАКТОРЫ ИНИЦИИРОВАНИЯ АЛЬФА-СПИРАЛИЗАЦИИ ПЕПТИДОВ

Torsion lability of peptide group and bifurcation hydrogen-bonding as initiation factors of alpha-helix formation of peptides

Кондратьев М.С., Самченко А.А., Кабанов А.В., Комаров В.М.

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, ул.Институтская, 3.
Тел.: +7 (4967) 73-94-04; факс: +7 (4967) 33-05-09 E-mail: ma-ko@bk.ru

Исследование механизма сворачивания аминокислотных цепей олигопептидов и белков в их нативную структуру остается одной из фундаментальных проблем физико-химической биологии и протеомики. Существующие данные об обратимости процесса «сворачивания-разворачивания» белков позволили утвердить постулат о том, что вся необходимая информация для определения нативной формы белка содержится именно в самой последовательности аминокислот. Однако, чаще всего, говоря о фолдинге полипептидов, имеют в виду процесс взаимодействия уже сформировавшихся элементов вторичной структуры или даже упаковки целых доменов – тогда как начальные стадии, например, альфа-спирализации или формирования бета-структур остаются малоизученными и, таким образом, требуют существенной детализации.

Цель нашего исследования заключалась в обосновании важнейшей роли исходной торсионной лабильности пептидной группы и нековалентных взаимодействий боковых групп аминокислотных остатков в инициировании вторичной структуры олигопептидов. Именно на основе учета особенностей электронного строения аминокислот и пептидов удалось значительно детализировать физический механизм зарождения альфа-спирали, указав на остатки, ключевые для реализации этого процесса. Нами также была также проведена оценка вклада водного окружения в оптимизацию структуры пептидных групп и стабилизации альфа-спиральных и бета-слоистых форм олигопептидов – поскольку гидратация является важнейшим элементом, обуславливающим структурно-динамическую организацию пептидов и белков в живых системах.

В данной работе на базе квантово-химических и молекулярно-динамических расчетов впервые единым образом проанализировано структурообразование предпочтительных форм широкого класса молекул – от простейших амидов и природных аминокислот до олигопептидов. Показана нетривиальная роль структурного полиморфизма неплannарного строения пептидной группы и нековалентных взаимодействий аминокислотных остатков друг с другом и с пептидными группами в процессе фолдинга олигопептидов. В соответствии с накопленными экспериментальными данными выявлена ключевая роль бифуркационного внутримолекулярного водородного связывания в инициировании альфа-спиральной организации молекул олигопептидов, содержащих заряженные аминокислотные остатки аспартата, глутамата, аргинина, лизина и гистидина.

Полученные результаты имеют как фундаментальное значение – для понимания биофизических механизмов ранних стадий сворачивания белков и пептидов – так и прикладное: могут быть использованы в биоинженерии при рациональном дизайне новых биомакромолекул с заданной пространственной структурой или «запрограммированной» кинетикой перехода «клубок-спираль».

ГИСТЕРЕЗИСНЫЕ ЯВЛЕНИЯ В НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ.

hysteresis effects in some biological studies

Константинова Н.А., Куликова И.Ю., Фирсов Н.Н. Квашнина О.П.

ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова. Москва. Б. Пироговская, д.9а
Тел.: +7(499) 246 75 69, факс: +7(499)246 87 71, e-mail: Kulikova-rgmu@rambler.ru

Цель работы: исследовать динамику конформационных изменений, приводящих к формированию криопреципитата (КП) при циклическом изменении температуры раствора криоглобулинов (КГ) и определить влияние КГ на реологию крови.

Материалы и методы: КГ выделялись из свежей крови больных с системной красной волчанкой (СКВ), хроническим гломерулонефритом (ХГН). Методика выделения состояла из двух этапов. На первом этапе использовали раствор ПЭГ-6000 в конечной концентрации 7% при 37 °С для удаления обычных иммунных комплексов. На втором этапе при 40 °С происходило формирование КП. Методом центрифугирования его отделяли от балластных белков и ресуспендировали до начального объема. Циклически повышая и охлаждая раствор криоглобулинов от 4 до 40 °С, спектрофотометрически, при длине волны 500нм и температурах 5, 15, 25, 40 °С, количественно оценивали образовавшийся КП.

Результаты исследования: была обнаружена сложная зависимость оптической плотности раствора КГ от направления изменения температуры раствора. Характер ее напоминал гистерезисные петли, площадь и форма которых различались в зависимости от типа патологии, и от класса КГ, обнаруживаемых у данного больного. Поскольку, в основе устойчивого функционирования многих биологических систем лежит способность этих систем к динамическому равновесию, то устойчивое состояние достигается наличием точных обратных воздействий, осуществляемых, в виду сложности биологических систем, не одним каким-то параметром, а рядом процессов. Это подтверждается данным исследованием, поскольку наблюдалась различная динамика и устойчивость КП при многократных изменениях температуры, а температура раньше оценивалась как единственный фактор формирования преципитата. Размеры и форма петель может стать дополнительным параметром, характеризующим КП и КГ, формирующие преципитат. Во второй части исследования был выявлен новый показатель, характеризующий микрореологические свойства крови — площадь петли гистерезиса. Исследуя агрегационные характеристики крови больных СКВ и псориатическим артритом на эритроагрегометре LADE методом регистрации интенсивности обратного светорассеяния от Куэттовского потока крови, вычисляли площадь петли гистерезиса при изменении скорости сдвига ступенчато от 110 с⁻¹ до 2,5 с⁻¹ и обратно до 110 с⁻¹. Форма петли гистерезиса существует в двух видах: «классическая» (выпуклая) и с перекрестом в виде восьмерки, что свидетельствует о новой реологической информации, содержащейся в этом показателе.

**ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТИВОВИРУСНОГО ПРЕПАРАТА
1-БОРААДАМАНТАНА С ФОСФОЛИПИДНЫМИ МОНОСЛОЯМИ КАК МОДЕЛЯМИ
МЕМБРАНЫ ВИРУСА ГРИППА**

**Study interaction of antiviral preparation 1-boraadamantane with phospholipids
monolayers as models membrane of flu virus**

Контаров Н.А, Погарская И.В., Балаев Н.В., Юминова Н.В.

Научно – исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, РАМН,
Москва, 105064, Малый Казенный пер., д. 5а;
Тел.: +7(495) 674-01-99; e-mail: kontarov@mail.ru

Проведено изучение поверхностно-активных свойств 1-бораадамантана на модели мономолекулярных фосфолипидных слоев. Получены изотермы сжатия для монослоя из фосфатидилхолина до и после добавления 10⁻⁷-10⁻⁶ М 1-бораадамантана. Из анализа полученных изотерм сжатия можно заключить, что при концентрации 1-бораадамантана 10⁻⁶ М происходит увеличение площади приходящейся на одну молекулу фосфолипида. Изменение площади одной молекулы фосфолипида приводит к уменьшению частоты латеральной диффузии фосфолипидных молекул, разности потенциалов монослоя и угла расположения молекул фосфолипида к поверхности монослоя. Указанные явления могут приводить к невозможности взаимодействия мембран вируса и клетки.

ИНГИБИРОВАНИЕ ИОНАМИ ДВУХВАЛЕНТНЫХ МЕТАЛЛОВ Tl^{+} -ИНДУЦИРОВАННОГО Ca^{2+} -ЗАВИСИМОГО НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО КАНАЛА ВО ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЕ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ**Bivalent metals inhibition of Tl^{+} -induced mitochondrial permeability transition pore in the inner membrane of rat liver mitochondria****Коротков С.М., Коновалова С.А., Брайловская И.В.**

ИЭФБ РАН, 194223, Санкт-Петербург, п-т. М. Тореза, 44;
Тел.: +7(812)552-93-44 доб.245; факс: +7(812)552-30-12;
e-mail: korotkov@SK1645.spb.edu

Показано, что вблизи транслоказы адениновых нуклеотидов со стороны матрикса имеются участки с повышенным сродством к ионам Ca^{2+} . Взаимодействие ионов Ca^{2+} с этими участками в условиях снижения электрохимического потенциала ($\Delta\psi_{\text{мито}}$) стимулирует открытие кальций-зависимого неспецифического канала (КЗНК) во внутренней митохондриальной мембране (ВММ). При умеренной кальциевой нагрузке ВММ становится проницаемой для неорганических катионов (K^{+} , Na^{+} , H^{+} и Ca^{2+}) и органических молекул до 300 кДа [1]. Ранее мы показали, что кальциевая нагрузка изолированных митохондрий печени крысы (МПК), инкубированных в средах с $TlNO_3$ и нитратами моновалентных катионов (KNO_3 , $LiNO_3$, $NaNO_3$, NH_4NO_3), индуцировала открытие КЗНК в ВММ [2]. Целью данной работы было изучить влияние Sr^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} и Ni^{2+} на индукцию КЗНК в опытах с митохондриями печени крысы, нагруженными ионами Ca^{2+} (СаМПК) и энергизованными глутаматом + малатом или сукцинатом (субстратами I-го и II-го дыхательных комплексов, соответственно). Добавка Ca^{2+} в среду с $TlNO_3$ и KNO_3 стимулировала открытие Tl^{+} -индуцированного КЗНК во внутренней мембране, что проявлялось в снижении дыхания митохондрий в присутствии 2,4-динитрофенола (ДНФ), в ускорении их набухания и в большем рассеивании $\Delta\psi_{\text{мито}}$. Внесение в эту среду Sr^{2+} и Mn^{2+} заметно препятствовало Ca^{2+} -индуцированному снижению дыхания митохондрий в присутствии ДНФ независимо от типа применяемого субстрата. Сходный эффект оказали ионы Co^{2+} и Ni^{2+} в аналогичных опытах с митохондриями, энергизованными сукцинатом. Кроме того, Sr^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+} со всеми субстратами заметно тормозили набухание СаМПК. При этом они препятствовали Ca^{2+} -индуцированному рассеиванию $\Delta\psi_{\text{мито}}$ в опытах с сукцинатом. В отличие от остальных катионов и независимо от типа применяемого субстрата ионы Ba^{2+} не препятствовали открытию Tl^{+} -индуцированного КЗНК во внутренней мембране СаМПК. В опытах с Ba^{2+} влияние Ca^{2+} на набухание, дыхание и рассеивание $\Delta\psi_{\text{мито}}$ было таким же, как и в опытах с одним Ca^{2+} . Ранее было показано, что связывание Sr^{2+} и Mn^{2+} с участками с повышенным сродством к ионам Ca^{2+} со стороны матрикса заметно снижало открытие КЗНК [3]. Таким образом можно предположить, что обнаруженный нами ингибирующий эффект Sr^{2+} и Mn^{2+} на индукцию КЗНК в опытах с СаМПК в среде с $TlNO_3$ и KNO_3 , как и в наших опытах с Cd^{2+} [4], связан с взаимодействием этих катионов с указанными выше участками ВММ, а ингибирующее действие Co^{2+} и Ni^{2+} возможно обусловлено конкуренцией этих ионов с Ca^{2+} за общую для них систему транспорта в митохондриальную матрикс.

1. Ichas F., Mazat J.P. / Biochim. Biophys. Acta., 1998. V. 1366. P.33-50.
2. Korotkov S.M., Saris N.E. / J. Bioenerg. Biomembr., 2011. V. 43. № 2. P.149-162.
3. Bernardi P., Veronese P., Petronilli V. / J. Biol. Chem., 1993. V. 268. № 2. P. 1005-1010.
4. Belyaeva E.A., Glazunov V.V., Nikitina E.R., Korotkov S.M. / J. Bioenerg. Biomembr., 2001. V. 33. № 4. P. 303-318.

**РАСЧЕТНО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК
ПОЛЯ ИЗЛУЧЕНИЯ ИМПУЛЬСНОГО НЕЙТРОННОГО ГЕНЕРАТОРА В ДИАПАЗОНЕ
НИЗКИХ ДОЗ**

**Experimental studies and calculations of radiation field characteristics of pulsed
neutron generator at low doses**

Корякина Е.В., Потетня В.И., Леонова Е.М., Ульяненко С.Е.

ФГБУ Медицинский радиологический научный центр МЗ РФ,
249036, г. Обнинск, ул. Королева, 4
Тел.: +7(48439)9-72-10; факс: +7(48439)9-72-10; e-mail: ek-koryakina@mail.ru

Наблюдаемая нерегулярная форма дозовой кривой выхода aberrаций хромосом (АХ) в лимфоцитах человека при действии импульсного нейтронного излучения с энергией 14 МэВ с участками гиперчувствительности (ГЧ) в области доз 0,1–0,15 Гр и индуцированной резистентности (ИР) при дозах 0,15–0,25 Гр (плато) [1], для своего подтверждения требовала проведения детального исследования дозиметрических характеристик действующего радиационного поля и по возможности точно учесть все компоненты поглощенной дозы, учитывая рассеянное нейтронное и γ -излучение, их энергетический спектр, от которого в значительной мере зависит величина биологического эффекта. Использованный в работе импульсный нейтронный генератор ИНГ-031 является прототипом медицинских установок для нейтронной терапии, при проведении которой воздействию нейтронов в дозах диапазона ГЧ/ИР подвергаются здоровые органы и ткани.

В экспериментальных и расчетных дозиметрических исследованиях точно моделировали условия проведения цитогенетических опытов, включая геометрию облучения, объем крови, способ размещения (один на другой), и т.д. Среднюю мощность дозы нейтронов и сопутствующего γ -излучения измеряли с помощью дозиметрической системы Unidos с парой ионизационных камер (тканезквивалентной, магниевой). Поток нейтронов и среднюю керму определяли трековыми детекторами деления с мишенями из ^{238}U и ^{237}Np . Методом Монте-Карло рассчитывали спектры, средний поток и керму нейтронов и γ -излучения в образцах крови.

Получено, что изменение дозы нейтронов в зависимости от расстояния в расчетном и экспериментальном исследованиях совпадает, в том числе в области низких доз. Одинаковые, в пределах погрешностей, результаты измерений пороговыми детекторами ^{237}Np и ^{238}U указывают, что вклад рассеянных нейтронов вдали от мишени мало влияет на показания детекторов. Результаты расчетов методом Монте-Карло показали, что керма на 95–98% обусловлена нейтронами с энергий 14 МэВ, и за счет рассеяния нейтронов от стола, пола и стен помещения возрастает всего на 2% для нижнего флакона Карреля и не изменяется для верхнего флакона с образцами крови. Результаты работы подтверждают феномен, что в области низких доз нейтронного излучения ИНГ-031 на дозовой зависимости выхода АХ проявляется участок ГЧ/ИР в диапазоне доз 0,12–0,25 Гр.

КАЛИКС[4]АРЕНЫ КАК СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ЭФФЕКТОРЫ АТФ-ГИДРОЛАЗНЫХ СИСТЕМ**Calix[4]arenes as a supramolecular effectors of ATPases****Костерин С.А.**

Институт биохимии им. А.В.Палладина НАН Украины, Украина,
01601, Киев-30, ул. Леонтовича, 9
Тел.: [380-44]234-16-53; факс: [380-44]279-63-65; e-mail: kinet@biochem.kiev.ua

АТФ-гидролазным системам принадлежит фундаментальное значение в обеспечении электро- и фармакомеханического сопряжения в гладких мышцах [1]. Речь идёт об АТФ-зависимых кальциевых насосах (Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы) плазматической мембраны и саркоплазматического ретикулума, натриевом насосе (Na^{+} , K^{+} -АТФазе) плазматической мембраны, а также об АТФ-гидролазной системе сократительных белков. Изменения активности АТФ-гидролаз (в частности Ca^{2+} -транспортирующих) – одна из существенных причин возникновения патологий сократительной функции гладкомышечных клеток внутренних органов и систем органов (гипертензия, гипо- и гипертонус матки, изменения в моторике желудочно-кишечного тракта и др.). Поэтому создание нетоксичных (малотоксичных) обратимых эффекторов (ингибиторов, активаторов), способных высокоафинно и селективно модифицировать функциональную активность АТФ-гидролаз гладких мышц при патологических состояниях – важнейший этап на пути поиска новых фармакологических препаратов, перспективных для лечения заболеваний, связанных с нарушением тонуса и сократительной активности гладкомышечных клеток. В контексте сказанного в последние годы пристальное внимание исследователей привлекают такие супрамолекулярные соединения, как циклические олигомеры фенолов – каликсарены. В докладе будут представлены комплексные экспериментальные результаты, полученные на «стыке» биофизики, биохимии и супрамолекулярной химии сотрудниками отдела биохимии мышц Института биохимии НАН Украины при изучении кинетических закономерностей и механизма действия каликс[4]аренов на АТФ-гидролазные системы миомерия [2-4]. Каликс[4]арены были синтезированы и охарактеризованы с использованием методов ядерного магнитного резонанса и инфракрасной спектроскопии в отделе химии фосфоранов Института органической химии НАН Украины (член-кор. НАНУ В.И.Кальченко и коллеги). В экспериментах использовались методы препаративной и аналитической биохимии, биохимической мембранологии, энзимологии, изотопной техники ($^{45}\text{Ca}^{2+}$), лазерно-корреляционной спектроскопии, спектрофотометрии, проточной цитофлуориметрии, световой, электронной и конфокальной микроскопии, ОФВЭЖХ, молекулярного моделирования, компьютерного докинг-моделирования и молекулярной динамики, тензометрии, химической и биохимической кинетики. В результате удалось идентифицировать ряд каликс[4]аренов, которые могут быть перспективными для создания высокоафинных селективных обратимых супрамолекулярных ингибиторов Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы (каликс[4]арен С-90) и Na^{+} , K^{+} -АТФазы (каликс[4]арены С-97, С-99 и С-107) плазматической мембраны (значения $10,5$ составляют соответственно $20\text{-}30$ мкМ и $< 0,1$ мкМ), а также активаторов системы аккумуляции ионов Са в митохондриях. Результаты, полученные при изучении влияния вышеуказанных каликс[4]аренов на энергозависимые Ca^{2+} - и Na^{+} -транспортирующие системы, сравниваются с данными о действии этих соединений на АТФ-гидролазную активность актомиозина и субфрагмента-1 миозина.

**МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕРАЦИИ Ca^{2+} ОТВЕТОВ НА НОРАДРЕНАЛИН
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА****Mechanisms underlying Ca^{2+} responses of human mesenchymal stem cells
to norepinephrine****Котова П.Д.¹, Язев Е.А.², Григорьева О.А.², Рогачевская О.А.¹, Сысоева В.А.²,
Ткачук В.А.², Колесников С.С.¹**

¹ – Институт биофизики клетки РАН,
142290, г. Пущино Московской области, ул. Институтская, 3
² – Факультет фундаментальной медицины МГУ,
117192, Москва, Ломоносовский пр., д.31, корп.5
Тел.:4967-739448; Факс: 4967-330509 ; e-mail: kpd-88@list.ru

Рецепторные и сигнальные системы мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека на данный момент недостаточно изучены. Между тем, адекватное представление об этих системах необходимо для понимания физиологических процессов, протекающих в них, и их биологических функций. Нами исследовалась агонист-зависимая Ca^{2+} сигнализация в МСК. Клетки выделялись из жировой ткани, полученной при плановых операциях, и в дальнейшем культивировались в течение 2-3 недель. Сигнальные процессы в МСК исследовались с использованием Ca^{2+} зонда Fluo-4 и микрофотометрии.

Оказалось, что в первичной культуре популяция МСК гетерогенна по чувствительности к различным агонистам рецепторов. В частности популяция МСК содержит субпопуляцию (5-10%) клеток, специфически отвечающих на норадреналин (50нМ – 1мкМ) мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} . В данной работе мы фокусировались на исследовании адренергической сигнальной системы. Примерно в половине случаев удаление наружного Ca^{2+} полностью ингибировало ответы МСК на норадреналин, в остальных случаях МСК генерировали практически нормальные, хотя несколько уменьшенные по амплитуде, Ca^{2+} ответы. Это свидетельствовало о том, что в МСК функционируют два механизма сопряжения адренорецепторов с мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} , ингибиторный анализ позволил выяснить основные детали этих механизмов.

Известно, что в самых разнообразных клетках α -адренорецепторы сопряжены с фосфоинозитидным каскадом и мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} . Использование агонистов, специфических для α_1 -, α_2 - и β -адренорецепторов, позволило установить, что ответы на норадреналин генерируются МСК преимущественно при участии α_2 -адренорецепторов. В клетках, способных отвечать на норадреналин в бескальциевой среде, α_2 -адренорецепторы сопряжены с фосфолипазой C, которая гидролизует PIP2 до IP3 и DAG с последующей стимуляцией IP3 рецепторов и выбросом депонированного Ca^{2+} . В МСК, не генерирующих Ca^{2+} ответы на норадреналин в бескальциевой среде, α_2 -адренорецепторы также сопряжены фосфолипазой C, но мобилизация внутриклеточного Ca^{2+} происходит не за счет активации IP3 рецепторов, а за счет их стимуляции входящим Ca^{2+} , т.е. по механизму Ca^{2+} -индуцированного выброса депонированного Ca^{2+} . Механизм сопряжения адренорецепторов с Ca^{2+} -проницаемыми каналами плазмолеммы, остается неизвестным, хотя полученные нами данные позволяют исключить прямую стимуляцию каналов липидным регулятором DAG или за счет генерации таких вторичных медиаторов, как арахидоновая кислота и фосфатидная кислота.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ ПРИ УФ-С ОБЛУЧЕНИИ

Кочарли Н.К., Гумматова С.Т., Абдуллаев Х.Д., Зейналова Н.М.

Бакинский Государственный Университет, Баку, Азербайджан
E-mail: sam_bio@mail.ru

Использование метода флуоресцентных зондов для изучения состояния мембран одноклеточных организмов благодаря своей высокой чувствительности является перспективным при действии на клетки различных физико-химических факторов.

В работе представлены результаты исследования влияния УФ-С излучения на характер и кинетические параметры мсек-замедленной эмиссии света, вызванной взаимодействием флуоресцентного зонда 1-анилинонафталин-8сульфоната (АНС) с компонентами мембранной системы 3-х дневной культуры клеток *Candida guilliermondii*-916.

Флуоресценцию измеряли на квантометрической установке с применением фосфороскопа, позволяющая регистрировать мсек-замедленную эмиссию света клетками. В суспензию клеток ($1 \cdot 10^8$ кл/мл) вводился водный раствор АНС в концентрации 10-5М. Затем образцы суспензии в объеме 5 мл, помещались в термостатированную измерительную кювету фотометрической установки, и производилась регистрация свечения.

Суспензию клеток дрожжей подвергали УФ-С облучению в кварцевом сосуде дозами $1,2 \cdot 10^2$ - $4,8 \cdot 10^2$ эрг/мм². Индукционная кривая, характеризующая мсек-замедленную эмиссию света клетками описывается S-образной кривой и зависит от температуры, pH среды (температура 250 С, pH=7)

установлено, что при низких дозах ($1,2 \cdot 10^2$ эрг/мм²) УФ-С излучения показатели индукционной кривой мсек-замедленной эмиссии света клетками дрожжей подавляется в 2 раза, а при высоких дозах ($4,8 \cdot 10^2$ эрг/мм²) в 5 раз.

Известно, что АНС локализуется на поверхности мембраны, благодаря присутствию отрицательно заряженной сульфониальной группы в молекуле зонда. Уменьшение интенсивности мсек-замедленной эмиссии света прежде всего указывает на изменение характера заряда полярных головок фосфолипидов при воздействии на клетки УФ-С излучения. В присутствии α -токоферола ($1 \cdot 10^{-6}$ М) индукционная кривая мсек-замедленной эмиссии света облученных УФ-С излучением не отличается от контроля. Это дает нам основание считать о роли свободных радикалов в увеличении амплитуды мсек-замедленной эмиссии света клетками, возникающих в результате перекисного окисления липидов мембран *Candida guilliermondii*-916 при действии УФ-С излучения.

**ИССЛЕДОВАНИЕ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ
И ПОСЛЕДУЮЩЕГО РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ КОЛЛАГЕНА****The study of radiation damage and remodeling of collagen****М.В. Кочуева¹, А.В. Масленникова^{1,2}, В.Н. Баграташвили⁴, В.А.Каменский²,
Н.Ю. Игнатьева³, Н.Л. Захаркина⁴, К.С. Кулабухова⁵**

¹ ГБОУ ВПО НижГМА Минздравсоцразвития России,
603005, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1.
Тел./факс: +7(831)-439-09-43; тел. +7(920)-069-02-20; e-mail marina.kochueva@mail.ru;

² ИПФ РАН, Н.Новгород;

³ МГУ им. М.В.Ломоносова;

⁴ ИПЛИТ РАН, Троицк;

⁵ Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского

Дегенеративно-дистрофические изменения органов, попадающих в зону облучения при проведении лучевой терапии по поводу злокачественных новообразований, представляют собой нерешенную проблему современной онкологии. Нарушения коллагенсодержащих структур играют важную роль в развитии радиационно-индуцированных повреждений.

Целью исследования было изучение динамики радиационно-индуцированного повреждения и последующего восстановления структуры коллагена *in vivo*.

Модельная система – сухожилия хвостов крыс. Сухожилия облучались на гамма-аппарате *in vivo* в различных дозах (от 2 Гр до 40 Гр) и изучались в различные сроки после воздействия (от 1 суток до 100 дней) методами дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), лазерной сканирующей микроскопии (ЛСМ), кросс-поляризационной оптической когерентной томографии (КП ОКТ).

При исследовании коллагена методом ДСК в диапазоне доз 2-10 Гр, отмечалось лишь расширение температурного диапазона денатурации. При повышении дозы температура денатурации линейно возрастала, что свидетельствовало о формировании большого количества шивок. Через 1 месяц после облучения регистрировались два пика температуры денатурации, которые сохранялись через 2 и 3 месяца, что подтвердило факт завершения ремоделирования коллагена в достаточно короткие сроки.

Анализ ЛСМ изображений показал, что на ранних сроках наблюдается расслоение третичных пучков. Через 1 месяц после облучения в образцах наблюдалось заполнение дефектов более тонкими волокнами. В сроки после одного месяца структура коллагена не изменялась, что еще раз подтвердило, что ремоделирование коллагена происходит уже через 1 месяц после облучения.

Исследование состояния коллагена на уровне общей архитектоники сухожилия методом КП ОКТ не выявило практически никаких нарушений независимо от дозы и срока после облучения.

Таким образом, при облучении в дозах ниже 10 Гр в ранние сроки наблюдаются временно проявления разрывов молекул и формирования шивок. При облучении в дозах выше 10 Гр формирование шивок происходит более интенсивно. Ремоделирование коллагена практически завершается через месяц после облучения.

1. Bowes J.H., Moss J.A. *Radiat Res* (1962); 16: p. 211–223.

2. Gouk S.-S., Lim T.-M., Teoh S.-H., Sun W.Q. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* (2008) V. 84B: p. 205–217.

СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ РЕГУЛЯТОРНЫХ УЧАСТКОВ ГЕНОМОВ, СВЕРХСПИРАЛИЗАЦИЯ ДНК И РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ

Structural characteristics of nucleotide sequences in regulatory regions of genomes, DNA supercoiling and transcription regulation

Кравацкая Г.И., Четкин В.Р., Кравацкий Ю.В., Туманян В.Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук (ИМБ РАН)
119991, Москва, ул. Вавилова, 32;
Тел.: +7(499)135-60-00; факс: +7(499)135-14-05; e-mail: gk@eimb.ru

Проведено сравнение распределений периодичностей в нуклеотидных последовательностях разных функциональных областей генома *E.coli*. Показано, что за исключением периодичности в три нуклеотида, характерной для генов, и сильнее выраженной в областях ниже точки старта транскрипции, все остальные заметно выраженные периодичности сильнее всего проявляются в областях выше точки старта транскрипции. Обнаружено, что спиральные периодичности, совпадающие по длине с шагом спирали В-формы ДНК ~10.2-10.5 п.о. и с шагом спирали А-формы ДНК ~10.8-11.1 п.о., сосуществуют в нуклеотидных последовательностях геномов [1]. Проведено картирование генома *E.coli* в соответствии с расположением участков с периодичностями А-, В-, Z- типов. Показано, что эти периодичности имеют тенденцию концентрироваться в межгенных участках и наиболее сильно выражены в областях промоторов. На основе топологических предсказаний, проверенных на экспериментальных данных для генов, чувствительных к изменению сверхспирализации ДНК, предложена новая модель регуляции транскрипции генов.

Работа поддержана Программой по молекулярной и клеточной биологии Президиума РАН, грантами РФФИ 12-04-01776-а и 12-04-90051-Бел_а.

ТЕОРИЯ ЭЛЕКТРОННОГО ПЕРЕНОСА В БАКТЕРИАЛЬНОМ ФОТОСИНТЕЗЕ

The theory of electron transfer in bacterial photosynthesis

Красильников П. М.

Биологический факультет МГУ, 119991, Москва; Ленинские горы, 1, стр. 12
Тел.: (495)939-43-67; e-mail: krapam@mail.ru или krasilnikov@biophys.msu.ru

Фотосинтетические реакционные центры (РЦ) являются уникальными объектами для изучения механизмов реакций электронного переноса в биосистемах. Характерные времена протекания таких реакций могут очень сильно различаться – от 1 пс до минут. Влияние среды на ход таких реакций будет заметным только в случае соизмеримости характерных времен реакции и релаксации среды. Характер такого влияния может проявиться при изменении температуры (Т) и/или разности свободной энергии (ΔG) реакций. Из экспериментов следует, что в зависимости от величины этих параметров скорости реакций меняются неоднозначно: одни реакции ускоряются с возрастанием температуры, а другие, наоборот, замедляются, причем сильно различается характер таких изменений. Имеют место реакции, для которых наблюдается немонотонная зависимость константы скорости (k) от Т, т.е. кривая k(T) имеет колоколообразную форму. При изменении ΔG также наблюдается большое разнообразие в характере зависимостей k(ΔG), так, в некоторых случаях скорость реакции практически не зависит от ΔG , что весьма неожиданно. В докладе представлен подробный обзор литературных данных относительно констант скоростей восьми реакций электронного переноса (реакции разделения зарядов и реакции рекомбинации), протекающих при различных условиях в РЦ *Rb. sphaeroides*.

В биологической литературе интерпретация наблюдаемых закономерностей в кинетике любых реакций электронного переноса традиционно основывается на теории электронно-колебательных взаимодействий (ЭКВ) или теории Маркуса, являющейся de facto высокотемпературным пределом теории ЭКВ (фактора Франк-Кондона). Для быстрых реакций иногда используется так называемая теория Редфилда. Однако, как показано в представленном здесь обзоре, эти теории, хотя и дают иногда качественное описание наблюдаемых закономерностей, нередко испытывают существенные затруднения в их детальной интерпретации. Причины этого обсуждаются в докладе, но основная из них обусловлена тем, что в рамках этих теорий невозможно вычислить так называемый электронный матричный элемент V_e , величина которого непосредственно определяет вероятность туннельного переноса электрона в донорно-акцепторной паре. В этих теориях V_e является свободным параметром.

В докладе показано, что некоторых успехов в решении имеющихся проблем можно достичь, если перейти от концепции делокализованных электронных состояний, принятой в теории ЭКВ, к концепции локализованных электронных состояний [1], первоначально развитой в теории проводимости неупорядоченных сред. В рамках этого подхода можно не только получить разумную оценку для величины V_e , но и установить ее связь с параметрами, характеризующими взаимодействие центров локализации со средой. Это открывает широкое поле для исследования влияния на скорость реакций электронного переноса разнообразных, а не только колебательных, релаксационных процессов, которые одновременно, но с разными характерными временами (от пикосекунд до секунд и более) протекают в молекулярных системах.

ВЛИЯНИЕ ВОДОРОДНЫХ СВЯЗЕЙ НА СКОРОСТЬ РЕАКЦИЙ ЭЛЕКТРОННОГО ПЕРЕНОСА В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ**The influence of hydrogen bonds on electron transfer rate in photosynthetic reaction centers****Красильников П. М.**Биологический факультет МГУ, 119991, Москва; Ленинские горы, 1, стр. 12
Тел.: (495)939-43-67; e-mail: krapam@mail.ru или krasilnikov@biophys.msu.ru

В молекулярной системе с водородными связями в ответ на изменение её электронного состояния может произойти релаксация по классической схеме обратной связи. Локализация электрона на центре связывания (акцепторе) сопровождается изменением формы поверхности потенциальной энергии молекулярной системы, в результате чего потенциал водородной связи, образованной акцептором с ближайшим окружением, может стать двухъямным. Возникновение второго потенциального минимума вызывает протонную релаксацию водородной связи, в результате которой устанавливается равновесное распределение заселенностей потенциальных ям. Изменение заселенностей эквивалентно локальному перераспределению заряда на линии водородной связи, в свою очередь, вызывает изменение величины электростатического потенциала в области локализации электрона (обратная связь). Это изменение потенциала сдвигает электронные уровни молекулярной системы, что может отразиться как на величине ее редокс потенциала, так и на относительном положении спектральных линий.

Характерное время процесса протонной релаксации существенным образом зависит от деформации водородной связи, вызываемой как тепловым движением, так и конформационными изменениями молекулярной структуры, и экспоненциально возрастает с увеличением температуры. Поэтому с ростом температуры происходит резкое уменьшение скорости перераспределения населенностей двухъямного потенциала, т.е. резкое замедление процесса протонной релаксации. Следовательно, данная релаксация, в отличие от активационного процесса, замедляется с ростом температуры.

В докладе обсуждается механизм протонной релаксации на примере двумерной модели двухъямного потенциала водородной связи. В рамках этой модели в гармоническом приближении получено явное выражение для скорости протонной релаксации, зависящей как от температуры, так и от геометрических параметров водородной связи, определяемых конформационной динамикой молекулярной системы и характеризующих глубину (степень) деформации водородной связи.

Действие механизма протонной релаксации иллюстрируется на примерах анализа температурных и энергетических зависимостей скорости различных реакций электронного переноса в фотосинтетических РЦ. Так, скорость реакции рекомбинации $P^+Q_A \rightarrow PQ_A$ в РЦ пурпурных бактерий *Rhodobacter sphaeroides* характеризуется необычной температурной зависимостью – при возрастании температуры от криогенных значений до 25 °С она весьма неравномерно замедляется (аномальная зависимость), а при дальнейшем нагреве (от 25 до 50 °С), наоборот, ускоряется. Такой немонотонный характер температурной зависимости, возможно [1], обуславливается механизмом протонной релаксации. В частности [2], действие этого механизма, возможно, осуществляется через температурную зависимость разности свободной энергии ΔG реакции рекомбинации. Аналогичный анализ представлен также и для других реакций.

1. Krasilnikov P.M. et al. / Biochim. Biophys. Acta, 2007. V.1767. P.541-549.

2. Krasilnikov P.M. et al. / Photochem. Photobiol. Sci., 2009. V.8. P.181-195.

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ НАРУШЕНИЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В РАЗЛИЧНЫХ
ОПУХОЛЯХ ЧЕЛОВЕКА****Identification of genes with differential expression in different human cancer types**

**Краснов Г.С.¹, Снежкина А.В.¹, Садритдинова А.Ф.¹, Дмитриев А.А.¹,
Степанов О.А.², Опарина Н.Ю.¹, Кудрявцева А.В.¹.**

¹Федеральное Государственное Учреждение Науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской Академии Наук, Москва, 119991, ул. Вавилова, 32.

²Московский Физико-технический государственный университет. Московская область, г. Долгопрудный, 141700, пер. Институтский, 9.

Широкая доступность большого объёма геномных, транскриптомных и эпигеномных данных делает востребованной разработку новых методов и программных продуктов, направленных на поиск диагностических маркеров различных видов рака, применение которых может быть эффективно уже на ранних стадиях заболевания.

Нами разработан новый метод поиска генов-маркеров различных видов рака *in silico*, на основе многостороннего анализа профиля экспрессии и нарушений сплайсинга различных генов по данным dbEST и баз данных высокопроизводительного секвенирования транскриптома (RnaSeq). Предлагаемый подход реализован в виде программного продукта CompEST. В отличие от существующих аналогов, метод предполагает выполнение поиска маркеров-кандидатов путём оценки значения скоринг-функции, включающей несколько компонентов: частота и характер нарушений сплайсинга мРНК, равномерность экспрессии гена в различных клонотеках и др. Таким образом, применение подхода позволяет выявить гены, прежде всего, со стабильно проявляемыми маркерными признаками – нарушениями экспрессии и сплайсинга, в то время как фильтрация EST (выделение фракции сплайсированных клонов, а также тагов с низкой частотой ошибок или мутаций) и такие дополнительные возможности CompEST, как геномное выравнивание EST и уточнение положения экзонов, позволяет максимально повысить достоверность данных.

На основе скоринг-функций нами разработан метод поиска контрольных генов, обладающих минимальным числом aberrаций экспрессии в ряде нормальных тканей и различных опухолях. Их применение актуально для нормирования данных количественных и полуколичественных методов оценки уровня экспрессии генов – ПЦР в реальном времени, микрочипов. Метод также реализован в ПО CompEST.

Применение подхода к анализу данных dbEST позволило идентифицировать более 100 генов с изменённым уровнем экспрессии при различных видах рака, а также новый контрольный ген рибофорина 1 (RPN1), который может быть использован при нормировании количественных данных для немелкоклеточного рака лёгкого и светлоклеточного рака почки. Около половины найденных потенциальных генов-маркеров уже известны по данным литературы как обладающие значительно изменённым уровнем экспрессии при данном виде рака (например, PKM2 и SKAP4 с повышенным уровнем мРНК при раке печени), в то время как экспериментальная проверка нескольких новых генов-кандидатов показала значительные изменения уровня экспрессии генов NETO2, ACY1, CALL при почечноклеточной карциноме и немелкоклеточном раке легкого.

СТРУКТУРА И СОДЕРЖАНИЕ УЧЕБНОГО КУРСА «МЕТОДОЛОГИЯ НАУЧНОГО ТВОРЧЕСТВА» В МАГИСТЕРСКОЙ ПРОГРАММЕ «БИОФИЗИКА»

Structure and content of the educational course «The methodology of scientific creativity» in the master's program «Biophysics»

Кратасюк В.А., Медведев Л.Н.

Сибирский федеральный университет, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, кафедра биофизики, 660041, Красноярск, пр. Свободный 79.
Тел.: +8(391)206-20-72; e-mail: lenemed@mail.ru

С учётом общих положений и принципов методологии науки и ряда частных особенностей физического и биологического знания на кафедре биофизики разработан курс «Методология научного творчества» [1]. В его основу положено науковедение – самостоятельная формирующаяся научная отрасль и комплекс дисциплин, изучающих науку как сложное социальное явление [2].

Программа курса включает две взаимообусловленные части. В первой рассматриваются основы общей теории науки: научный метод, диалектические принципы, верификационный и фальсификационный аспекты познания, общенаучные подходы и методы, основы теоретического и эмпирического исследования. Во второй – практические аспекты научного творчества: вопросы психологии, информологии, этики и организации науки, элементы научной рефлексии, проблема оценки качества научной продукции, эго-защитный характер сознания и грантовая деятельность учёного, изобразительные возможности научной аргументации. Уделяется внимание практике научных дискуссий, особенностям представления научных данных на конференции. Учитывая сложности вхождения молодого исследователя в творческую научную среду, анализируются особенности функционирования коллективов – от малой группы до международной коллаборации.

Для повышения интереса к общеметодологическим проблемам естествознания используются интерактивные формы преподавания, рассматриваются классические и современные примеры деятельности учёных. В частности, проводится деловая игра по типу «мозгового штурма». Для проверки и укрепления знаний по методологии науки магистрантам предлагается на основе общих положений и частных методов биологии и физики составить и высказать на семинаре аргументированное заключение о конкретных паранаучных концепциях и представлениях, бытующих в обществе и проникающих в сферу высшего образования [3]. Курс заканчивается открытой защитой письменной работы в форме продуктивного реферата и общей дискуссией.

1. История и методология биологии и биофизики: учеб. пособие/В.А.Кратасюк [и др.]. – Красноярск: ИПК СФУ, 2009. – 172 с. – (История и методология биологии и биофизики: УМКД №13-14-2008/рук. коллектива В.А. Кратасюк.

2. Каширин В.П. Науковедение. Актуальные проблемы научного знания./В.П.Каширин. – Новосибирск: изд-во СО РАН, 1998. – 102 с.

3. Медведев Л.Н. Феномен паранаучного знания./Л.Н.Медведев. – Красноярск: Краснояр. гос. пед.ун-т им. В.П.Астафьева, 2007. – 376 с.

МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ АЛКИЛРЕЗОРЦИНОВ НА СТРУКТУРНЫЕ, ДИНАМИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЛИЗОЦИМА.**Mechanisms of influence of alkylresorcinols on structure, dynamics and functional properties of lysozyme.**

Крупянский Ю.Ф.¹, Абдулнасыров Э.Г.¹, Лойко Н.Г.², Степанов А.С.¹, Синицын Д.О.¹, Терешкина К.Б.¹, Эль-Регистан Г.И.²

¹- Институт химической физики им Н.Н.Семенова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4.,

²-Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, 117312, Москва, Проспект 60-летия Октября, 7, к.2.

Тел.: +7(495) 939-73-00; факс: +7(499) 137- 83 -18; e-mail: yufk@chph.ras.ru

В последнее время появились экспериментальные работы по изучению действия новых биологически активных веществ – алкилрезорцинов, в частности, гексил- и метилрезорцина на структуру, динамику и функцию белков. Алкилрезорцины интересны тем, что они, при определенных концентрациях, быстро вызывают переход микробных клеток из вегетативного состояния в покоеющее (анабиотическое). Естественно полагать, что столь сильно действующие биологически активные вещества – гексилрезорцин и метилрезорцин – должны влиять на структурно – динамические и функциональные свойства белков.

Исследовано влияние 4 – гексилрезорцина и 5 – метилрезорцина в большом диапазоне их концентраций на структуру, равновесные флуктуации и функциональную активность лизоцима. 4 – гексилрезорцин и 5 – метилрезорцин сильно различаются по структуре и своему действию на водорастворимые белки (лизоцим).

При малых концентрациях гексилрезорцина активность лизоцима резко возрастает, с ростом концентрации активность начинает падать. Молекула гексилрезорцина состоит из гидрофобной (алкильный радикал) и гидрофильной (ароматическое ядро) частей, что и обеспечивает дополнительное регулирующее действие гексилрезорцина на функциональную активность лизоцима. При увеличении концентрации гексилрезорцина эффект от областей, в которых осуществляется предпочтительная гидратация, начинает заметно преобладать над эффектом предпочтительного взаимодействия с гексилрезорцином. При концентрации выше 100 молекул на глобулу активность лизоцима полностью ингибируется. Этот эффект вызван предпочтительной гидратацией белка с вытеснением гексилрезорцина из непосредственного контакта с белком. Вытеснение гексилрезорцина приводит к образованию мицелл высокой плотности из молекул гексилрезорцина вокруг глобулы. Плотные мицеллы мешает проходу субстрата к белку и полностью ингибируют функциональную активность лизоцима. Полное ингибирование активности лизоцима происходит при концентрациях 4 – гексилрезорцина на порядок меньше ингибирующих концентраций глицерина.

Поведение метилрезорцина не похоже на поведение гексилрезорцина. Метилрезорцин взаимодействует с поверхностными аминокислотами лизоцима непосредственно, а не через водородные связи воды, особенно сильно с некоторыми из аминокислот. С увеличением концентрации молекулы метилрезорцина образуют своеобразное дерево вокруг глобулы белка. Флуктуирующая структура молекул метилрезорцина приводит к увеличению радиуса гирации белка, сильному понижению температуры денатурации T_d , увеличению амплитуды равновесных флуктуаций. Вышеперечисленные причины позволяют метилрезорцину быть мощным активатором лизоцима.

АДСОРБЦИЯ ПОЛИПЕПТИДОВ НА УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБКАХ**Polypeptides adsorption on carbon nanotubes****Кручинин Н.Ю., Кучеренко М.Г., Измоденова С.В.**

Оренбургский государственный Университет, 460018, г. Оренбург, ГСП, пр. Победы, 13
Тел.: +7(3532) 37-24-57; факс: +7 (3532) 72-37-01; e-mail: kruchinin_56@mail.ru

Используя метод молекулярной динамики (МД), найдено пространственное распределения атомов полипептидной цепи на внешней и внутренней поверхности нанотрубки. В качестве полипептидов исследовались фрагмент лизоцима (70 первых аминокислотных звеньев), подобный лизоциму полипептид (129 звеньев) и макромолекула полиаланина (500 звеньев), структура всех – β -лист. Использовались однослойные нанотрубки длиной 15 нм: диаметром 4.05 нм (хиральность $n=30$ и $m=30$) и диаметром 9.5 нм (хиральность $m=70$ и $n=70$). Макромолекулы полипептидов в начальный момент времени были либо вытянуты в прямую линию, либо свернуты в виде неравновесного клубка. Макроцепь располагалась на расстоянии примерно 1 нм от ближайших атомов снаружи от поверхности нанотрубки (в виде линейной и клубковой конформации), либо внутри (в виде клубка) нанотрубки большего диаметра. Моделирование методом МД (NAMD 2.7, CHARMM22) производилось при постоянной температуре (термостаты Берендсена и Лоу-Андерсена) на траектории длиной достигающей 1-3.5 нс в вакууме и в воде (при постоянном давлении 1 атм.). Температура моделирования от 300 до 900 К (с последующим охлаждением до 300 К). В результате были получены равновесные конформации исследуемых полипептидов на внешней и внутренней поверхностях нанотрубок. Как было показано методами статистической физики макромолекул [1, 2], в случае адсорбции на поверхности цилиндрической наночастицы и цилиндрической нанопоры формируется характерное радиальное распределение звеньев макромолекулы, определяемое длиной звена полимера, параметрами потенциала адсорбирующей поверхности, ее кривизной и термодинамическими параметрами системы. Были построены радиальные зависимости локальной концентрации атомов полипептида, адсорбированного на поверхности нанотрубки, для случаев внешнего и внутреннего размещения звеньев цепи и произведена их аппроксимация выражениями, полученными в [1, 2]. Установлено влияние неоднородности распределения связанных с цепью молекул на кинетику их фотореакции с молекулярным кислородом.

1. Кучеренко М.Г., Чмерева Т.М. Размещение звеньев полимерной цепи в поле гладкой твердой поверхности и в нанополостях пористого сорбента. / Вестник ОГУ, 2008.-№9. -С. 177-184.

2. Кучеренко М.Г., Чмерева Т.М., Измоденова С.В., Кручинин Н.Ю., Подrezова Н.С. Диффузионная кинетика реакций в макроцепных оболочках фуллереновых и тубуленовых ядер. / Всерос. научно-практическая конф. «Интеграция науки и практики в профессиональном развитии педагога», Оренбург: ГОУ ОГУ. – 2010.

МОДЕЛЬ СОПРЯЖЕНИЯ ГЕНЕРАЦИИ ЭНЕРГИИ И БИОСИНТЕЗА В КЛЕТКЕ**Mathematical model of the interaction of cell energy generation and biosynthesis****Крылов А.К.**

Институт психологии РАН, Москва, 129366, ул.Ярославская, 13
Тел.: +7(496)682-00-07; e-mail: neuuru@mail.ru

Существующие модели генерации энергии в клетке [1] не учитывают, что промежуточные вещества цикла Кребса (альфа-кетоглутарат, сукцинат, малат и др.) используются как субстрат для биосинтеза (синтеза аминокислот и далее белков), поэтому генерацию энергии и биосинтез необходимо рассматривать совместно. В настоящей работе предлагается математическая модель сопряжения процессов генерации энергии (Э) и биосинтеза (Б) в клетке, с учетом синтеза и распада промежуточных веществ (П) цикла Кребса:

$$dЭ/dt = П * f1(Э) - f2(Э, П) - f3(Э, П)$$

$$dП/dt = f2(Э, П) - f3(Э, П) + f4$$

$$dБ/dt = f3(Э, П)$$

Здесь: $f1$ – генерация энергии Э при окислительном фосфорилировании, ее мощность пропорциональна П; $f2$ – анаэробная реакция синтеза П, на что затрачивается энергия Э; $f3$ – реакция биосинтеза, увеличивающая количество белка Б, на нее затрачиваются П и Э.

Субстрат (пируват, образующийся из глюкозы или лактата) для генерации энергии при окислительном фосфорилировании может быть использован либо для генерации энергии (реакция $f1$), либо для синтеза промежуточных веществ П цикла Кребса (реакция $f2$), что позволит усилить мощность процесса генерации энергии в дальнейшем (в реакции $f1$). Далее П могут выйти из цикла, и стать субстратом для биосинтеза Б (реакция $f3$). Также глутамат, поступая в митохондрии, и преобразовываясь в альфа-кетоглутарат (реакция $f4$), может, увеличивая пул П, усилить генерацию энергии в клетке, а затем стать субстратом для Б.

В этой модели получен колебательный характер процессов генерации энергии и биосинтеза, причем эти два процесса идут в противофазе – для старта биосинтеза необходимо накопление достаточного количества энергии «Э» и промежуточных веществ «П», которые далее расходуются в процессе биосинтеза «Б» и затем цикл повторяется. Эта реализуемая моделью взаимосвязь колебаний процессов генерации энергии и биосинтеза соответствует биологическим данным [2].

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 11-06-00482а и гранта Президента РФ для поддержки ведущих научных школ НШ-3010.2012.6.

1. Bertram R, Gram Pedersen M, Luciani DS, Sherman A. A simplified model for mitochondrial ATP production. *J Theor Biol.* 2006;243:575–586.

2. Загускин С.Л. Ритмы клетки и здоровье человека. Ростов-на-Дону, Изд-во ЮФУ, 2010.-296с.

МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ АНАЛОГОВ ИНСУЛИНА

Molecular dynamics studies of the insulin analogues

Ксенофонтова О.И., Стефанов В.Е.

Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб., 7-9,
199034, Санкт-Петербург
Тел.: +7(812)3282182; e-mail: vastef@mail.ru; jabiata@yandex.ru

Молекулярно-динамические (МД) исследования являются важным инструментом для понимания структур и функций биологических макромолекул на уровне физических и химических взаимодействий. Обычно поведение аналогов инсулина исследуется биохимическими и клиническими методами. Однако они являются достаточно грубыми и не способны объяснить конформационное поведение аналогов инсулина (пептидов, лекарств) на молекулярном уровне. Целью нашего исследования являлось изучение конформационной гибкости фармакологически важных аналогов инсулина, таких как инсулин аспарт, инсулин лизпро, инсулин глулизин и инсулин гларгин.

Все МД симуляции были выполнены, используя программное обеспечение GROMACS (версия 4.5.5). Начальная структура инсулина человека была получена в Банке Данных Белков (PDB код 1BEN). Было показано, что наиболее конформационно гибким среди быстро-действующих аналогов инсулина является инсулин аспарт, а среди всех исследуемых веществ — инсулин гларгин. Более того, было показано, что кривая колебаний (флуктуаций) среднеквадратичных отклонений атомов (RMSF) может быть разделена на две части: одна — соответствующая А-цепи (<308 атома), вторая — соответствующая В-цепи (>308 атома). Наблюдаемое отличие в поведении цепей было объяснено спецификой их фолдинга. В зависимости от выбранной стратегии лечения сахарного диабета, возникает необходимость в быстро- (инсулин аспарт, инсулин лизпро и инсулин глулизин) или длительно-действующих (инсулин гларгин) аналогах. На основе полученных данных мы предположили, что для создания быстро-действующего аналога необходимо осуществлять замены в В-цепи, а для получения длительно-действующего аналога — обе цепи должны быть модифицированы. Результаты данного исследования могут быть полезны (использованы) при создании новых эффективных лекарственных препаратов для лечения сахарного диабета.

РОЛЬ ДНК-ЛИПИДНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ФОРМИРОВАНИИ ЯДЕРНОЙ ПОРЫ

The role of DNA-lipids interactions in the nuclear pore assembly

Кувичкин В.В.

Учреждение Российской Академии Наук Институт Биофизики Клетки РАН, Пущино,
142290, Институтская, 3, Московская обл., E-mail: vvkuvichkin@gmail.com

Существование ДНК-липидных взаимодействий показано более 40 лет назад, однако, несомненно их роли в клетке известно мало.

Будкер В.Г. обнаружил формирование тройных комплексов (ТК): ДНК- фосфатидилолиновые липосомы-Mg²⁺, но не сделал никаких предположений о структуре ТК. Продолжив эти исследования, мы смогли предложить модель образования ТК. Суть ее сводится к тому, что ДНК в присутствии катионов Mg²⁺ вызывает слияние двух липосом диаметром меньше 100 нанометров. При этом ДНК расплетается в зоне слияния липосом, образуя одно – цепочечные участки по периметру зоны слияния. Свойство ДНК, формировать ТК привело нас к созданию модели формирования ядерных пор из предшествующих мембранных везикул. В нашей модели ТК являются первой стадией формирования ядерных пор. ТК с участием ДНК хроматина и мембранных везикул диаметром 70 нм образуются в ранней анафазе и формируют на хроматине структуры типа “бусинок жемчуга”, обнаруженных совсем недавно. Далее эти структуры сливаются с двойной ядерной мембраной, которая к тому времени уже образовалась из мембранных везикул другого типа. Слияние липосомы, окаймленной по диаметру одноцепочечной ДНК происходит очень быстро до достижения одноцепочечной ДНК, которая резко замедляет процесс слияния. Не слившаяся половина липосомы под действием гидродинамических сил выворачивается наизнанку и, преодолевая перинуклеарное пространство, сливается с другой ядерной мембраной, формируя пору между мембранами ядерной оболочки. Одно- цепочечная ДНК при этом располагается по периметру отверстия поры и становится затравкой для сборки белковой оболочки поры из нуклеопоринов. Последовательность такой сборки не изучена ввиду быстроты его протекания. Наша модель могла бы помочь решить эту задачу, но она остается пока в ранге гипотезы. Между тем, из этой гипотезы следует повышенная транскрипционная способность генов, лежащих вблизи ядерной поры. То, что ДНК прикреплена к ядерным порам предполагали давно, но то, что она прикрепляется к ней довольно прочно за счет ДНК-липидных взаимодействий – это следует только из нашей модели. Очевидно, интерфазная хромосома не плавает свободно в нуклеоплазме, но привязана к определенным районам ядерной оболочки, что решает вопрос о природе “хромосомных территорий”, петлевой структуре нуклеоида и т.п.

Таким образом, новая модель ядерной поры способна объяснить много известных, но не понятных фактов в структуре и функциях клетки, в том числе и происхождение эукариотов.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ
ПОЛИФЕНОЛОВ С ФОСФОЛИПИДАМИ МЕМБРАН МЕТОДОМ
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ МИКРОКАЛОРИМЕТРИИ**

**The study of plant polyphenols interaction with phospholipid membranes using
calorimetric approach**

*Кузнецова С.М.¹, Ягольник Е.А.², Тараховский Ю.С.¹, Тулеуханов С.Т.³,
Музафаров Е.Н.², Ким Ю.А.⁴*

¹ – Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290,
Пушино Московской обл., ул. Институтская, 3;

² – Тульский государственный университет, 300600, Тула, пр-т Ленина, 92;

³ – Казахский национальный университет им. аль-Фараби, 480078, Алматы, РК;

⁴ – Институт биофизики клетки РАН,

142290, Пушино Московской обл., ул. Институтская, 3

Тел.: +7(903)613-00-64; e-mail: svemikuz@rambler.ru

Влияние флавоноидов кверцетина, таксифолина и катехина, а также дигидрохалкона флоретина на температурно-индуцированные фазовые переходы в липосомах из димиристоилфосфатидилхолина и пальмитоил-олеоил-фосфатидилэтананоламина, являющихся основными компонентами внешнего и внутреннего монослоя клеточной мембраны соответственно, исследовано с помощью дифференциальной сканирующей микрокалориметрии. Температурную зависимость избыточного удельного теплопоглощения препаратов мультиламеллярных липосом регистрировали с помощью дифференциального адиабатного сканирующего микрокалориметра ДАСМ-4. На термограммах плавления липосом в присутствии полифенольных соединений наблюдается увеличение ширины и снижение высоты фазового перехода, происходящего в температурной области 24–25 °С, связанного с плавлением ламеллярной фазы липидов. При этом происходит снижение температуры максимума перехода. Наибольшее влияние на параметры этого перехода оказывает флоретин – он вызывает не только снижение высоты и увеличение ширины фазового перехода, но и сдвиг максимума на несколько градусов в область более низких температур. При увеличении концентрации флоретина сдвиг в низкотемпературную область увеличивается, а форма кривых не меняется. Анализ термограмм показал, что пики теплопоглощения можно разложить на две компоненты, что обычно интерпретируется как результат разделения фаз и образование доменов в бислое. При всех изученных нами концентрациях флавоноидов наблюдается исчезновение предперехода, что сопровождается исчезновением риппл-фазы – периодической волнистой структуры, образующейся в бислое липосом из фосфатидилхолина в температурной области между предпереходом и главным фазовым переходом. Действие полифенолов на фазовый переход пальмитоил-олеоил-фосфатидилэтананоламина бислой-гексагональная HII-фаза, в норме наблюдающийся в области 69 °С, также приводит к увеличению его ширины и уменьшению высоты. При этом сдвиг максимума перехода как правило происходит в область более высоких температур, а наибольший эффект из всех вышеперечисленных полифенолов вызывает катехин. Еще более заметное влияние на высокотемпературный фазовый переход фосфатидилэтананоламина оказывают комплексы флавоноидов с катионами двухвалентного железа, что вероятно связано с их большей гидрофобностью. Предполагается, что действуя на фазовые переходы мембранных фосфолипидов, флавоноиды и их комплексы с железом могут участвовать в регуляции функций компонентов клеточной сигнализации.

**НЕОБЫЧНАЯ ДИНАМИКА БЕЛКА TOM40P ВО ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЕ
МИТОХОНДРИЙ ДРОЖЖЕЙ****An unusual dynamics of Tom40p in yeast outer mitochondrial membrane****Кузьменко А.В., Каменский П.А.**

Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы, дом 1 стр.12
Телефон +7 495 9395485, факс +7 495 9394309, e-mail: peter@protein.bio.msu.ru

Динамика интегральных мембранных белков по сей день остается крайне слабо изученной областью науки. Имеется лишь несколько работ, посвященных описанию динамического поведения белков в плазматической мембране эукариотических клеток, а также во внешней мембране грамотрицательных микроорганизмов. В то же время, результаты этих исследований представляют громадный интерес – было показано, что динамика изученных белков в мембранах подчиняется законам нормальной диффузии, что противоречит общепринятой ранее точке зрения. С другой стороны, нет никаких данных о динамике белков митохондриальных мембран.

В данной работе мы выбрали в качестве модельного белка интегральный белок внешней митохондриальной мембраны дрожжей Tom40p, являющийся канальным компонентом аппарата импорта белков в митохондрии. Мы создали мутантный штамм дрожжей, в котором ген данного белка был заменен на ген, кодирующий гибридный белок, состоящий из Tom40p и красного флуоресцентного белка Dendra2. Функциональные тесты показали, что такой гибридный белок полностью заменяет белок Tom40p дикого типа и обеспечивает нормальную работу митохондрий. После этого мы провели исследование динамики такого гибридного белка методом слежения за одной молекулой (SPT, от англ. single particle tracking). К нашему удивлению, оказалось, что Tom40p характеризуется уникальной динамикой. Некоторое время молекулы белка находятся практически в неподвижном состоянии, затем совершают резкий скачок, после чего опять становятся неподвижными. Мы предполагаем, что заякоренное состояние белка в мембране может быть объяснено тем, что в этот момент через канал, сформированный Tom40p, проходит импортируемая в матрица митохондрий полипептидная молекула. Как только такая молекула выходит из канала с внутренней стороны, белок Tom40p «освобождается» и совершает тот самый скачок. Таким образом, нами описано необычное динамическое поведение интегрального белка митохондриальной мембраны, не укладывающееся ни в одну из существующих моделей.

Работа поддержана грантом компании ОПТЭК 2011 года на соискание грантов для поддержки молодых ученых ведущих высших учебных заведений и научных исследовательских центров.

ПОСТРОЕНИЕ МОДЕЛЕЙ УЧАСТКОВ ДНК, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩИХ РЕГУЛЯТОРНЫЕ БЕЛКИ, С УЧЕТОМ ШАГА СПИРАЛИ В-ФОРМЫ ДНК.**Constructing transcription factor binding models of DNA sequences accounting for DNA helix pitch.**

Кулаковский И.В.^(1,2), Медведева Ю.А.⁽³⁾, Касьянов А.С.^(1,2), Ершов Н.И.^(2,4), Воронцов И.Е.^(2,5), Шайфер У⁽³⁾, Бажич В.Б.⁽³⁾, Макеев В.Ю.^(2,1)

(1) Институт молекулярной биологии РАН им. В.А. Энгельгардта, ул. Вавилова, 32, Москва 119991, ГСП-1, Россия; (2) Институт общей генетики РАН им. Н.И. Вавилова, ул. Губкина, 3, Москва 119991, ГСП-1, Россия; (3) Computational Bioscience Research Center, King Abdullah University of Science and Technology (KAUST), Thuwal, Jeddah, 23955-6900, Kingdom of Saudi Arabia; (4) Институт цитологии и генетики СО РАН, просп. ак. Лаврентьева 10, Новосибирск, 630090, Россия; (5) Школа анализа данных Яндекс, Московский физико-технический институт, ул. Льва Толстого, 16, Москва 119021, Россия.

В выравнивании набора участков ДНК, взаимодействующих с белками – транскрипционными факторами (ТФ), консервативные позиции часто отстоят друг от друга на расстоянии, соответствующем шагу спирали ДНК. В работе (1) было предложено, что нуклеотиды, соответствующие высоко консервативным позициям выравнивания, контактируют с ДНК по ее большой бороздке. Этот феномен может быть использован для получения оптимальных моделей сегментов ДНК, специфически связывающих ТФ человека. Использовались опубликованные данные об участках ДНК, связывающих ТФ, полученные различными экспериментальными методами: результаты ChIP-Seq экспериментов, полученные в рамках проекта ENCODE (2); данные мультиплексных SELEX (3); данные, содержащиеся в базах данных транскрипционных факторов TRANSFAC 2011.2 SITE (4) и JASPAR CORE (5); и ряд данных, взятых из оригинальных экспериментальных работ. С помощью программы ChIPMunk (6) были построены множественные локальные выравнивания участков ДНК, связывающих ТФ. Программа ChIPMunk позволяет присваивать различные веса позициям в множественном локальном выравнивании. Веса задавались в соответствии с шагом спирали ДНК в В-форме, с периодом $T = 10.5$ нуклеотидов на оборот спирали. Тестировалось несколько возможностей: (i) позиции выравнивания вносят равный вклад в вес выравнивания; (ii) в центре выровненного участка расположена пучность; (iii) в центре выровненного участка расположен узел. Во втором случае (пучность), соответствующему связыванию фактора с ДНК в форме мономера, распределение позиционных весов зависело от координаты вдоль участка связывания n как $\cos 2(\pi n/T)$, где центр выравнивания соответствует $n = 0$, и n может принимать как положительные, так и отрицательные значения. В третьем случае (узел), соответствующем связыванию с ДНК в форме димера, вес позиции в выравнивании задавался как $\sin 2(\pi n/T)$. Оказалось, что из 403 ТФ в 120 случаях использование периодически взвешенного выравнивания позволило получить предпочтительную модель связывания, причем однокосовая модель (пучность) была оптимальна в 96 случаях, а двукосовая модель – в 24 случаях. База данных мотивов связывания ТФ доступна по адресу <http://autosome.ru/HOCOMOCS>.

Работа частично поддержана ГК Министерства науки и образования РФ (номер заявки 2012-1.4-12-000-1001-007).

(1). Schneider, T.D. (2002) // Appl Bioinformatics, 1:111-9. (2) ENCODE Project Consortium (2011) // PLoS Biol., 9, e1001046. (3) Jolma, A., et al., (2010) // Genome Res., 20, 861-73. (4) Matys, V. et al., (2006) // Nucleic Acids Res., 34, D108-10. (5) Portales-Casamar, E. et al (2010) // Nucleic Acids Res., 38, D105-10. (6) Kulakovskiy, I.V. et al. (2010) // Bioinformatics, 26, 2622-3.

**ПОКАЗАТЕЛИ УПРУГОСТИ И АДГЕЗИИ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН
ГЕМОЦИТОВ ANODONTA CYGNEA****Elasticity and adhesion data of hemocytes Anodonta cygnea cell membranes.****Кулько С.В.**

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ») Россия,
308015, г. Белгород, ул. Победы, 85,
E-mail: Psychonautica@inbox.ru

В современной науке особое внимание уделяется медицинским вопросам, в частности, вопросам, связанным с механизмами возникновения иммунных реакций в ответ на введение того или иного антигена, а также со специфичностью иммунного ответа. Рядом работ отечественных и зарубежных ученых показано разнообразие и большое значение функций, выполняемых форменными элементами гемолимфы в организме моллюсков. Однако способность к фагоцитозу и образованию псевдоподий, напрямую зависящие от показателей упругости и адгезии клеточной мембраны, изучены недостаточно полно, что обуславливает актуальность данной темы. Для проведения исследования использовались половозрелые моллюсков *Anodonta cygnea*, собранных в пойме реки Везелка весной (апрель-май) 2012 года. Гемолимфу моллюсков *A. cygnea* отбирали стандартным методом.

Был проведен ряд исследований при помощи сканирующего зондового микроскопа NTEGRA. Исследовалась топография поверхности, и адгезивные свойства мембраны. Полученные данные обрабатывались при помощи программы Efs3, с последующим вычислением модуля Юнга. Была исследована упругость и адгезии мембраны гемоцитов *A. cygnea*. Средняя упругость клеточной мембраны составила 28,64 кПа. Максимальная – 59,30 кПа, минимальная – 7,89 кПа. Средний показатель адгезии мембраны *A. cygnea* составил 7,72 нН, минимальный – 2,23 нН, максимальный – 16,29 нН. Гемоциты 1 типа. На сканах обычно выглядят как округлые образования с ареолом отходящих тонких нитей. Согласно полученным данным, средняя упругость мембраны для этого типа клеток составила 22,65 кПа. Максимальное значение упругости – 50,40 кПа, минимальное – 21 кПа. Среднее значение адгезии для данного типа клеток составило 6,48 нН. Максимальное значение – 13,25 нН, минимальное – 2,53 нН. Гемоциты типа 2. Ввиду отсутствия постоянной формы классификация этих клеток исключительно по внешнему виду затруднительна. Средняя упругость мембраны клеток данного типа составляет 24,69 кПа. Максимальное значение – 63 кПа, минимальное – 14 кПа. Среднее значение адгезии составило 2,24 нН, максимальное – 5,4 нН, минимальное – 2,79 нН. Гемоциты типа 3 на сканах выглядят как клетки правильной округлой формы. Среднее значение упругости мембраны для этих клеток – 26,93 кПа, максимальное – 42 кПа, минимальное – 21 кПа. Среднее значение адгезии – 5,88 нН, максимальное – 12,31 нН, минимальное – 7,13 нН. Гемоциты 4 типа на сканах выглядят как продолговатые возвышения, окруженные светлым неравномерным полем с неровным контуром. Среднее значение упругости для этих клеток составило 59,30 кПа, максимальное – 96,60 кПа, минимальное – 16,8 кПа. Среднее значение показателя адгезии составило 16,30 нН, минимальное – 9,28 нН, максимальное – 27,21 нН.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта НИУ «БелГУ» ВКАС-02-12

ВЛИЯНИЕ АГЕНТОВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ РЕОРГАНИЗАЦИЮ МИКРОТРУБОЧЕК, НА Ca^{2+} -ОТВЕТЫ, ИНДУЦИРОВАННЫЕ ГЛУТОКСИМОМ ИЛИ МОЛИКСАНОМ В МАКРОФАГАХ**The effect of microtubule disrupting agents on Ca^{2+} -responses induced by glutoxim or molixan in macrophages****Курилова Л.С., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И., Войцехович К.О.**

Санкт-Петербургский государственный университет,
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9
Тел.: +7 (812) 328-94-65; e-mail: cozzy@mail.ru

Препараты глутоксим (комплекс динатриевой соли окисленного глутатиона (GSSG) с Pt в наноконцентрации) и моликсан (комплекс глутоксима и нуклеозида инозина) относятся к классу препаратов тиопозтинов, изменяющих редокс-статус клетки; применяются как иммуномодуляторы и гемостимуляторы в комплексной терапии бактериальных и вирусных инфекций, псориаза, в химиотерапии опухолей. Однако механизмы клеточного и молекулярного действия глутоксима и моликсана далеки от полного понимания. Ранее нами было установлено, что GSSG, глутоксим и моликсан вызывают двухфазное увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , ($[Ca^{2+}]_i$), в макрофагах, связанное с мобилизацией Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо и последующим депо-зависимым входом Ca^{2+} из наружной среды. Выявлено также участие элементов актинового цитоскелета в действии глутоксима или моликсана на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах. Белок микротрубочек тубулин также имеет высокую редокс-чувствительность и легко подвергается S-глутатионилрованию. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать также возможное участие микротрубочек в действии глутоксима и моликсана на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах.

С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM, впервые показано, что предварительная инкубация макрофагов с агентами, вызывающими деполимеризацию микротрубочек, колцемидом (50 мкМ) или нокодазолом (20 мкМ) в течение 20 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима или моликсана, вызывает полное подавление обеих фаз Ca^{2+} -ответа, вызываемого этими агентами, что свидетельствует о том, что деполимеризация тубулинового цитоскелета предотвращает регуляторное действие глутоксима или моликсана на процессы Ca^{2+} -сигнализации в макрофагах. Кроме того, показано, что предварительная инкубация макрофагов с таксолем (100 мкМ) в течение 30 мин до введения 100 мкг/мл моликсана или глутоксима также приводит к полному подавлению Ca^{2+} -ответов, вызываемых моликсаном. Результаты свидетельствуют о том, что стабилизация микротрубочек, также как и их разборка, может предотвращать действие глутоксима или моликсана на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах.

Таким образом, нами впервые показано, что любые изменения в структуре тубулинового цитоскелета (деполимеризация или стабилизация) модулируют эффект глутоксима или моликсана на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах. Кроме того, полученные данные позволяют предположить нежелательность совместного применения моликсана или глутоксима с нокодазолом, колцемидом и таксолом, которые используются в терапии онкологических заболеваний как цитостатики.

**МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РАМКАХ ТЕОРИИ
ВЕТВЯЩИХСЯ ПРОЦЕССОВ С ДВУМЯ ТИПАМИ ЧАСТИЦ****Simulation of the polymerase chain reaction process as two type particle
branching process****Курочкин В.Е.¹, Сочивко Д.Г.², Фёдоров А.А.¹**

¹ – ФГБУН Институт аналитического приборостроения РАН, 190103, Санкт-Петербург, Рижский пр., 26; 2 – ЗАО «Синтол», 127550, Москва, ул. Тимирязевская 42.
Тел.: +7(812)251-86-00; факс: +7(812)251-70-3; e-mail: faa@bk.ru

Алгоритмы обработки данных приборов ПЦР анализов строятся без учета природы рассматриваемого процесса, что снижает их эффективность, особенно в случае анализа единичных копий НК.

Существующие модели процесса ПЦР рассматривают молекулу НК как единый объект, способный синтезировать свою копию в течение цикла ПЦР с определенной вероятностью. Предлагается новый подход, учитывающий структуру молекулы НК, а именно наличие двух комплементарных цепочек, удвоение которых может происходить независимо друг от друга. На основе данного подхода разработаны следующие модели процесса ПЦР как ветвящегося дискретного процесса [1,2]: аналитическая, позволяющая получить точное распределение продукта ПЦР реакции; имитационная модель, позволяющая существенно ускорить процесс вычислений, а также учесть изменения эффективности ПЦР реакции во времени.

Аналитическая модель позволяет определять истинные распределения вероятностей количества фрагментов НК для случая единичных начальных копий НК и постоянной эффективности ПЦР. Однако, ввиду быстрого роста объема вычислений с увеличением номера цикла ПЦР, модель можно использовать лишь для единичных начальных копий и количества циклов не более десяти. Имитационная модель дополнена блоком имитации процесса пробоподготовки, что позволяет учесть стохастические эффекты титрования пробы.

Результаты моделирования сопоставляются с результатами существующих моделей. С помощью данного подхода продемонстрировано, что стохастическая природа амплификации не препятствует точному определению исходного количества единичных копий ДНК.

Имитационная модель позволяет получить кинетические кривые процесса ПЦР, максимально приближенные к наблюдаемым в эксперименте. Модель позволяет анализировать влияние различных параметров реакции на вид кинетических кривых, может быть использована для изучения кинетики реакции и источников погрешности количественного анализа НК.

1. Сочивко Д. Г., Фёдоров А.А. и др. / ДАН, 2010. Т.434. С.265-268.

2. Сочивко Д. Г., Фёдоров А.А. и др. / ДАН, 2011. Т.439. С.696-699.

ВЛИЯНИЕ ПУРИНЕРГИЧЕСКОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ АКСОГЛИАЛЬНЫХ МЕМБРАН

Effect of purinergic signalling on axo-glial membrane interfaces

Кутузов Н.П.¹, Браже А.Р.¹, Булыгин Ф.В.², Максимов Г.В.¹

¹ – Кафедра биофизики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы 1, корп. 12:

² – ФГУП ВНИИОФИ, 119361, г. Москва, ул.Озерная, 46

Тел.: +7(905)771-73-52; e-mail: kutuzovnp@gmail.com

Пуринергическая сигнализация (ПС) представляет собой универсальную систему межклеточной коммуникации. Она появилась на ранних этапах эволюции и с тех пор участвует в регуляции широкого спектра клеточных процессов (рост, дифференциация, развитие воспалительных реакций, генерация болевых ощущений и т.д.). ПС опосредуется широкой номенклатурой рецепторов, различных по селективности к лигандам (АТФ, АДФ, аденозин и другие) и по механизму передачи сигнала.

Особенно важна роль ПС для нервной системы. Благодаря ей осуществляются тесные взаимодействия между глиальными клетками, а также нейронами и глией, которые обеспечивают связь между активностью нейронов и локальным кровотоком мозга. Значительно меньше известно о роли ПС в периферической нервной системе. Существуют данные о том, что определенные этапы ПС связаны с липидными мембранами, являющимися важнейшей структурой для функционирования нервных волокон. К настоящему времени остается открытым вопрос о возможной связи между ПС и перестройками мембран нервных клеток.

Данная работа была направлена на исследование неспецифического действия АТФ, как основного лиганда ПС, на состояние липидных мембран аксо-глиального комплекса периферических нервных волокон. Было обнаружено выраженное возрастание возбудимости нерва при добавлении АТФ в концентрации от 0.85 до 14 мМ. Согласно полученным экспериментальным данным увеличение возбудимости под действием АТФ опосредовано P2 типами рецепторов (кроме P2X3).

С помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния были измерены распределения основных полос молекул липидов и каротиноидов в различных областях нервного волокна. Затем эти данные были использованы для исследования перестроек мембран нервных волокон, возникающих под действием АТФ. Соотношения интенсивностей основных полос спектра КР каротиноидов и липидов позволяют исследовать важные физико-химические свойства мембран. Согласно полученным данным добавление АТФ приводит к упорядочиванию жирнокислотных остатков липидов в составе плазматических мембран. Изменение свойств мембраны может существенным образом отразиться на физиологии нервных волокон, в связи с чем данный процесс может рассматриваться как возможное проявление неспецифического действия ПС при ее активации.

Таким образом, полученные в работе данные свидетельствуют о выраженном действии АТФ на возбудимость периферических нервных волокон и указывают на новые возможные механизмы регуляции их активности посредством изменений в структуре липидных мембран.

СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА РАСТВОРОВ ГЕМОГЛОБИНА В ПРИСУТСТВИИ СОЛЕЙ МЕТИЛИРОВАННОЙ РТУТИ**Spectral properties of hemoglobin solutions at the presence of methylmercury salts****Лавриненко И.А.¹, Рубан М.К.^{1,2}, Вашанов Г.А.¹**¹ – Воронежский государственный университет,
394006, Воронеж, Университетская площадь, 1² – Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н.Бурденко,
394036, Воронеж, ул. Студенческая, 10

Тел.: +7(473)220-84-50; факс: +7(473)239-92-81; e-mail: vga@main.vsu.ru

Ртуть является одним из 17 тяжелых металлов, загрязняющих окружающую среду и, будучи наиболее опасной, способна накапливаться в организме животных и человека. Особенно это касается таких ее органических производных как метилированная ртуть, образующаяся в результате меркурирования органических соединений, и представляющая собой чрезвычайно токсичное вещество.

Ионы двухвалентной ртути взаимодействуют, прежде всего, с –SH группами белковых молекул, а также с –COOH и –NH₂ группами с образованием прочных комплексов – металлопротеидов. Органические соединения ртути (II), в силу своей способности легко проникать через мембраны клеток (метил-, этилртуть), оказывают наибольший токсический эффект на организм человека и животных по сравнению с остальными химическими формами Hg²⁺, являясь при этом в большей степени специфическим реагентом на –SH группы белков по отношению к ее неорганическим солям.

Исследованы спектральные свойства растворов гемоглобина в ультрафиолетовой и видимой частях спектра в присутствии солей метилированной ртути в широком диапазоне ее концентраций (10⁻⁹ – 10⁻⁴ моль/л). Показано, что инкубация с солями [CH₃Hg]⁺ не приводит к существенному изменению спектральных свойств гембелка, что тестируется по изменению положения максимумов, их интенсивности, и полуширине полос поглощения. Однако в УФ-диапазоне спектра с уменьшением длины волны наблюдается некоторое увеличение экстинкции для образца с максимальной концентрацией метилртути. Такого рода эффект может быть обусловлен проявлением взаимодействия [CH₃Hg]⁺ с сульфгидрильными группами белка, которые поглощают в УФ-области спектра, а также с увеличением рассеивания света образцом.

Опираясь на значения характерных точек поглощения спектра гемоглобина, определено соотношение функционально значимых лигандных форм белка. Обнаружено, что при максимальной из используемых концентраций метилртути происходит незначительное смещение равновесия в системе Hb D HbO₂ в сторону образования последнего (т.е. переход из дезокси- в оксиформу). Относительное содержание метгемоглобина при этом остается неизменным.

Таким образом, метилированная ртуть, блокируя 2 –SH группы Cys93(β), вероятно, приводит к ослаблению межсубъединичных контактов в молекуле белка, снижая тем самым величину кооперативного эффекта; как следствие: усиление сродства дезоксигемоглобина к кислороду, что и приводит к наблюдаемому смещению равновесия.

РАЗЛИЧИЯ В ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ЛИДОКАИНУ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ КЛЕТОК СИНУСНО-ПРЕДСЕРДНОГО УЗЛА У КРОЛИКА И МЫШИ

Differences of lidokaine sensitivity on sodium channels pacemaker cells of rabbit and mouse sinoatrial node

Лебедева Е.А., Артеева Н.В., Головко В.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, 167982, Республика Коми, г. Сыктывкар, ул.

Первомайская, д.50

Тел./факс: +7(8212)24-00-85;

e-mail: lebedeva@physiol.komisc.ru, golovko@physiol.komisc.ru

Лидокаин – антиаритмик I класса широко используется не только для терапии аритмий, но и в качестве локального анестетика. Однако влияние этого вещества на генерирование внутриклеточных потенциалов действия (ПД) клетками синусно-предсердного (СП) узла млекопитающих остается неизвестным.

Цель работы заключалась в исследовании чувствительности к лидокаину суммарного направленного через сарколемму внутрь клеток тока, формирующего фазу быстрой деполаризации ПД клетками синусно-предсердного узла у кролика и мыши.

Методика. Опыты проводили в условиях микроэлектродной техники на спонтанно сокращающихся полосках СП области кролика (n=6) и мыши (n=21).

Результаты. Нами исследованы эффекты лидокаина (10 – 1000 мкМ) на основные электрофизиологические параметры ПД пейсмекерных клеток с сопоставимой dV/dt_{max} и частотой генерирования ПД 108 ± 22 имп/мин у кролика и 316 ± 40 (M $\pm\sigma$) имп/мин у мыши. В контрольном растворе Тироде скорость фазы быстрой деполаризации пейсмекерных клеток кролика составила 9 ± 3 В/с и мыши – 16 ± 5 В/с. Анализ дозозависимости с помощью уравнения Хилла выявил, что снижение максимальной скорости деполаризации ПД в фазу 0 (dV/dt_{max}) на 50% (EC50) у мыши происходило при экспозиции лидокаина в концентрации ≈ 16 мкМ (n=5), а у клеток синусно-предсердного узла кролика – ≈ 224 мкМ (n=4). Установлено, что пороговая концентрация лидокаина для клеток мыши (12 мкМ) на порядок ниже, по сравнению с препаратами из сердца кролика (100 мкМ, соответственно). Следует отметить, что лидокаин (25-50 мкМ) замедлял также и скорость фазы диастолической деполаризации потенциалов действия у мыши среднем на 21%, а у кролика этот эффект не зарегистрирован.

На основании полученных результатов и данных литературы заключаем, что изоформы, формирующие проводящую часть поры Nav1.5 Na-каналов пейсмекерных клеток мыши и кролика, имея сходство в строении на атомно-молекулярном уровне, различаются в по чувствительности к лидокаину в среднем в десять раз.

Работа поддержана УрО РАН проекты 12-П-4-1054 и 12-У-4-1022.

ОБРАЗОВАНИЕ ПОР В ЛИПИДНЫХ ВЕЗИКУЛАХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА МАГАНИНА.

The Initial Stage of Magainin 2-Induced Pore Formation in Lipid Membranes.

Левадный В.Г.^{1,3}, Белая М.Л.², Takahashi Т.³, Alam J.Md.³, Tsuboi Т.³, Yamazaki М.³

1 – Центр Теоретических Проблем Физико-Химической Фармакологии РАН, 117977, Москва, ул. Косыгина, 4; 2 – ОАО “Эн Си Фарм”, 129090, Москва, Проспект Мира, 13; 3 – Department of Physics, Shizuoka University, 422-8529, Shizuoka, Japan. Тел.: + 81-54-238-4741, 8-926-394-78-87; e-mail: levad@yahoo.com

Маганин-2 (M2), выделенный из кожной слизи африканской шпоровой лягушки *Xenopus laevis*, считается одним из наиболее перспективных антимикробных пептидов (АМП). В результате целого ряда исследований, проведенных различными исследовательскими группами, установлено, что ключевым моментом антимикробного действия M2 является образование поры в липидном матриксе. В настоящей работе анализируется первичный этап воздействия M2 на липидный матрикс мембран. Исследуя взаимодействие M2 с гигантской липидной везикулой (ГЛВ), мы определили как концентрация адсорбировавшихся на поверхность везикулы молекул M2 влияет на: а) внутреннее латеральное давление в липидном бислое; б) изменение площади внешней поверхности везикулы; в) скорость образования первичной поры. В работе исследовались ГЛВ (размером ≈ 10 мкм) образованные из смеси (в разных концентрациях) заряженного липида дилеофосфатидилглицерол (DOPG) и нейтрального липида дилеофосфатидилхолина (DOPC). Для определения изменения площади поверхности везикулы и латерального давления в бислое под действием молекул M2 использовался классический метод микропипеточного всасывания, который был реализован следующим образом. Микропипетка прикасалась к ГЛВ. За счет снижения давления внутри микропипетки, небольшая часть мембраны ГЛВ всасывалась внутрь микропипетки. Размер этой части (который определяется латеральным давлением в липидном бислое ГЛВ) тщательно контролировался и измерялся. Далее, к внешней части ГЛВ подводилась вторая пипетка, через которую в раствор впрыскивался M2. Последние частично адсорбировались на внешней поверхности ГЛВ. В результате этого изменялась площадь поверхности ГЛВ и латеральное давление в липидном бислое ГЛВ. Указанные параметры рассчитывались на основе измеряемой величины находящейся внутри микропипетки части ГЛВ. Таким образом было установлена зависимость изменения площади поверхности везикул от поверхностной концентрации X молекул M2

$$\delta = \frac{\Delta A}{A_0} = 1.05X$$

а изменение латерального давления σ в бислое вычислялось в соответствие с известным выражением $\sigma = 2 \gamma \delta$ (где A_0 – поверхность ГЛВ до адсорбции M2, ΔA – изменение поверхности ГЛВ в результате адсорбции M2, $\gamma = 35$ мН/м – удельная межфазная энергия на границе углеводород-вода, X в единицах [моль пептида/моль липида]). Скорость образования поры определялась по свечению флуоресцентной метки (кальцеин) внутри ГЛВ (6-8). Для интерпретации полученных результатов была построена теоретическая модель. Адсорбировавшиеся во внешний монослой ГЛВ молекулы M2 индуцируют растяжение внутреннего монослоя и сжатие липидной части внешнего. Во внутреннем монослое возникают локальные разряжения 2D плотности монослоя, которые можно трактовать как «полу-поры». Последние или исчезают со временем, или трансформируются в полноценные сквозные трансмембранные поры. Количественный анализ, проделанный на основе Теории Первого Достижения Барьера (mean first passage time) показал хорошее соответствие теоретических и экспериментальных результатов.

ИЗМЕРЕНИЕ МОДУЛЕЙ УПРУГОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДАМИ ЛАЗЕРНОЙ ДИФРАКТОМЕТРИИ И ОПТИЧЕСКОГО ЗАХВАТА**Measuring erythrocyte elastic modulus by methods of laser diffractometry and optical tweezing****Ли Кисун,¹ Самсонова Ю.С.,¹ Маклыгин А.Ю.,¹ Приезжев А.В.,¹ Луговцов А.Е.,¹ Никитин С.Ю.,¹ Фадюкова О.Е.,² Кошелев В.Б.²**¹ – Физический факультет и ² – Факультет фундаментальной медицины
МГУ им. М.В. Ломоносова 119991, Москва, Ленинские горы, 1.

Тел.: +7-495-939-26-12; факс: +7-495-939-31-13; e-mail: leekisung1991@gmail.com

Деформируемость эритроцитов (ДЭ) представляет собой один из основных параметров, определяющих эффективную вязкость крови. Этот параметр, как физическую величину, можно определить как меру способности клетки изменить свою форму под действием внешних сил. Ввести такую меру количественно в общем случае довольно трудно. Это связано с тем, что эритроцит имеет сложную форму (в норме это двояковогнутый диск диаметром около 8 мкм и объемом около 100 мкм³). Кроме того, часто бывает трудно охарактеризовать действующие на эритроцит силы и вызванное этими силами изменение формы частицы. Сами деформации эритроцита могут быть различными. Деформации при сжатии и растяжении эритроцита (по различным координатам) можно измерять в метрах, деформации при изгибе и скручивании эритроцита – в градусах или радианах. Деформации эритроцита могут быть статическими (как в оптической ловушке) или динамическими (как в сдвиговом потоке). При деформации эритроцита в капилляре человека важную роль играет взаимодействие частицы со стенками сосуда, в результате которого частица может приобретать сложную форму типа парашюта. Известно также, что ДЭ сильно зависит от внешних условий, таких как температура, кислотность и осмоляльность окружающей среды. Следует также иметь в виду, что в популяции эритроцитов разные клетки могут иметь разную способность к деформации. Все это делает количественную характеристику упругих свойств эритроцита сложной задачей. Тем не менее целесообразно искать пути измерения ДЭ. Один из наиболее простых способов связан с использованием оптической ловушки. При этом в диаметрально противоположных точках к мембране эритроцита прикрепляются два маленьких кварцевых шарика, на которые действуют силы, растягивающие эритроцит. Величина деформации частицы и приложенные силы могут быть измерены. Отношение силы к деформации можно назвать коэффициентом упругости эритроцита. Опыты показывают, что этот коэффициент $k \approx 10^6$ Н/м. Другой способ измерения ДЭ связан с использованием сил вязкого трения. Он реализуется в эктацитометре, где эритроциты подвержены действию постоянного напряжения сдвига. В этом случае мерой упругости эритроцита может быть отношение безразмерного параметра деформации эритроцита к величине сдвигового напряжения в Паскалях. Из данного определения следует, что эта величина измеряется в обратных Паскалях. Численное значение ДЭ зависит от многих условий, в частности от величины напряжения сдвига. В докладе будет дан обзор методов измерения упругости эритроцитов и проведено сравнение полученных результатов.

**ПРИМЕНЕНИЕ СТОХАСТИЧЕСКОГО ПОДХОДА К ОПИСАНИЮ
ПРОЦЕССОВ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ**

**Application of stochastic approach to description of various protein complexes
functioning**

Лизьякина А.Д.¹, Бороновский С.Е.², Нарциссов Я.Р.²

¹-Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», 115409, г. Москва, Каширское ш., 31;

²-НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии,
115404, г. Москва, ул. 6-я Радиальная, д. 24, стр. 14.
Тел./факс: +7(495) 327-49-87; e-mail: icmph@yandex.ru

Анализ метаболических путей в различных организмах является одним из основных вопросов современной биофизики. Существуют различные математические методы для построения моделей, описывающих белок-субстратные взаимодействия, использование которых зависит от поставленных задач. Так, если в случае рассмотрения системы из нескольких ферментов достаточно эффективным является кинетический анализ, оперирующий макропараметрами отдельного белка (например, V_{max} и K_m), то при оценке этих параметров исходя из схемы работы единичного фермента такой подход не всегда позволяет получить адекватные результаты. Это связано как с вероятностным характером протекающих внутри белка процессов, так и со сложностью локализации переходных форм фермент-субстратного комплекса. Таким образом, наиболее корректным методом для описания процессов такого рода является стохастический подход на основе структурного анализа исследуемого объекта. В данной работе показаны принципы перехода от данных о структуре белкового комплекса к реализации вероятностных схем его работы и расчету макроскопических параметров, необходимых для последующего сопоставления с экспериментальными данными.

В рамках созданного подхода входными переменными модели являются константы равновесия для элементарных стадий. Причем значения констант непосредственно определяются из структуры соответствующих сайтов связывания. Помимо этого, вероятность одиночного перехода зависит от концентрации субстратов, участвующих в данной стадии. Таким образом, процесс работы фермента может быть представлен в виде последовательности его состояний и функции потоков, изменение которой происходит на каждой стадии, включающей в себя присоединение или отсоединение метаболита. При этом наличие обратной связи между функцией потоков и концентрациями всех агентов в системе позволяет проводить анализ макропараметров в условиях, при которых даже единичный белковый комплекс способен существенно изменять свойства своего окружения. Расчет зависимости соответствующих потоковых функций от внешних условий дает возможность получать на выходе не только стандартные количественные характеристики фермента, такие как, например, скорость работы и сродство к различным субстратам, но и определять управляющие стадии и зависимость эффективности всего процесса от путей его протекания. В работе показано применение разработанного метода для моделирования активности белков с различными схемами функционирования и его сравнение со стандартными кинетическими моделями.

**АНАЛИЗ МЕХАНИЧЕСКОГО РАСТЯЖЕНИЯ C-КАДГЕРИНА ПО ДАННЫМ МД
МОДЕЛИРОВАНИЯ****Analysis of C-Cadherin mechanical extension based on molecular dynamics
simulation****Лихачев И.В., Балабаев Н.К.**

Институт математических проблем биологии Российской академии наук,
142290, Московская область, г.Пушино, ул.Институтская, д.4, ИМПБ РАН
ilya_lihachev@mail.ru

Молекулы семейства кадгеринов играют важную роль в процессах межклеточной адгезии. Кадгерин – Ca²⁺-зависимый гликопротеин в составе межклеточных контактов. Кадгерин состоит из экстрацеллюлярной (межклеточной) и цитоплазматической частей. Экстрацеллюлярная часть кадгерина содержит 5 доменов EC1-EC5. Согласно структуре C-Cadherin из Protein Data Bank (PDB), между доменами располагаются по 3 иона Ca²⁺. Считается, что именно эти ионы влияют на механические свойства белка, позволяя ему сохранять свою форму [1].

Исследованию механических свойств кадгерина уделяется большое внимание [1, 2, 3]. Для этого используются, в частности, методы молекулярной динамики (МД) и атомной силовой микроскопии. Опубликованы данные по МД моделированию кадгеринов с ионами Ca²⁺, K⁺, Na⁺. Опыты по разворачиванию кадгерина с ионами Ca²⁺, K⁺, Na⁺ и Mg²⁺ проводились с использованием атомной силовой микроскопии.

Настоящая работа посвящена исследованию механических свойств C-кадгерина методом молекулярной динамики. Помимо структуры кадгерина из PDB, были проведены опыты с C-кадгерином с заменой ионов Ca²⁺ на ионы Mg²⁺, K⁺ и Na⁺. Моделирование молекулярной динамики (МД) кадгерина проводилось с помощью программного комплекса PUMA. Для анализа полученных траекторных файлов использовалась программа TAMM (Trajectory analyzer of molecular dynamics). Обе программы разработаны в ИМПБ РАН. Результаты моделирования хорошо согласуются с данными [2].

Проведены МД-эксперименты с четырьмя структурами C-Cadherin (с 12 ионами Ca²⁺ или Mg²⁺, и с 24 ионами Na⁺ или K⁺). Они включали расчеты по релаксации начальной структуры, растяжению за концы с постоянной скоростью, циклическому растяжению/сжатию с постоянной скоростью (0.01 нм/пс), растяжению с постоянной силой (100, 200, 400, 800 пН).

В ходе циклических экспериментов по растяжению/сжатию кадгерина за концы была обнаружена картина гистерезиса. Предложена механическая модель, включающая упругость и текучесть кадгерина при растяжении, и объясняющая результаты наблюдаемых явлений. Показано, что кадгерин с ионами магния и кальция обладают схожими механическими характеристиками.

1. S. Pokutta et al. J. Biochem 223 (1994) 1019-1026.
2. M. Sotomayor, K. Schulten, Biophys. J. 94 (2008) 4621-4633.
3. J. Oroz et al. J.Biol.Chem. 286 (2011) 9405-9418.

**ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА РТУТИ (II) НА КИНЕТИКУ ДИССОЦИАЦИИ
ОКСИГЕМОГЛОБИНА ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА****The influence of mercury (II) chloride on the rate of human red blood cells
oxyhemoglobin dissociation****Локтюшкин А.В., Гуськова Р.А., Иванов И.И.**

Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова,
119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12
Тел.: +7(495)939-33-15; факс: +7(495)939-11-15; e-mail: allokt@gmail.com

Методом остановленной струи (двухволновая фотометрическая регистрация, 560 и 577 нм) исследовано влияние хлорида ртути HgCl_2 на кинетику реакции диссоциации оксигемоглобина эритроцитов человека в присутствии избытка восстановителя – дитионита натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Диссоциация оксигемоглобина обусловлена восстановлением молекулярного кислорода $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ во внеклеточной среде [1]. Показано, что зависимость эффективной константы скорости диссоциации ($1/\tau_{1/2}$, $\tau_{1/2}$ – время дезоксигенации половины гемовых групп в клеточной суспензии) носит немонотонный характер. При концентрациях HgCl_2 менее 120 мкМ эффективная скорость возрастает по сравнению с контролем (при 120 мкМ HgCl_2 в 1,6 раза), при более высоких концентрациях HgCl_2 (160 и 240 мкМ) эффективная скорость уменьшается по сравнению с контролем (при 240 мкМ в 3,7 раза).

Для выяснения механизма влияния HgCl_2 на кинетику диссоциации оксигемоглобина измерены равновесные кривые связывания кислорода гемоглобином при различных концентрациях хлорида ртути [2]. Установлено, что при всех использованных концентрациях HgCl_2 сродство гемоглобина к кислороду снижается.

Ранее нами было высказано предположение, что инкубация эритроцитов с HgCl_2 приводит к снижению проницаемости мембраны эритроцитов для кислорода [3]. Полученные в данной работе результаты согласуются с этой гипотезой, если предположить, что ускорение диссоциации оксигемоглобина эритроцитов при низких концентрациях HgCl_2 (до 120 мкМ) связано со сдвигом кривой диссоциации оксигемоглобина, а замедление при высоких концентрациях – с изменением мембранной проницаемости для O_2 .

Полученные в данной работе данные расширяют имеющиеся представления о механизмах токсического действия соединений ртути на живые организмы. Токсические эффекты этих соединений могут быть частично связаны с нарушением кислородного обеспечения тканей организма в результате снижения кислородного сродства гемоглобина и снижения проницаемости мембран эритроцитов.

1. Vandegriff K.D., Olson J.S. / J. Biol. Chem., 1984. V.259. P.12619-12627.
2. Kiesow L.A., Bless J.W. et al. / Clin. Chim. Acta, 1972. V.41. P.123-139.
3. Иванов И.И., Локтюшкин А.В. и др. / ДАН, 2007. Т.414. С.697-700.

**ПОИСК ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ НОВЫЕ РНК, В МЕЖГЕННЫХ ОБЛАСТЯХ
ГЕНОМА E.COLI****Search for genes encoding novel RNAs within the intergenic region of the
E.coli genome****Лукьянов В.И.^{1,2}, Тутукина М.Н.^{1,3}, Озолинь О.Н.^{1,3}**

1 – Институт биофизики клетки РАН, Московская область, Пущино, ул.
Институтская д. 3;

2 – Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, ул.
Институтская д. 3;

3 – Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, пр. Науки, 3
Тел: +7(496) 773-91-40; факс +7(496) 733-05-09; e-mail: lvi@mail.ru

Нетранслируемые РНК играют важную роль в экспрессии генов у всех организмов, в том числе у бактерий. Они выполняют разнообразные и пока мало предсказуемые функции. Наиболее эффективными методами их поиска оказались подходы, сочетающие компьютерное сканирование геномов, анализ данных полногеномного экспрессионного скрининга и экспериментальное тестирование конкретных локусов. В данной работе использовался предварительный поиск новых мест кодирования по сигналам транскрипции. Десять промоторов, предсказанных между конвергентными генами или генами, транскрибируемыми по противоположной нити, которые не могут быть использованы для транскрипции уже известных генов, были исследованы экспериментально *in vivo* и *in vitro*. Для поиска промоторов была использована программа PlatProm [1]. Последующий выбор был осуществлен с использованием данных экспрессионного анализа [2]. Для промоторов четырех межгенных областей (b2651-ileY, yfhL-shoB, ytfI-ytfJ и yhdZ-rrfA) ожидаемые продукты были зарегистрированы в реакции обратной транскрипции. Для участка galU-hns, содержащего перекрывающиеся промоторы, формирующие «промоторные островки», методом задержки в геле было выявлено образование нескольких комплексов с РНК полимеразой. Но при клонировании galU-hns в репортерный вектор pET28b-EGFP нам не удалось зарегистрировать синтез GFP, хотя по данным экспрессионного анализа эти промоторы активны в хромосомной ДНК. Это свидетельствует о зависимости промоторной активности от генетического окружения. Открытый комплекс с РНК полимеразой был зарегистрирован для участков flxA-b1567, gltP-yjcO, b2345-vacJ, yhdZ-rrfA, ygcE-queE и ORF138-gsp, для всех из них методом однократной инициации транскрипции с использованием варьирующих по длине матриц были обнаружены продукты ожидаемой длины и установлено направление их синтеза. Структурный анализ РНК (GysR), синтезируемой из участка gltP-yjcO, позволил предсказать множество мишеней её регуляторного воздействия. Таким образом, использование комплексного подхода позволило выявить участки генома, на которых возможен синтез новых РНК-продуктов и предсказать новые регуляторные связи в бактериальной клетке.

Работа поддержана грантом РФФИ 10-04-01218-а и финансировалась в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации.

1. Shavkunov K.S., Tutukina M.N. et al. / Nucl. Acids Res. 2009, V. 37, P. 4919-4931.

2. Reppas N.B., Wade J.T. et al. / Mol. Cell 2006, V.24, P. 747-757.

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА В УСЛОВИЯХ ОБЛУЧЕНИЯ КРАСНЫМ СВЕТОМ В ПРИСУТСТВИИ МЕТИЛЕНОВОГО ГОЛУБОГО**The Viability of Ehrlich Ascites Tumor Cells under Irradiation with Red Light in the Presence Methylene Blue****Лысенко Ю.А., Косых И.А., Артюхов В.Г.**

ГБОУ ВПО «ВГУ», 394006, г. Воронеж, Университетская пл., 1, корпус 1
Тел.: +7(473)2208-308; факс: +7(473)2208-308; e-mail: lysenko@bio.vsu.ru

Повреждающее действие экзогенно генерируемых активных форм кислорода и синглетного кислорода в настоящее время находит широкое применение в клинической практике в рамках метода фотодинамической терапии злокачественных новообразований, предполагающей использование красителя-сенситизатора, и, как правило, видимого света. Эффективным генератором синглетного кислорода является краситель — метиленовый голубой (МГ). В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование чувствительности клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ), находящихся на различных стадиях роста опухоли, к действию красного света в присутствии МГ различных концентраций. Нами исследованы изменения уровня жизнеспособности клеток АКЭ, извлеченных на 5-е, 7-е и 12-е сут роста опухоли, после их инкубации в присутствии МГ, а также облучения красным светом (665 нм) в смеси с данным фотосенситизатором. Также исследованы изменения электронных спектров поглощения и фотофлуоресценции МГ в смеси с ДНК клеток АКЭ в условиях темновой инкубации и облучения красным светом в дозе 18 Дж/см². Показано, что на 7-е и 12-е сут роста АКЭ в перитонеальной полости мышей аутбредного стока NMRI среди популяции делящихся клеток большее их число характеризуется околодиплоидным набором хромосом, а на 9-е сут доминируют клетки с гипердиплоидным кариотипом. Наибольшим модифицирующим действием на клетки АКЭ обладает МГ в концентрации 10⁻⁴ моль/л. Клетки АКЭ, извлеченные на 7-е сут роста неоплазмы, более резистентны к цитотоксическому действию МГ (10⁻⁴) в условиях темновой инкубации и облучения красным светом в дозе 18 Дж/см², чем клетки опухоли, полученные на 5-е и 12-е сут пролиферации. Эффект фотосенситизированной модификации жизнеспособности клеток АКЭ при облучении системы красным светом в дозе 18 Дж/см² выявляется в большей степени при использовании красителя в концентрации 10⁻⁴ моль/л. Фотодинамическое действие МГ (10⁻⁴ моль/л) превалирует над темновыми токсическими реакциями, вызванными добавлением красителя, при разведении клеточной суспензии.

Изменения спектральных и фотофлуоресцентных характеристик МГ в смеси с ДНК клеток АКЭ определяются исходной концентрацией красителя и количеством нуклеиновой кислоты: при концентрации МГ 10⁻⁵ моль/л наблюдается гипохромный эффект (снижение интенсивности абсорбции МГ) и тушение его флуоресценции, что свидетельствует о связывании модификатора с молекулой ДНК. Увеличение концентрации МГ на порядок при соотношении фосфат — краситель 0,47:1 способствует преципитации ДНК.

ИНГИБИРУЮЩАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИЗОБОРНИЛФЕНОЛОВ В ПРИСУТСТВИИ ЛЕЦИТИНА

The inhibitory effectiveness of isobornylphenols in the presence of lecithin

**Мазалецкая Л.И.¹, Шелудченко Н.И.¹, Шишкина Л.Н.¹, Федорова И.В.²,
Чукичева И.Ю.²**

¹ – Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

² – Институт химии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, 167982, Республика Коми, Сыктывкар, ул. Первомайская, 48
Тел.: +7(495)939-71-71, e-mail: lim@sky.chph.ras.ru

Биологическая активность природных и синтетических фенолов обусловлена их способностью взаимодействовать как со свободными радикалами, так и компонентами мембран, модифицирующими метаболизм в биологической системе вследствие изменения интенсивности перекисного окисления липидов. В работе изучено влияние лецитина на эффективность ингибирующего действия полусинтетических терпенофенолов (ТФ) с изоборнильными заместителями. Лецитин – смесь природных фосфолипидов, среди которых преобладает фосфатидилхолин (ФХ), является удобным модельным субстратом для оценки влияния компонентов клетки на антиоксидантные свойства соединений, поскольку ФХ преимущественно локализуется в наружном бислое биологических мембран. Влияние лецитина на ингибирующую эффективность ТФ – 2-изоборнилоксифенола (ТФ-1), 2-изоборнил-4-метилфенола (ТФ-5), 2-изоборнилфенола (ТФ-6), 2,6-диизоборнил-4-метилфенола (ТФ-7) – изучали на модели цепного автоокисления (323 К) метилолеата, а степень их взаимодействия с лецитином оценивали из дифференциальных электронных спектров поглощения ($[ТФ]_0 = 1 \times 10^{-4}$ моль/л и $[лецитин]_0 = 0.625$ мг/мл) с использованием величины $\Delta D = D_{\text{лецитина}} - D_{\text{смеси}}$, где ΔD – изменение интенсивности полосы поглощения общего компонента смесей – лецитина, $D_{\text{лецитина}}$ и $D_{\text{смеси}}$ – оптическая плотность полосы поглощения лецитина, снятого относительно растворителя и смеси лецитина с ТФ, снятого относительно раствора ТФ, которая составляет: 0,64 (ТФ-7), 0,35 (ТФ-5), 0,26 (ТФ-6) и 0,12 (ТФ-1). Степень взаимодействия ТФ с лецитином согласуется с рядом антирадикальной активности этих ТФ, причем для фенолов, имеющих только один о-изоборнильный заместитель, наблюдается близкая к линейной корреляция величины ΔD и $\ln k_7$, где k_7 – константа скорости взаимодействия ТФ с пероксирадикалами. Взаимодействие ТФ с лецитином, протекающее с образованием комплексов, приводит к снижению их антирадикальной активности, что подтверждается увеличением скорости реакции внутри периода индукции. Кроме того, по-видимому, происходит снижение реакционной способности фенолов и образующихся из них феноксильных радикалов в побочных реакциях. Показано, что ингибирующая эффективность смесей зависит от вклада побочных реакций в механизм ингибирования ТФ и степени взаимодействия с лецитином. Так, при условии незначительного вклада побочных реакций в общий механизм ингибирования и относительно слабом взаимодействии эффективность ингибирования ТФ в присутствии добавок лецитина может практически не изменяться, как это наблюдалось для ТФ-6. При слабом влиянии побочных реакций, когда зависимость периода индукции от $[ТФ]_0$ близка к линейной, и высокой степени взаимодействия добавка лецитина приводит к уменьшению эффективности ингибирования. Этот вариант реализуется для ТФ-7. При заметном вкладе побочных реакций, наблюдаемом для ТФ-5, эффективность ингибирования в присутствии лецитина увеличивается за счет снижения скорости протекания побочных реакций.

**ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
РЕГУЛЯЦИИ СКОРОСТИ ГИДРОЛИЗА ПЕПТИДНОЙ
СВЯЗИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ ОРГАНИЧЕСКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ**

Theoretical study of the rate regulation of the peptide bond hydrolysis by low-molecular organic compounds

Макшакова О.Н., Ермакова Е.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, 420111, Казань, ул. Лобачевского 2/31, а/я 30
Тел.: +7(843)231-90-37; факс: +7(843)292-73-47; e-mail: makshakova@mail.knc.ru

Гидролиз пептидной связи – ключевой процесс метаболизма живых организмов. Хорошо известно, что ферменты, благодаря оптимальной конфигурации и химическому составу активного центра, кардинально ускоряют гидролитическое расщепление пептидной связи. Другим фактором регуляции скорости, как ферментативного, так и неферментативного гидролиза, является состав растворителя и физико-химическая природа косольвентов. Детальное понимание механизмов регуляции биохимических реакций необходимо для расширения наших представлений о природе многокомпонентных взаимодействий, как базиса функционирования биологических систем, а также является основой для разработки биотехнологических приложений.

В данной работе проведено теоретическое исследование влияния молекул органических растворителей и карбоновых кислот на реакцию неферментативного гидролиза на примере дипептида аланина методами квантовой химии. Молекулы выбранных органических растворителей – метанола, этанола, пропанола, ацетонитрила и ДМСО – могут рассматриваться как аналоги низкомолекулярных метаболитов, присутствующих в живых клетках, а также представляют самостоятельный интерес для технологических приложений. Методом DFT получены профили реакции гидролиза для четырех основных типов механизма реакции, определено влияние низкомолекулярных органических соединений на высоту активационного барьера лимитирующей стадии реакции, охарактеризованы структуры переходных состояний и интермедиатов. Результаты исследования показали, что в присутствии органических соединений наиболее вероятным является поэтапный механизм реакции, катализируемый гидроксилсодержащим соединением – молекулой спирта или карбоновой кислоты. Полученные результаты могут также служить основой для дальнейшей оценки эффективности работы ферментов в присутствии низкомолекулярных органических соединений.

Все расчеты выполнялись в программном пакете Gaussian 09 на кластерах межведомственного суперкомпьютерного центра РАН.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №12-03-01085-а

ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ПРОЧНОСВЯЗАННЫХ СТОПОЧНЫХ АГРЕГАТОВ АЗОТИСТЫХ ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЖИЗНИ

Luminescence of the tightly-bonded stacked aggregates of nitric bases of nucleic acids and origin of life

Малкин В.М., Зорина С.В., Комаров С.М., Быков Н.А., Савина А.В., Сафаргалеева Е.А., Решетова К.И., Горючко В.В., Рапопорт В.Л.

НИИ Физики им. В.А. Фока, Физический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, 198504, Санкт-Петербург, Ульяновская ул., д. 1
Тел.: +7 (911) 929-85-01; e-mail: vlmalkin@yandex.ru

Рассматриваются особенности спектров люминесценции и её возбуждения прочносвязанных стопочных агрегатов («агрегатов») азотистых оснований нуклеиновых кислот (аденина, гуанина, цитидина, урацила и тимина) в водных растворах: длинноволновой сдвиг максимумов спектров люминесценции относительно характерных для мономеров (от 310 — 330 нм к 400 — 500 нм) и экситонное расщепление спектров возбуждения люминесценции, около 3000–4000 см⁻¹, что соответствует близкому 3.0 Å межплоскостному расстоянию (плотной упаковке оснований в агрегатах). Отмечается, что полученные для агрегатов спектры поразительно близки к спектрам соответствующих им динуклеозидмонофосфатов (ApA, CpC, UpU) и полинуклеотидов (poly-A, poly-C, poly-T). Близость спектров обязана сходству структур — взаимного расположения и взаимодействия соседних оснований в агрегатах, динуклеозидмонофосфатах и полинуклеотидах.

Приводятся данные о термической устойчивости агрегатов, не распадающихся даже при нагреве до 80 °С, что позволило выдвинуть гипотезу об их возможной роли в эволюции — прото-РНК, обладающей возможностью к матричной саморепликации при циклических нагревах и охлаждениях содержащих агрегаты и комплиментарные мономеры растворов [1].

Изложены данные о способности агрегатов к саморепликации. Наблюдение тушения люминесценции агрегатов при смешивании (при 2 °С) растворов аденина и урацила (тимина) связывается с образованием нелюминесцирующих «дуплексов» с Уотсон-Криковскими связями между стопочными агрегатами из адениновых агрегатов и урацила (тимина), аномальный рост люминесценции агрегатов при нагреве этих растворов до температуры разрыва водородных связей связывается с распадом дуплексов на стопочные агрегаты, рост концентрации агрегатов (до 15%) при циклических нагревах и охлаждениях (от 2 до 10 °С) связывается с саморепликацией агрегатов в описанных условиях. Отмечается важная роль света (310 нм) в процессе распада агрегатов.

**ФИЗИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ ЖИВОЙ КЛЕТКИ ГИЛЬБЕРТА ЛИНГА.
ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ****Gilbert Ling's physical theory of the living cell. The basic principles****Мальгин А.В.¹, Матвеев В.В.²**

¹ – Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6. Тел./факс: +7(812)328-42-51; e-mail: malygin.av@gmail.com;

² – Институт цитологии РАН. 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4. Тел.: +7(812)297-57-32; факс: +7(812)297-35-41; e-mail: vladimir.matveev@gmail.com

Доклад представляет собой расширенное введение к книге Гильберта Линга "Физическая теория живой клетки. Незамеченная революция", Санкт-Петербург, "Наука", 2008 г. Теория Линга объясняет с новых позиций четыре фундаментальных свойства клетки: (1) полупроницаемость, (2) способность избирательно аккумулировать вещества, (3) способность сохранять осмотическую стабильность, и (4) способность генерировать электрические потенциалы. Фундаментальными эти свойства являются потому, что наше понимание их механизма определяет наши представления практически по любому вопросу жизнедеятельности клетки. Теория Линга основывается не столько на свойствах мембраны, сколько на сорбционных свойствах белков, где бы они ни находились в клетке. В свою очередь, сорбционные свойства белков зависят от условий микроокружения. Согласно теории, вода адсорбируется полипептидным остовом (общим элементом всех белков), представляющим собой геометрически правильное чередование диполей (NH и CO групп), пространственно комплементарных сетке молекул воды, связанных водородными связями. Ионы K⁺ селективно связываются карбоксильными группами остатков бикарбонатных аминокислот. Селективность центров связывания по отношению к воде и ионам K⁺ объясняется характерным распределением электронной плотности на пептидных и карбоксильных группах, соответственно. Наиболее сильным модификатором распределения электронной плотности в белке является АТФ, обладающая сильным электрооакцепторным действием. В покое АТФ адсорбирована на ключевых белках клетки, что приводит к образованию комплекса: (АТФ)*m*(белок)*n*(H₂O)*p*(K⁺)*q*, где *n* может быть настолько большим, что в состав комплекса могут войти ключевые белки всей клетки.

Как и всякая новая теория, теория Линга позволяет по-новому взглянуть на устоявшиеся представления в физиологии и биофизике клетки, наметить новые перспективы исследований. Исследовательская программа теории Линга может выглядеть примерно так:

1. Исследовать многослойную адсорбцию воды белками (включая нативно-развернутые белки).
2. Исследовать влияние электронной плотности на карбоксильных группах органических веществ и белков на избирательность их взаимодействия с ионами.
3. Продолжить исследования на современном методическом уровне равновесного распределения веществ между клеткой (органеллами) и средой в сравнении с модельными системами.
4. Изучать глобальное распределение электронной плотности на белке и его изменения как механизм, определяющий конформацию макромолекулы и ее сорбционные свойства.

**ЭФФЕКТИВНЫЙ ПОДХОД К МОДЕЛИРОВАНИЮ ЭЛЕКТРОННО-
КОНФОРМАЦИОННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ: ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА
КОНФОРМАЦИОННОЙ РЕГУЛЯЦИИ РЕАКЦИИ РЕКОМБИНАЦИИ
В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОМ РЕАКЦИОННОМ ЦЕНТРЕ**

**Efficient approach to modelling of electron-conformational interactions: study
of conformational regulation of recombination reaction within photosynthetic
reaction center**

Мамонов П.А.¹, Красильников П.М.¹, Рубин А.Б.¹

¹ – Биологический факультет МГУ им. Ломоносова.
119234, Москва, Ленинские горы, д1. стр.12
тел. +74959394367, e-mail: piton@erg.biophys.msu.ru

Актуальной задачей современной молекулярной биофизики является исследование структурно-функциональных отношений в белках, и в частности конформационных механизмов регуляции активности белков, осуществляющих окислительно-восстановительные реакции. Традиционно задачи такого рода считаются областью применения молекулярного моделирования. Однако многие функциональные и адаптационные процессы в биомолекулах происходят за времена на порядки превышающие времена доступные для моделирования и требуют применения искусственных приемов, повышающих вероятность их протекания на временах доступных для моделирования. Одним из подходов к данной проблеме является метод метадинамики [1], позволяющий моделировать маловероятные события в молекулярных системах, а также рассчитывать поверхности свободной энергии в пространстве произвольных степеней свободы (коллективных переменных).

В рамках данной работы был разработан подход к исследованию электронно-конформационных взаимодействий, в основе которого лежит метод метадинамики с использованием в качестве коллективной переменной энергии сродства к электрону участников окислительно-восстановительной реакции. Также была предложена процедура анализа ядерных движений, позволяющая идентифицировать степени свободы многатомной системы, непосредственно сопряженные с ее окислительно-восстановительными свойствами. Рассматриваемый подход был успешно апробирован на классической окислительно-восстановительной реакции между ионами Fe²⁺ и Fe³⁺ в растворе и позволил воспроизвести в численном эксперименте эффективную энергию активации данного процесса, а также идентифицировать группу атомов, движения которых составляют активационный процесс.

Предложенная группа методов была использована для поиска механизма конформационной регуляции реакции рекомбинации в фотосинтетическом реакционном центре бактерии *Rb. sphaeroides*. Полученные результаты позволили идентифицировать в качестве вероятного механизма стабилизации электрона на молекуле первичного хинона протонирование 4C=O группы хинона с последующим разрывом водородной связи хинон – гистидин M219. Полученный результат согласуется с предложенными ранее теоретическими моделями данного явления [2].

1. A.Laio, F.L.Gervasio Rep. Prog. Phys. 71, 126601, 2008.

2. P.M. Krasilnikov, P.A. Mamonov, P.P. Knox, V.Z. Paschenko, A.B. Rubin BBA/Bioenergetics 2007, 1767, 541-549

**ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ И СОСТАВА ФОСФОЛИПИДОВ НА ИХ СПОСОБНОСТЬ
К МИЦЕЛЛОБРАЗОВАНИЮ В НЕПОЛЯРНОМ РАСТВОРИТЕЛЕ****Influence of the nature and composition of phospholipids on their ability to micelle
formation in non-polar solvent**

**Маракулина К.М., Крамор Р.В., Луканина Ю.К., Плащина И.Г., Поляков А.В.,
Шишкина Л.Н.**

ФГБУН Институт Биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,
119334, г. Москва, ул. Косыгина, д.4
Тел.: +7(495)9397186; e-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru

Соотношение размеров и химического строения полярной головки и длины и степени ненасыщенности неполярных жирнокислотных цепей фосфолипидов (ФЛ) может оказывать существенное влияние на их поверхностно активные свойства. Поэтому целью работы было изучение влияния природы и состава фосфолипидов на параметры их самоорганизации в гексане.

В работе исследованы следующие препараты ФЛ: 10%-ный спиртовой раствор соевого лецитина (ЛС) (доля фосфатидилхолина не менее 80 %), хлороформный раствор L- α -кефалина (ФЭ) (доля фосфатидилэтаноламина не менее 64%) и хлороформный раствор сфингомиелина (СМ) (доля сфингомиелина не менее 92%) из мозга быка. Чистоту и фракционный состав ФЛ контролировали методом тонкослойной хроматографии. Степень ненасыщенности и степень окисленности ФЛ оценивали методом УФ-спектроскопии их растворов в гексане по отношению пиков в области 230 нм (диеновые конъюгаты) и 270 нм (кедодиены) к основному пику при 200-205 нм. Агрегацию ФЛ в гексане исследовали методом динамического светорассеяния с помощью прибора Zeta Sizer Nano Malvern Instruments при 25° С и фиксированном угле рассеяния 173°. Участие функциональных группировок ФЛ в мицеллообразовании определяли методом ИК-спектроскопии.

ФЛ в гексане образуют несколько типов агрегатов, отличающихся друг от друга по размеру. Однако, СМ, самый насыщенный из исследованных ФЛ, образует преимущественно агрегаты одного размера, доля которых составляет не менее 97%. При повышении концентрации ЛС доля основной фракции агрегатов также увеличивалась, приближаясь к 100%.

Обнаружена полимодальная зависимость размера агрегатов основной фракции от концентрации исходного ФЛ, что свидетельствует о сложности их процесса самоорганизации в неполярном растворителе. Изучение влияния времени экспозиции растворов на размер агрегатов показало, что диаметр агрегатов только СМ и ЛС достоверно линейно увеличивается во времени.

Анализ данных ИК-спектроскопии выявил, что в процессе мицеллообразования ФЛ в гексане, как правило, участвуют полярные группировки: ОН-группа, сложнэфирные С=О и амидная группы, а также холиновые группировки ЛС и СМ.

Таким образом, состав и природа ФЛ оказывают существенное влияние на процесс их самоорганизации в гексане, что подтверждает представление о важной роли соотношения размера и химического состава полярной головки и степени ненасыщенности жирнокислотных цепей ФЛ, обуславливающего их поверхностно активные свойства.

БЕЛКОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ, ВОЗНИКАЮЩИЕ В КЛЕТКАХ- МОДЕЛЯХ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА, КАК МИШЕНИ ДЛЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.**Protein complexes arising in cell models of Huntington disease as the targets for drugs.****Маргулис Б.А., Лазарев В.Ф., Гужова И.В.**ФГБУН Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4
Тел.: +7(812)297-37-94; факс: +7(812)297-03-4; e-mail: margulis@incras.ru

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) помимо участия в гликолизе выполняет несколько иных функций, в частности вступает в комплексы с мутантными белками, из которых формируются агрегаты следствием чего являются патологические нарушения процессов жизнедеятельности клетки. Подобное явление мы наблюдали в клеточной модели болезни Хантингтона (БХ) со сверхэкспрессией мутантного хантингтина с аномально длинной полиглутаминовой цепью, polyQ [1]. Комплекс polyQ-ГАФД достаточно прочен, и добавление ГАФД приводит к увеличению агрегатов в бесклеточной модели БХ. Напротив, удаление ГАФД с помощью специфических антител или технологии siRNA снижает уровень агрегации комплекса. Наконец фармакологические вещества, известные своим высоким сродством к молекуле ГАФД, при инкубации с клетками-моделями БХ также снижают количество агрегатов и их размеры. По данным ряда исследователей основными, естественными компонентами клетки, способными бороться с агрегацией мутантных белков, являются молекулярные шапероны, в частности белок теплового шока Hsp70. Чтобы проанализировать его роль в образовании комплексов polyQ-ГАФД и их дальнейшей агрегации, была получена постоянная клеточная линия с индуцибельной экспрессией шаперона. При действии ионов цинка экспрессия Hsp70 возрастала, что приводило к снижению агрегации комплекса polyQ-ГАФД. С помощью разработанной тест-системы мы определили, какие взаимодействия трех белков существенны для снижения агрегации и показали, что Hsp70 реагирует с polyQ АТФ-зависимым образом, что свойственно шаперонам этого класса. Взаимодействие Hsp70 с ГАФД определяется ко-фактором фермента, НАД; введение последнего в бесклеточную тест-систему БХ приводило к восстановлению агрегатов. Таким образом, факторами, препятствующими росту патогенных агрегатов в модели БХ и других полиглутаминовых патологий могут быть низкомолекулярные вещества, способные связывать ГАФД или вызывающие дополнительный синтез шаперона Hsp70. К третьей группе веществ, могущих повлиять на механизм образования агрегатов при БХ, нужно отнести соединения, которые влияют на взаимодействия Hsp70 с ГАФД.

Работа поддержана грантом РФФИ офи-м №11-04-12047 и Программы РАН «Фундаментальные науки – медицине».

ТРАНСДУКЦИЯ СИГНАЛОВ В МИТОХОНДРИЯХ С УЧАСТИЕМ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА**Signal transduction in mitochondria by redox oxygen species****Мартинович Г.Г., Мартинович И.В., Голубева Е.Н., Черенкевич С.Н.**

Белорусский государственный университет,
220030, Минск, пр. Независимости, 4, Республика Беларусь
Тел.: +375-17-209-52-78; факс: +375-17-209-54-45; e-mail: martinovichgg@bsu.by

Необходимым этапом развития современных биомедицинских технологий является изучение механизмов передачи и обработки информации в клетках. Одним из способов передачи информации в клетках являются электрон-транспортные процессы, протекающие с участием редокс-активных молекул (переносчиков электронов между белками) и белков. Показано, что ключевым регулятором редокс-сигнализации в опухолевых клетках выступают митохондрии. Однако участие митохондрий в процессах обработки информации в клетках остается малоизученным.

В представленной работе на основании собственных и литературных данных обосновывается, что генерация активных форм кислорода (АФК) митохондриями является универсальным механизмом ответа клеток на действие различных апоптозиндуцирующих факторов и противоопухолевых препаратов. Согласно данному механизму повышение генерации АФК митохондриями индуцирует открытие пор высокой проводимости в митохондриальных мембранах, при котором происходит высвобождение апоптозиницирующих факторов в цитозоль.

Преобразование внутриклеточного сигнала митохондриями можно разделить на три этапа. На первом этапе осуществляется рецепция и преобразование сигнала, в результате чего усиливается генерация АФК митохондриями. Увеличение выхода АФК в электрон-транспортной цепи митохондрий может происходить при действии различных химических агентов, включая ряд противоопухолевых и сердечно-сосудистых препаратов. На втором этапе с участием АФК осуществляется трансдукция сигнала на соответствующий редокс-сенсор. Третий этап – это активация редокс-сенсора, в результате которой запускается клеточный ответ.

Трансдукция сигнала на митохондриальный эффектор осуществляется только при достижении определенного порога генерации АФК, необходимого для активации соответствующего редокс-сенсора. При активации митохондриального апоптоза сенсором повышения концентрации АФК могут выступать сульфгидрильные группы адениннуклеотидного транспортера внутренней мембраны митохондрий.

Разнообразие входных сигналов для данного механизма позволяет рассматривать митохондрии в качестве «сумматора» физико-химических сигналов: в рамках предложенного механизма активация трансдукции сигнала может происходить как при действии одного фактора, так и при действии комплекса факторов. Существенным элементом предложенного нами механизма является также чувствительность данного трансдукционного сигнала к изменению параметров редокс-состояния клетки.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке БРФФИ (грант №Б11-027).

ИЗМЕНЕНИЯ ГРАНИЧНОГО ПОТЕНЦИАЛА ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН, ВЫЗВАННЫЕ АДСОРБЦИЕЙ ПОЛИЛИЗИНОВ НА ИХ ПОВЕРХНОСТИ

Changes of boundary potential of lipid membranes induced by adsorption of polylysines on their surface.

Марукович Н. И.¹, Батищев О. В.², МакМюрей М. Д.¹, Ермаков Ю. А.²

¹ – Московский физико-технический институт (ГУ), 141700 Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9, тел: 8 (495) 408-45-54.

² – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физической химии и электрохимии РАН, лаборатория Биоэлектрохимии, 119071, Москва, Ленинский проспект 31 корп.5
Тел.: 9525582, e-mail: nmarukovich@gmail.com

Измерен электрокинетический (дзета-потенциал) липосом липидных мембран и граничный потенциал плоских БЛМ (компенсация внутримембранного поля) при адсорбции полилизиннов разного молекулярного веса (1, 5, 12, 130, 598, 1435 звеньев). В обычных условиях (фоновый электролит 10 мМ КСl, рН около 7.0 и ниже) полипептиды заряжены положительно и сорбируются на мембранах, содержащих анионные фосфолипиды (кардиолипин, СL и фосфатидилсерин, PS). Изменение поверхностного (дзета) потенциала достигает насыщения до 180 мВ в случае крупных полилизиннов (100 и более звеньев). Изменение знака заряда поверхности мембран происходит в узкой области концентраций, близкой к содержанию анионных липидов в ячейке с учетом их ионизации, зависящей от рН. Образование кластеров полипептидов и их размеры на поверхности мембран с разным соотношением отрицательной (СL) и нейтральной (РС) компонент зарегистрированы методом атомно-силовой микроскопии. При 20% СL в смеси липидов площадь, занятая короткими цепями (пентализин) примерно равна площади отрицательной компоненты на поверхности мембраны, тогда как кластеры полипептидов большей длины (130 и 1435 звеньев) занимают поверхность, примерно в 2 – 3 большую. Средняя «высота» кластеров полипептидов увеличивается от 0,4 до 2.3 нм с ростом длины полимера.

Техника плоских БЛМ позволила регистрировать кинетику изменения граничного потенциала при адсорбции лизина и полилизиннов при введении их с одной стороны мембраны. При адсорбции лизина эти изменения обратимы путем перфузии ячейки фоновым электролитом. В отличие от монолизина при адсорбции полилизиннов кинетика изменений граничного потенциала имеет две фазы противоположного знака, а его величина достигает насыщения, которая не меняется при последующей перфузии ячейки. Добавление в ячейку полилизиннов при промежуточных значениях граничного потенциала вызывает быстрое (минуты) изменение потенциала положительного знака, за которым следует медленные (до сотен минут) изменения противоположного знака. Суммарная амплитуда медленной фазы, примерно одинаковая для всех полилизиннов, понижает уровень насыщения на 40 мВ по сравнению с изменениями дзета потенциала в суспензии липосом. Полученные данные указывают на необратимое связывание полилизиннов с поверхностью отрицательно заряженных мембран и изменение дипольной компоненты граничного потенциала в результате структурных перестроек бислоя. Эта гипотеза позволяет объяснить различие эффектов, обнаруженных при адсорбции лизина на мембранах из PS и СL.

GROEL-ЗАВИСИМОЕ СВОРАЧИВАНИЕ БЕЛКОВ: ГДЕ ОНО ПРОИСХОДИТ – ВНУТРИ ИЛИ ВНЕ ШАПЕРОНИНА?**GroEL-assisted protein folding: where does it occur – inside or outside of the chaperonin?**

Марченков В.В.¹, Гороховатский А.Ю.², Марченко Н.Ю.¹, Котова Н.В.¹, Семисотнов Г.В.¹

¹ – Институт белка РАН, 142290, Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 4;

² – Филиал Института биоорганической химии им. А.А. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова РАН, 142290, Пущино, Московская обл., проспект Науки, 6

Тел.: +7(495)514-02-18; факс: +7(4967)31-84-35; e-mail: nina@vega.protres.ru

Молекулярные шаперонины, одним из ярких представителей которых является белок GroEL клеток *Escherichia coli*, относятся к особому классу белков – шаперонам, участвующим в приобретении клеточными белками функционально активной конформации. Основная структурная особенность шаперонинов состоит в наличии особым образом организованной четвертичной (олигомерной) структуры, содержащей обширную внутреннюю полость. Наиболее распространенным является предположение, что субстратные белки помещаются в эту полость шаперонина и сворачиваются в ней в отсутствие нежелательных контактов друг с другом, приводящих к фатальной для сворачивания этих белков агрегации. В случае GroEL существенную роль играет ко-шаперонин GroES, связывание которого с шаперонином приводит как к увеличению размеров внутренней полости, так и к ее закрытию вместе с содержащимся в ней субстратным белком.

В настоящей работе представлены экспериментальные данные по исследованию роли лигандов (ионов Mg, АДФ, АТФ) и ко-шаперонина GroES в осуществлении шаперонной функции GroEL. Во-первых, показано, что GroEL, связываясь с ранними кинетическими промежуточными состояниями сворачивающихся белков, замедляет скорость их сворачивания пропорционально молярному избытку. Такой эффект шаперонина на скорость сворачивания субстратных белков может быть только в том случае, если в комплексе с GroEL сворачивание субстратного белка ингибируется, и оно происходит только когда белок находится вне комплекса с шаперонином. При этом лиганды GroEL уменьшают его сродство к субстратным белкам, что приводит к увеличению скорости их сворачивания в присутствии шаперонина. Во-вторых, показано, что взаимодействие GroEL с ко-шаперонином GroES не приводит к закрытию субстратного белка во внутренней полости шаперонина, а наоборот – к его вытеснению из комплекса с GroEL. Слабо связанные белки могут периодически диссоциировать с GroEL без участия лигандов и сворачиваться в свободном состоянии. Если субстратные белки сильно связываются с GroEL, то для их диссоциации необходимы лиганды шаперонина (Mg-АДФ, Mg-АТФ и ко-шаперонин GroES). При этом лиганды ослабляют комплекс GroEL с ненативными белками в ряду Mg-АДФ < Mg-АТФ < GroES. Результаты работы позволяют предполагать, что GroEL-зависимое сворачивание белков происходит не в комплексе с шаперонином, а в свободном состоянии.

Работа поддержана Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Госконтрактом Минобрнауки РФ № 02.740.11.0295.

**КИНЕТИКА ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ
ЗОНДОВ В МОЛЕКУЛЫ ФЕРМЕНТА****Investigation of fluorescent probes immobilization kinetics into ferment molecules****Маряхина В.С.**

Оренбургский государственный университет, 460018, г. Оренбург, пр. Победы 13
Тел: +7(3532) 37-25-80; e-mail: valemar@mail.ru

Флуоресцентные зонды часто используются при проведении флуоресцентной диагностики наряду с фотосенсибилизаторами. После инъекции они могут взаимодействовать не только с клетками, но и с веществами белковой природы, содержащиеся в крови, межклеточной жидкости. При этом происходит смещение спектров флуоресценции зонда относительно его спектра водного раствора [1]. Однако фундаментальные аспекты взаимодействия зондов с белками и ферментами недостаточно изучены.

Объектом исследования явился зонд – эритрозин с исходными концентрациями 10-3М и 10-4М. Во время экспериментов аликвота красителя добавлялась к растворам коллагеназы (0.1÷0.5 мг/мл) в фосфатном буфере (рН=7). Для исследования диффузионных процессов в течение 10 минут измерялось изменение интенсивности флуоресценции красителя на длине волны 560 нм (λ_{ex} =520 нм). После этого, когда кинетика флуоресценции вышла на стационарный режим, проводили регистрацию спектров поглощения и флуоресценции (λ_{ex} =520 нм) растворов эритрозина. Все измерения были проведены на спектрофлуориметре SOLAR CM-2203.

Получено, что коэффициент экстинкции зонда в растворе коллагеназы 0.5 мг/мл равен $(1.03 \pm 0.15) \cdot 10^5$ М⁻¹см⁻¹ и незначительно изменяется при уменьшении концентрации фермента. Измерения кинетики интенсивности флуоресценции показали её не линейный характер во всех растворах. В течение первой минуты происходит падение интенсивности флуоресценции за счёт равномерного распределения зонда в растворе. Затем происходит последовательное её «разгорание» и тушение в течение 4÷6 минут за счёт иммобилизации зонда в молекулы фермента мономеров и димеров красителя. Стационарный режим достигается спустя 6÷8 мин. в зависимости от концентрации фермента в растворе.

В то же время спектры флуоресценции красителя смещаются в сторону длинных волн и происходит их уширение относительно спектра флуоресценции зонда в буферном растворе. С увеличением концентрации фермента такие изменения более значительны, что свидетельствует о взаимодействии зонда с молекулами фермента и возможном образовании клатратов. В работе представлены результаты исследования кинетики иммобилизации эритрозина в молекулы фермента. Полученные закономерности могут быть полезны во флуоресцентной диагностике, фотодинамической терапии и исследованию процессов доставки лекарственных препаратов.

**МОДЕЛИРОВАНИЕ КРИВОЙ ИНДУКЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ ДИМЕРА
ФОТОСИСТЕМЫ II****Маслаков А.С., Антал Т.К., Ризниченко Г.Ю.**Биологический факультет МГУ, кафедра биофизики, Россия,
119991, Москва, Ленинские горы 1, корп. 12

Представлена математическая модель димерного суперкомплекса фотосистем II для описания начального участка кривой индукции флуоресценции хлорофилла *a*. Модель основана на симуляции электронтранспортных процессов в реакционном центре ФСII. В отличие от кинетических моделей, основанных на решении систем дифференциальных уравнений, этот метод позволяет изучать особенности гетерогенных систем, напрямую задавая параметры компонентов с отличными друг от друга свойствами. Рассматривали только начальный участок кривой индукции флуоресценции и в модели учитывали только события, происходящие на донорной стороне реакционного центра ФСII, – восстановление P680 и перенос электрона с P680 на Pheo и Qa. Рассматривали поведение ансамбля, состоящего из статистически значимого числа фотосистем. Для каждого реакционного центра ФСII в ансамбле на каждом шаге симуляции (с временным интервалом 5 пс) рассчитывали вероятность изменения его состояния и далее случайным образом (с учетом вероятности того или иного изменения состояния) определяли, останется ли его состояние прежним или изменится, и каким образом. Также на каждом шаге симуляции для каждой фотосистемы рассчитывали вероятность высвечивания квантов флуоресценции и случайным образом определяли, произойдет ли это высвечивание на данном временном интервале, собирали данные о высвечивании квантов флуоресценции по всему ансамблю и строили кривую индукции флуоресценции. Как показывают экспериментальные данные, в случае отсутствия взаимодействия между отдельными реакционными центрами начальный участок кривой индукции флуоресценции имеет экспоненциальную форму, в случае их объединения в энергетически взаимосвязанный комплекс из двух ФС – сигмоидную. Это было учтено в модели введением вероятности энергетического обмена между объединенными в пару реакционными центрами. С помощью данной модели проверили гипотезы об изменениях, происходящих в реакционных центрах ФСII при серном голодании *Chlamydomonas reinhardtii*.

**КИНЕТИКА ГОМЕОСТАТИРОВАНИЯ pH ЦИТОПЛАЗМЫ
ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА****The kinetics of the human erythrocyte intracellular pH homeostasis****Маслова М.Н., Зайцева Г.В., Зарицкий А.Р., Краснова М.А.**ФГБУН Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН,
11999, Москва, Ленинский проспект, д.53
Тел. 8-985-969-45-33, maslova_marina87@mail.ru

Работа посвящена анализу кинетики гомеостатирования уровня кислотности (величины pH) цитоплазмы эритроцитов. В этих клетках *in vivo* в норме реализуется устойчивое стационарное состояние, в котором эритроциты наиболее эффективно могут выполнять свою кислородно-транспортную функцию. При этом в норме диапазон значений pH цитоплазмы эритроцитов довольно узок (7,17÷7,28). Постоянство pH обеспечивается в процессе за счет равенства скоростей подщелачивания и подкисления цитоплазмы. Поэтому рассмотрение именно кинетики гомеостатирования величины pH в этих клетках позволит проанализировать особенности метаболизма эритроцитов.

Такой анализ удобно проводить, рассматривая скорости роста и убыли концентрации ионов H^+ в зависимости от концентрации АТФ ($nATP$) и pH, величины которых мы будем варьировать. При балансе указанных скоростей устанавливается стационарное состояние цитоплазмы по pH, которому на фазовой плоскости $\{nATP, pH\}$ соответствует точка. Совокупность всех стационарных точек на указанной фазовой плоскости дает кривую баланса скоростей подщелачивания и подкисления цитоплазмы.

Целью данной работы является получение этой кривой и выявление факторов, влияющих на ее положение на фазовой плоскости $\{nATP, pH\}$, а также проведение анализа на устойчивость точек кривой по указанным величинам.

Были рассмотрены основные процессы, протекающие в цитоплазме эритроцитов и влияющие на изменение концентрации ионов H^+ в ней, при условии поддержания на постоянном уровне концентраций всех веществ в плазме крови *in vivo*. Выяснено, что в установлении стационарной концентрации ионов H^+ ведущую роль играет величина трансмембранной разности потенциалов UM . Нахождение зависимости UM от $nATP$ и pH позволило получить аналитический вид указанной кривой баланса.

На фазовой плоскости $\{nATP, pH\}$ кривая баланса скоростей подщелачивания и подкисления цитоплазмы имеет вид гиперболы, все точки которой устойчивы по pH и по концентрации АТФ во всем физиологическом диапазоне. Положение этой кривой зависит как от величины неспецифической проницаемости мембран эритроцитов Ω , так и от интенсивности энергетического метаболизма. Регулирование скоростей метаболизма и величины Ω позволяет эритроцитам получить состояние, которому на кривой баланса будет соответствовать точка в пределах физиологического диапазона pH. Такое регулирование, по нашему мнению, может осуществляться биологически активными пептидами, образующимися в эритроцитах [1].

РОЛЬ ТОПОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ МАТРИЦЫ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ДИВЕРГЕНТНЫХ ПРОМОТОРОВ**The impact of template topological state in the activity of divergent promoters*****Масулис И.С.^{1,2}, Чернышов С.В.³, Озолин О.Н.^{1,2}***

¹- Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки РАН (ИБК РАН), 142290, Моск.обл., Пущино, ул. Институтская, 3;

² - Пущинский государственный естественно-научный институт, 142290, Моск.обл., Пущино, пр.Науки, 3;

³ - Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Филиал Института биоорганической химии РАН им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова (ФИБХ РАН), 142290, Моск.обл., Пущино, пр. Науки, 6

Тел.: +7(4967)73-91-40; факс: +7(4967)33-05-09; email: masulis@hotmail.ru

Явление дивергентной транскрипции широко распространено как у прокариот, так и у высших организмов и рассматривается в последние годы как мощный регуляторный инструмент, направленный на поддержание определенного структурного состояния ДНК-матрицы. Эффективность синтеза РНК, иницируемого на противонаправленных промоторах, определяется как собственными свойствами этих промоторов (способность к взаимодействию с РНК-полимеразой и образованию открытого промоторного комплекса), так и кооперативным взаимодействием между ними, опосредованным изменением суперскрученности ДНК в межпромоторной области. До сих пор не удалось достичь определенности в оценке относительного вклада в уровень синтеза РНК с таких участков а) суммарной суперскрученности ДНК; б) локальной суперскрученности в припромоторной области, привносимой работающим транскрипционным комплексом и в) собственной активности промоторов, обусловленной их нуклеотидной последовательностью. Для мониторинга активности противонаправленных промоторов в условиях воздействия факторов, модулирующих уровень суммарной суперскрученности ДНК в клетке, нами предложена конструкция репортерного вектора, несущая гены флуоресцентных белков EGFP и mCherry, ориентированные в противоположных направлениях. Активность дивергентных промоторов генов *ferA* и *fes* *E.coli*, клонированных в данный вектор, проявляла разнонаправленную зависимость от концентрации налидиксина (0,1-10 мкг/мл), ингибирующего бактериальную ДНК-гиразу и компенсирующего избыточную отрицательную суперскрученность. При концентрациях антибиотика 0,1-0,25 мкг/мл наблюдалось существенное увеличение активности промотора гена *fes*, более сильного в данной репортерной конструкции. Аналогичный эффект был обнаружен для дивергентных промоторов, выявленных в регуляторной области гена *arrY*. При этом сильный однонаправленный тестовый промотор демонстрировал стабильный уровень экспрессии во всем исследованном диапазоне концентраций налидиксина.

Полученные данные указывают на возможность дифференцированной регуляции активности дивергентных промоторов при изменении уровня суперспирализации матрицы в узком интервале дискретных значений этого показателя, которое может иметь место при смене физиологического состояния клетки и в стрессовых условиях.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 10-04-01218)

**ДВИГАТЕЛЬНОЕ И АВТОКОЛЕБАТЕЛЬНОЕ ПОВЕДЕНИЕ ПЛАЗМОДИЯ
PHYSARUM POLYCEPHALUM ПРИ ХЕМОТАКСИСЕ И МИГРАЦИИ КОНТРОЛИРУЕТСЯ
СОВМЕСТНЫМ ДЕЙСТВИЕМ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ PLC И PI3K/PTEN**

**Motile and auto-oscillatory behavior of *Physarum polycephalum* plasmodium
during chemotaxis and migration is controlled by joint action of PLC and PI3K/PTEN
signal pathways**

Матвеева Н.Б., Теплов В.А., Бейлина С.И.

Институт Теоретической и Экспериментальной Биофизики РАН, 142290
Пушино Московской области, ул. Институтская, 3
Тел.: +7 (4967)739312; факс: +7 (4967) 33-05-53; e-mail: beylina@iteb.ru

На плазмодии *Physarum polycephalum* – многоядерной амeboидной клетке с автоколебательным характером подвижности исследовалась возможность сопряжения фосфолипазы C (PLC) с сигнальным путем PI3K/PTEN – универсальным регулятором хемотаксиса и формы свободноживущих амeб и тканевых клеток. В плазмодии ингибирование PI3K не только подавляет хемотаксис, но и устраняет увеличение частоты автоколебаний – характерный для аттрактантов ответ плазмодияльного осциллятора на стимул, приложенный ко всей поверхности клетки [1]. Определяющая роль, которую в плазмодияльном осцилляторе играет рецептор инозитид-3-трисфосфата (IP3R) [2], увеличение активности β и γ изоформ PLC при связывании с PIP3 [3], а также то, что PIP2 – субстрат PLC является местом связывания PTEN с плазматической мембраной, указывают на возможность сопряжения обоих сигнальных путей. Такое сопряжение позволяет объяснить отсутствие ответа плазмодияльного осциллятора на аттрактант при ингибировании PI3K и предполагает существенное влияние PLC на двигательные реакции, контролируемые путем PI3K/PTEN. Это предположение проверялось с помощью ингибитора рецепторной активации PLC, аминостероида 1-(6-((17 β -3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-1H-pyrrole-2,5,-dione (U73122) – мощного сульфгидрильного реагента, подавляющего продукцию IP3 и высвобождение Ca²⁺ из IP3-чувствительного пула.

Показано, что при сохранении челночного потока протоплазмы и автоколебаний сократительной активности U73122 вызывает редукцию фронтальной зоны плазмодия, ухудшает локомоторные характеристики клетки, а также подавляет хемотаксис к глюкозе и ответ осциллятора на этот аттрактант. Идентичность этих эффектов с показанными ранее эффектами широко используемых ингибиторов PI3K вортманнина и LY294002 [1] свидетельствует о тесном сопряжении сигнальных путей фосфолипазы C и PI3K/PTEN.

U73122 вызывает увеличение периода колебаний сократительной активности и устраняет характерные для миграции плазмодия циклические изменения его величины, что указывает на наличие рецепторного управления двигательным поведением плазмодия.

Работа поддержана РФФИ, грант № 10-04-01240-а.

1. Матвеева Н.Б., Бейлина С.И., Теплов В.А./ Биофизика, 2008. Т. 53. С.986-992.
2. Матвеева Н. Б., Теплов В. А., Бейлина С. И./ Биол. мембраны, 2010. Т.27 С.84-91.
3. Liao H-J., Carpenter G. / In: Handbook of Cell Signaling, 2004. Eds Bradshaw R.A., Dennis E.A. London, Oxford, New York, San Diego: Acad. Press, V. 2. P.5-9.

УЧАСТИЕ IP₃ РЕЦЕПТОРА В АВТОКОЛЕБАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ПЛАЗМОДИЯ
PHYSARUM POLYCEPHALUM

Participation of IP₃ receptor in the auto-oscillatory system of *Physarum polycephalum* plasmodium

Матвеева Н.Б., Теплов В.А., Бейлина С.И.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, г.
Пушино Московской области, ул. Институтская, 3
Тел.: +7(4967)73-93-12; факс: +7(4967)33-05-53; e-mail: beylina@iteb.ru

Плазмодий миксомицета *Physarum polycephalum* предоставляет уникальные возможности для выяснения механизма автоколебаний, характерных для локомоции многих клеток – от низших эукариот до тканевых клеток животных. Обусловленная взаимодействием олигомеров миозина с прикрепленными к плазмалемме актиновыми филаментами сократительная активность этой гигантской клетки имеет ярко выраженный автоколебательный характер и легко регистрируется тензометрически. Колебания механических параметров плазмодия сопровождаются синхронными колебаниями цитоплазматической концентрации ионов Ca²⁺. Плазмодимальный осциллятор относительно независим от внешнего Ca²⁺, поскольку автоколебания продолжают более часа в бескальциевой среде [1]. Они сохраняются, хотя и модифицируются, и в присутствии ингибиторов рианодинового рецептора [2].

Целью настоящей работы было выяснение участия в плазмодимальном осцилляторе Ca²⁺ канала ретикулярной мембраны, активируемого инозит-1,4,5-трисфосфатом (IP₃R). Исследовано действие проникающего ингибитора IP₃R 2-аминоэтоксидифенил бората (2-APB) на автоколебания силы, развиваемой плазмодимальными тяжами в изометрическом режиме. С учетом уменьшения ингибиторной эффективности 2-APB с ростом концентрации IP₃ [3], указывающего на прямое взаимодействие с IP₃R, мы сравнивали эффекты 2-APB в норме и в присутствии стимулирующих продукцию IP₃ аттрактантов – веществ, инициирующих положительный таксис.

Показано, что 20 и 50 мкМ 2-APB вызывают обратимое прекращение колебаний силы, происходящее в двух разных режимах: резкого срыва или постепенного затухания, которое сопровождается увеличением периода автоколебаний и удлинением фазы сокращения. Доля образцов, реагирующих срывом колебаний, возростала вдвое при увеличении концентрации 2-APB от 20 до 50 мкМ. В присутствии аттрактантов (10 и 50 мМ глюкозы или ее рецепторного аналога 3-О-метилглюкозы) срыва колебаний в ответ на 20 мкМ 2-APB не наблюдалось, а их затухание часто начиналось с некоторой задержкой. Результаты позволяют заключить, что прекращение автоколебаний вызвано взаимодействием 2-APB с IP₃R клетки, а сам IP₃R является необходимым элементом автоколебательной системы плазмодия *Physarum polycephalum*.

Работа поддержана РФФИ, грант № 10-04-01240-а.

1. Wohlfarth-Bottermann K.E., Gotz von-Olenhusen K. / Cell Biol. Int. Reports, 1977. V.1. P.239-247.
2. Матвеева Н.Б., Ключева А.А. и др. / Биол. мембр., 2003. Т.20. С.66-71.
3. Bilmen J.G., Michelangeli F. / Cell Signal., 2002. T.14. P.955-960.

**КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ
СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН МОЗГА КРЫС ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ****Kinetic characteristics of synaptic membranes acetylcholinesterase from rat brain at
ischemia – reperfusion****Махмудова Х. М.¹, Алиев Г.Н.², Джафарова А. М.¹, Кличханов Н. К.¹,
Мейланов И. С.¹**¹ – Дагестанский государственный университет, Махачкала, Республика Дагестан² – Медико-санитарная часть МВД по РД, Махачкала, Республика Дагестан
Тел.: 8(8722)675915, e-mail: albina19764@mail.ru

Проблема ишемического инсульта в настоящее время становится все более актуальной. На ранней стадии ишемии повреждение мозгового вещества может быть обратимым. Восстановление адекватного кровотока в ишемизированных органах (реперфузия) вызывает не только защитный эффект, но и повреждающий с возможным фатальным исходом, то есть, улучшая кровообращение в ишемированных участках, организм отвечает парадоксальным ответом. При этом ведущим фактором повреждения является реакция гипероксии – “взрыв” свободно-радикальных патологических последствий для тканей, находящихся в состоянии гипоксии-ишемии. Для изучения молекулярных механизмов патогенеза мозга при постишемической реперфузии необходимым представляется исследование нейромедиаторных систем мозга. Одним из основных компонентов холинергической нейромедиаторной системы является ацетилхолинэстераза (АХЭ), которая регулирует временной профиль концентрации медиатора ацетилхолина в синаптической щели. Известно, что повреждение нейронов, связанное с ишемией и реперфузией, сопровождается изменениями в холинергической системе. Однако механизмы изменения активности АХЭ при этих состояниях мозга еще не известны. В настоящей работе нами исследованы кинетические характеристики АХЭ синаптических мембран из коры головного мозга крыс при ишемии (в течение 1 часа) и последующей (в течении 1 часа) реперфузии. Активность АХЭ определяли методом Элмана по скорости гидролиза ацетилтиохолина (АТХ). Концентрационную зависимость активности АХЭ измеряли в диапазоне концентраций АТХ от 0,156 до 64 мМ. Кинетические характеристики АХЭ: максимальную скорость (V_{max}), константу Михаэлиса (K_m) и константу субстратного ингибирования (K_i) находили методом наименьших квадратов в соответствии с моделью Холдейна. Исследование концентрационной зависимости активности АХЭ при ишемии и реперфузии показало, что положение оптимума на концентрационной кривой активности АХЭ ($Sopt$) не меняется. Однако, реперфузия сопровождается значительным снижением активности фермента во всем диапазоне исследованных концентраций ацетилтиохолина. Такое снижение скорости катализа связано с изменениями кинетических характеристик АХЭ. Обнаружено, что при реперфузии V_{max} уменьшается на 32 % по сравнению с контролем, и на 58 % по сравнению с ишемией. При этом значение K_m на 20,8% меньше такового при ишемии, то есть, остается на уровне контроля. Существенное снижение скорости катализа, на фоне незначительных изменений K_m при реперфузии приводит к уменьшению отношения V_{max}/K_m : на 34% и 47,2 % относительно контроля и ишемии. Реперфузия приводит к ослаблению прочности тройного комплекса SES, о чем свидетельствует достоверное повышение K_i на 41 % относительно контроля и на 95 % относительно ишемии. Снижение активности АХЭ и изменение ее кинетических характеристик при реперфузии, видимо, связаны с окислительной модификацией фермента под действием активных форм кислорода или радикалов мембранных липидов.

ОЦЕНКА БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ НЕРВНЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ FO F1-АТФ СИНТАЗЫ**Evaluation of neuronal energetic status due to FoF1-ATPsynthase mathematical modeling**

Машковцева Е.В., Бороновский С.Е., Нарциссов Я.Р.

Научно-исследовательский институт цитохимии и молекулярной фармакологии,
115404, Москва, ул. 6-я Радиальная, д. 24, стр. 14.
Тел./факс: +7(495)327-49-87; e-mail: elenamash@gmail.com

Энергетическое состояние клетки является одним из важнейших параметров нормального функционирования ткани, органа и организма в целом. Однако его экспериментальная оценка требует применения либо высокоинвазивных методов, либо радиоизотопной диагностики, что не всегда является оправданным при отсутствии жизненных показаний. Теоретическое определение количества АТФ в ткани или органе возможно при наличии информации о структуре и функционировании энергосинтезирующих систем, а также об их пространственном распределении. Подобный подход информативен и не требует дорогостоящих экспериментальных установок, а полученные результаты легко интегрируются с данными визуализирующих диагностических методик.

FoF1-АТФсинтаза, мембранный белок, ответственный за синтез энергии в форме АТФ в клетках млекопитающих, обладает высокой консервативностью. В настоящее время подробно изучены отдельные процессы, происходящие в ходе ее каталитического цикла, однако механизм обратимости, а также преобразования энергии вращения в энергию макроэргической связи АТФ до конца не исследованы. Одновременное описание протонирования и депротонирования аминокислотных остатков, вращения подвижных белковых субъединиц, переноса протонов через белковые полуканалы и каталитического превращения АДФ и АТФ требует применения различных математических методов, в том числе уравнений классической механики и вероятностного подхода. Разработанная модель, реализованная в виде программного продукта Program of ATP Synthesis and Hydrolysis (PASH), позволяет оценивать количество АТФ, производимое в заданных условиях как одним белком, так и клеткой в целом. Возможность гибкой настройки параметров синтеза и регуляция количества активно функционирующих ферментов в конкретной изучаемой области при наличии структурных данных делает представленный подход универсальным для оценки биоэнергетического состояния системы.

МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ ФАКТОРА LIF В РАННЕМ ЭМБРИОГЕНЕЗЕ

Multifunctionality of the LIF factor in early embryogenesis

Межевикина Л.М., Фесенко Е.Е.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук,
142290, Пущино, Московской обл., ул. Институтская, 3
Тел.: 8(495)625-59-84; факс: 8(496)733-05-09; e-mail: admin@cd.psn.ru

На примере рекомбинантного белка со свойствами цитокина LIF (Leukemia Inhibitory Factor) продемонстрирована сложность функционирования внутриклеточных систем, участвующих в передаче сигнала к пролиферации и/или дифференцировке, а также интерференция между различными сигнальными путями от первого контакта с индуктором до фенотипического проявления его эффектов в раннем эмбриогенезе. Показано, что действие рекомбинантного LIF на клеточном уровне может осуществляться без участия мембранных рецепторов (LIF-R и трансмембранного переносчика – гликопротеина gp130). Результаты на бислойных липидных мембранах свидетельствуют о прямом влиянии LIF на липидный матрикс клеточных мембран. Этот белок модифицирует мембранные липиды, увеличивая поверхностный потенциал и проводимость мембран. Последний момент особенно важен, поскольку изменение физических параметров клеточных мембран лежит в основе сохранения плюрипотентного потенциала стволовых и эмбриональных клеток при их коммуникациях в колониях *in vitro* и в составе целого зародыша на начальных этапах развития.

Данные, полученные на культурах эмбриональных стволовых клеток и доимплантационных зародышах мыши, однозначно указывают на функциональную избыточность LIF в раннем эмбриогенезе, что, на наш взгляд, обусловлено бинарным механизмом действия этого фактора на мембранные рецепторы, LIF-R и gp130, и липидный матрикс клеточных мембран. Пластичность такой регуляции позволяет активировать в стволовых и эмбриональных клетках различные сигнальные каскады (JAK-STAT3, MAPK и др.), ответственные за клеточную пролиферацию и выживаемость клеток в неблагоприятных условиях (дефицит трофических факторов, низкая концентрация свободного кальция в среде). И то же время, этот белок оказывает опосредованное влияние на межклеточные коммуникации, существенные как для сохранения плюрипотентного потенциала, так и для индукции первичных морфогенетических процессов в раннем эмбриогенезе.

Исследования мембранных и внутриклеточных эффектов LIF могут способствовать разработкам методов уменьшения потенциальных рисков, связанных с использованием стволовых клеток эмбрионального происхождения в медицине, а также пониманию механизмов перехода из плюрипотентного состояния к заданному типу дифференцировки.

Работа выполнена при поддержке грантов Президента РФ ведущих научных школ: НШ – 2741. 2008.4 и НШ – 3202. 2010.4 «Рецепция сигналов химической и физической природы».

**ИССЛЕДОВАНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН
МОЗГА ПРИ ГИПОТЕРМИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ У КРЫС И СУСЛИКОВ****Investigation of brain synaptic membranes acetylcholinesterase at hypothermic
states in rat and in ground squirrel**

**Мейланов И.С., Кличханов Н.К., Джафарова А.М., Махмудова Х. М.,
Игольников Е.С., Яралиева Ф. Я.**

Дагестанский государственный университет. Махачкала. М.Гаджиева, 43а.
Email: meylanovis@mail.ru

Ацетилхолинэстераза синаптических мембран (сАХЭ) мозга млекопитающих – один из важнейших ферментов в физиологии мозга. сАХЭ регулирует временной профиль нейротрансмиттера ацетилхолина (АХ) в холинэргических синапсах головного мозга. В то же время, его активность сказывается на концентрации АХ и за пределами синаптического контакта. сАХЭ является тетрамером идентичных протомеров, находится на внешней поверхности мембраны, активные центры её обращены в синаптическую щель. Нами исследованы кинетические характеристики и термостабильность сАХЭ мозга крыс и сусликов при гипотермических состояниях у этих животных. Две особенности сАХЭ состоят в том, что активность фермента при низких концентрациях субстрата контролируется диффузией, а при высоких концентрациях субстрата имеет место субстратное ингибирование. Концентрационная зависимость скорости гидролиза АХ хорошо описывается формулой Холдейна для субстратного ингибирования. Температурная зависимость активности фермента сама зависит от концентрации субстрата: при низких концентрациях субстрата в Аррениусовских координатах кривая аппроксимируется двумя линейными участками, а при высоких концентрациях одним. При искусственной гипотермии и в бауте глубокой спячки у сусликов кинетические характеристики сАХЭ изменяются: увеличиваются максимальная скорость и степень субстратного ингибирования, а константа Михаэлиса не изменяется. При гипотермии 30 °С и 20 °С у крыс активность сАХЭ увеличивается. Поскольку суслики эволюционно адаптированы к низким температурам тела, увеличение активности сАХЭ у них при искусственной гипотермии следует считать адаптацией. Тот факт, что у крыс изменения при гипотермии схожи с изменениями у сусликов, позволяет предположить, что у крыс тоже имеется определённая потенция к адаптации к низким температурам тела. Термостабильность (определяемая по величинам констант скорости термоденатурации) сАХЭ сусликов при зимней спячке увеличивается. Причём при межбаутном пробуждении она по-прежнему выше, чем в летнем контроле. Кинетика термоденатурации сАХЭ имеет две стадии – быструю и медленную. Модель трёх состояний – нативное→промежуточное→денатурированное адекватно описывает кинетику термоденатурации сАХЭ. Природа промежуточного состояния не известна. Но поскольку эта форма фермента каталитически активна, можно предположить, что *in vivo* эта форма может участвовать в регуляции активности фермента. Термостабильность сАХЭ крыс при гипотермических состояниях существенно не изменяется. Экспериментальные данные показывают, что различия в реакции сАХЭ на снижение температуры тела у крыс и сусликов могут быть обусловлены эволюционной предысторией этих двух видов.

КАК НАЙТИ «СЛАБОЕ МЕСТО» В ГЛОБУЛЯРНОМ БЕЛКЕ И УВЕЛИЧИТЬ ЕГО СТАБИЛЬНОСТЬ?

Мельник Б.С., Поварницына Т.Н., Глухов А.С., Мельник Т.Н.

Институт Белка РАН, г. Пущино
bmelnik@phys.protres.ru

Самый заманчивый (поскольку удобный с точки зрения методики) способ увеличить стабильность белка это введение ss-связи. Однако, зачастую, воздействие искусственно введенной ss-связи на стабильность белка оказывается совершенно непредсказуемым. Как выбрать участок белковой цепи «скрепление» которого ss-связью максимальной стабилизирует белок? В этой работе высказано предположение, что один из важных критериев, при проектировании ss-связи это высокая локальная подвижность участка белковой цепи не скомпенсированная гидрофобными взаимодействиями. На примере зеленого флуоресцентного белка, карбоксиангидразы и апомиоглобина показано, что анализ контактов гидрофобных аминокислот совместно с расчетами подвижности белковой цепи (программой Ponder-Fix) позволяют выбрать участок белковой цепи, введение ss-мостика на котором, вероятнее всего, увеличит стабильность белка.

Работа поддержана федеральной целевой программой «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (грант ПЗ04), программой Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

**РОЛЬ ЦИКЛООКСИГЕНАЗНОГО ПУТИ ОКИСЛЕНИЯ АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ
В РЕГУЛЯЦИИ ГЛУТОКСИМОМ ТРАНСПОРТА Na⁺ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ****The role of cyclooxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in the the
glutoxim regulation of Na⁺ transport in frog skin****Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И., Бутов С.Н.**

Санкт-Петербургский государственный университет,
199034, Санкт-Петербург, Россия, Университетская наб., 7/9
Тел.: 8 (812) 328-94-65; e-mail: avm242@hotmail.ru

Кожа амфибий и другие эпителиальные системы – классические модельные объекты для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны. Ранее нами было показано, что транспорт Na⁺ в коже лягушки модулируется окисляющими агентами. Впервые обнаружено, что GSSG и его аналог препарат глутоксим® (ФАРМА-ВАМ, Москва), приложенные к базолатеральной поверхности кожи лягушки, имитируют действие инсулина и стимулируют транспорт Na⁺. В дальнейшем было показано, что в регуляцию GSSG и глутоксимом транспорта Na⁺ в коже лягушки вовлечены тирозинкиназы, протеинкиназа C, серин/треониновые протеинфосфатазы PP1/PP2A, фосфатидилинозитолкиназы и элементы цитоскелета. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе регуляторного действия GSSG и глутоксима на транспорт Na⁺, во многом не ясны.

Известно, что арахидоновая кислота (АК) и ее производные – важные сигнальные молекулы, выступающие в качестве местных гормонов и медиаторов, и играющие важную роль в регуляции различных физиологических и патофизиологических процессов. В почках и других реабсорбирующих эпителиях, в том числе в эпителии кожи лягушки, АК и ее производные (преимущественно продукты циклооксигеназного пути окисления АК – простагландины) участвуют в регуляции транспорта ионов и воды. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать возможную роль циклооксигеназного пути окисления АК в регуляции глутоксимом транспорта Na⁺ в коже лягушки *Rana temporaria*. В экспериментах использовали два структурно различных ингибитора циклооксигеназ мелоксикам и индометацин. Известно, что индометацин подавляет активность обеих изоформ циклооксигеназ – циклооксигеназы 1 и циклооксигеназы 2, тогда как мелоксикам значительно более селективен к циклооксигеназе 2, чем к циклооксигеназе 1.

С применением метода фиксации потенциала показано, что преинкубация апикальной поверхности кожи лягушки с индометацином (20 или 40 мкМ) или мелоксикамом (40 мкМ) в течение 30 мин перед добавлением 100 мкг/мл глутоксима к базолатеральной поверхности кожи, существенно ослабляет стимулирующее влияние глутоксима на транспорт Na⁺. Обнаружено также, что по сравнению с индометацином, мелоксикам обладает значительно более выраженным ингибирующим действием на эффект глутоксима. Полученные данные свидетельствуют об участии продуктов циклооксигеназного пути окисления АК в действии глутоксима на транспорт Na⁺ в коже лягушки, а также о том, что, вероятно, циклооксигеназа 2 в большей степени, чем циклооксигеназа 1, вовлечена в этот процесс.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТОВ ФЕНОЗАНОВОГО РЯДА НА ЭРИТРОЦИТЫ МЕТОДОМ АСМ.

The investigation of drugs of fenozanovy row on the erythrocytes in vivo by AFM method.

Миль Е.М., Бинюков В.И., Албантова А.А., Алексеева О.М., Голощапов А.Н., Бурлакова Е.Б.

Институт Биохимической физики РАН им. Н.М. Эммануэля,
119334, Российская Федерация, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4
Тел.: 89165783682, e-mail:elenamil2004@mail.ru

В работе проводилось изучение воздействия фенольных антиоксидантов – фенозана К, и синтезированного на его основе препарата ИХФАН-10 методом АСМ (атомно-силовая микроскопия). Препараты (фенозан и ИХФАН -10), были синтезированы в ИХФ РАН. В настоящее время фенозан является известным антиоксидантом широкого спектра действия, ИХФАН – 10 был синтезирован на основе фенозана с добавлением холина и остатков жирных кислот и является перспективным препаратом для лечения болезни Альцгеймера и других патологий.

В исследовании препаратов эритроцитов был применен метод АСМ (атомно-силовая микроскопия). Работу проводили на приборе SOLVER P47 SMENA, на частоте 150 кГц в полуконтактном режиме, с использованием кантилевера NSG 11. Изменение морфологии эритроцитов наблюдали при введении мышам водных растворов препаратов как *in vivo*, так и *in vitro*.

Было обнаружено, что уже при малых концентрациях мелафена – стимулятора роста растений (10-11М) и фенозана (10-11) наблюдаются уменьшение высоты, площади и объема АСМ имиджа эритроцита. В тоже время ИХФАН-10 в малых концентрациях приводил к незначительному расплющиванию эритроцита *in vivo* и к набуханию эритроцита *in vitro*. ИХФАН-10 отличается в фенозана наличием жирнокислотной цепи, и может быть локализован преимущественно в липидном бислое. По-видимому, различная локализация ксенобиотиков в мембране эритроцитов приводит к разному воздействию на ионно-транспортные каналы и на осмотическое состояние клетки.

Таким образом, в работе впервые были обнаружены изменения структурных параметров эритроцитов при введении препаратов *in vivo* в малых концентрациях (10-11М), которые проявляются в ту же сторону при введении препаратов *in vitro*.

КИСЛОТНАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ И Na^+/H^+ - ОБМЕН ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ГИПОКСИИ**Acid resistance and Na^+/H^+ -exchange of red blood cells of humans by hypoxia****Мищенко А.А.¹, Иванкова Ж.Е.¹, Людина А.Ю.², Голубева Е.А.¹**¹ – Институт естественных наук, Сыктывкарский государственный университет, 167005, Сыктывкар, ул. Петрозаводская, 120;² – Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, 167982, Сыктывкар, ГСП-2, ул. Первомайская, 50
Тел.: +7(8212)22-20-81; e-mail: ien@syktsu.ru

Исследовали 13 проб крови мужчин-добровольцев (21-26 лет). Гипоксию вызывали вдыханием гипоксической газовой смеси с содержанием 9% O_2 в азоте. Венозную кровь забирали перед подачей смеси газов, на 5, 10, 35 мин после, затем на 5, 10 и 35 мин после прерывания подачи газовой смеси. КРЭ проводили по методу И.А. Гительсона и И.И. Терскова. Скорость Na/H -обмена оценивали по методу С.Н. Орлова и др. (1988). Достоверность разницы определяли по критерию Вилкоксона (Гланц, 1999).

В контроле средняя скорость изменений рН составила 0.15 ед рН/мин, что соответствует скорости работы Na/H -обмена $7.3 \times (10^{-9})$ моль H^+ /мин. На 10 минуте гипоксии у четырех из девяти испытуемых активность Na/H -обмена выросла в среднем до $10 \times (10^{-9})$ моль H^+ /мин. У остальных людей скорость Na/H -обмена оставалась постоянной на всем протяжении эксперимента. К 25-й минуте стадии восстановления испытуемых скорость Na/H -обмена возвращалась к исходному уровню.

Гипоксия вызвала увеличение кислотной резистентности (КРЭ) 4-х испытуемых, уменьшение у 5-ти, у остальных людей показатели не изменились. Действие гипоксии носило кратковременный характер: наибольшие изменения показателей наблюдались на 5-й минуте, к 10-й и 35-й они приближались к фоновым значениям (до гипоксии). В соответствии с этим в период восстановления (дыхание обычным воздухом) увеличенная КРЭ наблюдалась только у 2-х испытуемых, уменьшенная – у 4-х.

ВЛИЯНИЕ РАЗМЕРА ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ПРОИЗВОДНЫХ ИЗОХИНОЛИНА НА СПОСОБ ИХ СВЯЗЫВАНИЯ С МОЛЕКУЛОЙ ДНК**Effect of heterocyclic system size of the isoquinoline derivatives on their binding mode with DNA molecule****Морошкина Е.Б.¹, Леонтьева Т.В.¹, Белашева И.Б.¹, Криворотов Д.В.²**

¹ – физический факультет Санкт-Петербургского государственного университета, 198504, Санкт-Петербург, Ст. Петергоф, ул. Ульяновская, 1;

² – НИИ ГПЭЧ ФМБА России, 119991, Ленинградская область, п/о Кузьмоловский
Тел.: +7(812)428-46-48; e-mail: evmoro@mail.ru

Низкомолекулярные соединения, взаимодействующие с ДНК, давно находятся в поле зрения исследователей, поскольку такие соединения часто обладают мутагенной, а также противоопухолевой активностью и могут рассматриваться в качестве потенциальных предшественников новых лекарственных препаратов. Одним из способов связывания этих соединений с ДНК является интеркаляция. Концепция интеркаляции была предложена Лерманом около 50 лет назад для описания обратимого, нековалентного связывания с двуспиральной ДНК соединений с плоским гетероциклическим протяженным хромофором. Сущностью интеркаляции является встраивание такого хромофора между соседними парами азотистых оснований двойной спирали ДНК, увеличивающее расстояние между ними. В настоящее время наличие плоского гетероциклического хромофора часто считается достаточным условием для интеркаляционного связывания соединения с молекулой ДНК. Однако более подробные исследования показывают, что на способ связывания таких соединений с ДНК влияют как форма и размеры самого хромофора, так и природа и положение его заместителей.

В настоящей работе с помощью спектральных и гидродинамических методов изучено взаимодействие с ДНК ряда синтетических производных изохинолина, гетероциклическая система которых содержит от 2 до 4 сопряженных гетероциклов [1,2]. Были определены термодинамические параметры их взаимодействия с ДНК. Наибольшее сродство к ДНК и влияние на ее размеры в составе комплекса проявляют соединения, гетероциклическая система которых имеет 4 гетероцикла (производные каролина). Гидродинамическое поведение комплексов ДНК с этими соединениями свидетельствуют о значительном увеличении не только контурной длины макромолекулы, но и ее термодинамической жесткости. Соединения с двумя сопряженными гетероциклами в гетероциклической системе либо не интеркалируют в двойную спираль ДНК, либо связываются с ней по модели «частичной интеркаляции». И только соединения с тремя сопряженными гетероциклами ведут себя как классические интеркаляторы.

1. Криворотов Д.В., Воробьев М.В. и др. / Журнал органической химии 2006. Т.42. С.594-596.

2. Криворотов Д.В., Воробьев М.В. и др. / Журнал органической химии 2006. Т.42. С.793-794.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ШАПЕРОНОПОДОБНОЙ АКТИВНОСТИ АЛЬФА-КРИСТАЛЛИНА**Molecular mechanism of chaperone-like activity of alpha-crystallin****Муранов К.О., Полянский Н.Б., Островский М.А.**Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,
119334, г. Москва, ул. Косыгина д.4

Тел.: +7(495)9397441; факс: +7(499)1374101; e-mail: k.muranov@sky.chph.ras.ru

Альфа-кристаллин играет ключевую роль в поддержании прозрачности хрусталика глаза. Этот шапероноподобный белок предупреждает агрегацию повреждённых белков, образуя с ними стабильные водорастворимые комплексы. Недавно нами было показано, что повреждённый ультрафиолетом белок может использоваться как субстрат для изучения механизма шапероноподобной активности альфа-кристаллина в условиях близких к физиологическим.

Целью настоящей работы было исследовать взаимодействие УФ поврежденного бетаL-кристаллина с нативным альфа-кристаллином. Раствор бетаL-кристаллина в фосфатном буфере (pH=7) облучали ультрафиолетом при 10 °С. В холодный препарат облученного белка добавляли альфа-кристаллин в соотношении 1:1 по массе, инкубировали в течение 2 часов при 37 °С и анализировали полученные продукты. Инкубация при 37 °С раствора УФ поврежденного бетаL-кристаллина приводила к его агрегации и выпадению в осадок. При инкубации смеси УФ поврежденного бетаL-кристаллина и альфа-кристаллина раствор оставался прозрачным в течение длительного времени (часы). Три фракции, с молекулярными весами, равными 800 кДа, 75 кДа, и 41 кДа были получены при разделении такого раствора с помощью гель-фильтрации. В состав фракции весом 800 кДа входили 97% альфа-кристаллин и 3% бетаL-кристаллина. В состав фракции весом 75 кДа входили 31% альфа-кристаллин и 69% бетаL-кристаллина. В состав фракции весом 41 кДа входил только бетаL-кристаллин. Продукты УФ повреждения бетаL-кристаллина (димеры) входили в состав всех трех фракций. Аналогичные результаты были получены при разных значениях pH и ионной силы растворов. Анализ фракции весом 800 кДа методом динамического светорассеяния показал, что в её состав входят два типа частиц диаметром 18+1 и 15+1 нм, при этом примесь бетаL-кристаллина составляла 4% и 1.7%, соответственно. Таким образом, основная масса УФ поврежденного белка образует низкомолекулярный комплекс с альфа-кристаллином, частично присутствует в стабильной водорастворимой форме в растворе, и в очень небольшом количестве входит в состав высокомолекулярного комплекса альфа-кристаллином. Предлагается схема шапероноподобной функции альфа-кристаллина: поврежденный белок образует временный комплекс с альфа-кристаллином, который распадается на альфа-кристаллин меньшего размера, низкомолекулярный комплекс, и поврежденный белок, у которого под действием полярного окружения произошла конформационная перестройка и агрегационные сайты скрылись внутри молекулы.

ВЛИЯНИЕ ДОЛГОСРОЧНОГО ГИПОКСИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА

The influence of a long-term hypoxia preconditioning on the energy metabolism

Мурач Е.И.

ГБОУ ВПО НижГМА Минздравсоцразвития России,
603005, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1
ТЕЛ.: +79081522573; E-MAIL: elena_murach@mail.ru

Умеренное гипоксическое preconditioning (ГПК) является эффективным методом защиты головного мозга от гипоксического/ишемического повреждения. Сотрудниками нашей лаборатории был доказан положительный эффект краткосрочных 4-х дневных тренировок. Однако значительный интерес представляет исследование эффективности ГПК при длительных режимах воздействия.

Путем математического моделирования Мошковой А.Н. (2011) было показано, что при ГПК в течение 28 суток формируется устойчивое состояние адаптации к гипоксии. В связи с этим актуальной задачей является изучение молекулярных механизмов формирования адаптивных реакций при долгосрочных режимах тренировок.

Эксперименты проводились на белых беспородных крысах-самцах массой 150-180 г. Гипоксическое preconditioning осуществляли с помощью 28-кратных гипобарических тренировок по 60 минут в барокамере при 310 мм рт. ст. Определяли интенсивность процессов свободнорадикального окисления (СРО), каталитическую активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), нейрональной енолазы (НСЕ), а также концентрацию глюкозы и лактата в ткани мозга и крови. Результаты обрабатывали с помощью программы BIOSTAT.

Установлено, что острая гипоксия приводит к активации окислительных процессов в мозге и крови (увеличение содержания глюкозы соответственно в 1.3-2 раза, лактата в 2.5-3 раза, повышение общей активности ЛДГ на 28-21%, нейроспецифической енолазы в крови на 65%). При 28-дневном режиме гипобарического preconditioning происходит ремоделирование метаболических процессов и активность окислительных реакций восстанавливается до уровня интактных животных. При последующей проверке устойчивости тренированных крыс к гипоксии происходит снижение концентрации глюкозы в мозге и крови относительно значений контрольной группы на гипоксию на 6,4 и 43%, общей активности ЛДГ на 11,9 и 14,6%, уровень НСЕ в сыворотке крови снижается на 24%. Активность процессов СРО в мозге и крови тренированных животных находились в пределах нормы.

Таким образом, метаболический ответ мозга на острую гипоксию обусловлен подготовленностью ткани в результате предварительных долгосрочных тренировок животных. Полученные экспериментальные данные показывают положительное влияние долгосрочной тренировки на энергетические процессы в головном мозге и организме животных в целом в условиях гипоксии.

МЕХАНИЗМЫ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ УФ-СВЕТА И АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА**Human lymphocytes apoptosis mechanisms in condition of UV-light and reactive oxygen species influences****Наквасина М.А., Артюхов В.Г., Трубицына М.С., Лидохова О.В.**

Воронежский государственный университет, 394006, Воронеж, Университетская пл., 1
Тел.: +7 (473)220-89-8; факс+7 (473)220-83-08; e-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Изучены изменения структурного состояния ДНК, уровня экспрессии мембранного Fas-рецептора, функциональной активности каспазы-3, концентрации Ca^{2+} , белков p53 и цитохрома с лимфоцитарных клеток человека в динамике развития апоптоза, индуцированного воздействием УФ-света (240-390 нм) в дозах 151, 1510, 3020 Дж/м² и активных форм кислорода (супероксидного анион-радикала, пероксида водорода, гидроксильного радикала, синглетного кислорода).

Установлено, что УФ-свет и активные формы кислорода индуцируют фрагментацию ДНК лимфоцитов после 20 ч инкубации модифицированных клеток. Показано, что в течение 1-5 ч после воздействия УФ-света и АФК на лимфоциты наблюдается повышение уровня экспрессии мембранных Fas-рецепторов смерти по сравнению с интактными клетками. Обнаружено увеличение функциональной активности каспазы-3 лимфоцитов через 4 ч после генерации синглетного кислорода, гидроксильного радикала и добавления пероксида водорода, а также через 8 и 24 и 6 и 8 ч после УФ-облучения клеток соответственно в дозах 151 и 1510 Дж/м². С использованием метода ДНК-комет выявлено, что повреждения ДНК (однонитевые разрывы) появляются сразу после УФ-облучения лимфоцитов в дозах 1510 и 3020 Дж/м² и добавления пероксида водорода в концентрации 10⁻⁶ моль/л (кометы типа С1) и достигают максимума через 6 ч после модификации клеток (кометы типов С2 и С3). Установлено, что через 6 ч после воздействия пероксида водорода и УФ-света в дозах 1510 и 3020 Дж/м² на лимфоциты происходит повышение уровня p53 в исследуемых клетках. Обнаружено, что повышение уровня кальция в цитозоле лимфоцитов, обработанных пероксидом водорода, обусловлено выходом Ca^{2+} из внутриклеточных депо в результате активации компонентов фосфоинозитидного механизма передачи информации в клетку. Выдвинуто представление о взаимосвязи между изменением уровня кальция и инициацией программированной клеточной гибели лимфоцитов человека в условиях воздействия пероксида водорода. Сделано заключение о ведущей роли рецепторопосредованного (Fas-зависимого) каспазного и p53-зависимого путей в реализации апоптоза лимфоцитов, индуцированного воздействием УФ-света в дозах 151 и 1510 Дж/м² и пероксида водорода (10⁻⁶ моль/л). Предложена схема возможных внутриклеточных событий, приводящих к апоптотической гибели лимфоцитов после их УФ-облучения.

**СЕЛЕКТИВНЫЕ ДАЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И ОПТИМАЛЬНАЯ
“САМОСБОРКА” МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР****Selective long-range interactions and the optimal “self-assembly” of
macromolecular structures****В.А. Намиот¹, А.В. Батыновский², И.В. Филатов³, В.Г. Туманян³, Н.Г. Есипова³**

¹ – Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Институт ядерной физики, 119992, Москва, Воробьевы горы, 1; e-mail: vnamiot@gmail.com; ² – Институт биофизики клетки и клеточной инженерии НАН Беларуси, 220072, Минск, ул. Академическая, 27; ³ – Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32;

Анализ механизмов процессов структурообразования в макромолекулах (в частности, в белках) последние пятьдесят лет является одной из ключевых проблем молекулярной биофизики. Хорошо известно, что время, требуемое для образования очень многих существующих структур, вычисленное в рамках гипотезы, что имеет место чисто статистический перебор всевозможных конформаций, оказывается неприемлемо большим. Поэтому разумно предположить, что гипотеза о чисто статистическом переборе конформаций неверна, и существует некий специфический механизм структурообразования, позволяющий избежать такого случайного перебора. Такой механизм должен работать уже на той стадии образования структуры, пока расстояния между составляющими её элементами (в случае белка в качестве структурообразующих элементов выступают участки аминокислотных последовательностей) существенно больше размеров этих элементов. Это необходимое условие для того, чтобы такие элементы могли бы достаточно свободно перемещаться друг относительно друга, а без этого просто невозможно, даже в принципе, обеспечить возможность поиска правильной конформации. В тоже время, для того, чтобы осуществлять правильную сборку, нужно, чтобы эти элементы достаточно хорошо распознавали бы один другого на таких относительно больших по сравнению с ними самими расстояниях.

Нами [1,2] было показано существование такого достаточно селективного и в тоже время дальнедействующего взаимодействия между молекулами или же между участками этих молекул. Оно имеет место в тех случаях, когда один из размеров (в частности, длина взаимодействующего участка молекулярной цепочки) больше расстояния между этими участками, в то время как другой размер (например, “диаметр” этой цепочки) – существенно меньше. В случае взаимодействия электростатической природы, для участков цепочек, обладающих спиральной симметрией, были получены асимптотические формулы для потенциалов взаимодействия и исследованы их свойства. Было показано (в том числе и с помощью статистических исследований, сделанных на основе анализа материалов, имеющихся в банках данных белков), что такие взаимодействия могут способствовать оптимальной “самосборке” макромолекулярных структур.

Работа поддержана грантом РФФИ № 12-04-90051-Бел_а и договором № Б12Р -209.

1. Namiot V.A., Batyanyovskiy A.V., Filatov I.V., Tumanyan V.G., Esipova N.G. / Phys. Lett. A, 2011, №375 p. 2911-2915.

2. Намиот В.А., Батыновский А.В. Филатов И.В., Туманян В.Г., Есипова Н.Г. / Биофизика, 2011, с. 594-601.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АНИОНЫ [МОН] - В PH ЗАВИСИМЫХ РЕДОКС ПРОТОМОДЕЛЯХ: РАЗДЕЛЕНИЕ ЗАРЯДОВ И ТРАНСПОРТ ЭЛЕКТРОНА**Molecular anions [MOH] - in pH-dependent biomimetic redox protomodels: charge separation and electron transport****Неделина О.С., Бржевская О.Н. Зубков А.С., Дегтярев Е.Н.**

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, 119991, Москва, ул. Косыгина,4

В фотохимических протомоделях одноэлектронного переноса между дистанционно разделенными донором D и акцептором A, закрепленными в сетке водородных связей OH-буферной системы, выявлен ранее не учитываемый (немой) первичный электрон-аддукт фотоинжектированного электрона – короткоживущий молекулярный анион [MO-H⁻], вступление которого в одноэлектронную цепь задается легко регулируемой кислотностью связанного электрофильного протона группы OH.

pH зависимый триггерный захват электрона кислотным (легко ионизирующимся) связанным протоном обнаруживается по появлению спектра ЭПР атома водорода в результате характерной фрагментации молекулярного аниона $e^- + MO-H \rightarrow [MO-H]^- \rightarrow MO^- + H$ в реакции диссоциативного захвата низкоэнергетического электрона (ДЗЭ) оксикислотами $AO^{\delta-} - H^{\delta+}$ в области наибольшей кислотности, т.е. электрофильности связанного протона.

Таким образом сформулирован кислотно-основной механизм межмолекулярного переноса низкоэнергетического электрона ДОНОР \rightarrow связанный кислый протон $H^+ \rightarrow [MO-H]^- \rightarrow$ АКЦЕПТОР, дополняющий толкование протон-сопряженного переноса электрона $D \rightarrow [H^+] \rightarrow A$ (proton-coupled electron transport PCET).

Предлагаемый механизм вводит в поле зрения переноса электрона между дистанционно разделенными донором и акцептором триггерную и направляющую функции короткоживущих молекулярных анионов [MO-H⁻], выполняющих роль одноэлектронных ретрансляторов в сценариях кислотного катализа и образования свободных радикалов в гомогенных и гетерогенных (в том числе мембранных) средах в химических и биологических системах

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИЗИНОВЫХ ДЕНДРИМЕРОВ С ФРАГМЕНТАМИ АМИЛОИДНЫХ ПЕПТИДОВ**Modeling of interactions between lysine dendrimers and fragments of amyloid peptides****Неелов И.М. 1, Ильях М.Ю 2, Округин Б.М. 2**¹ – Институт высокомолекулярных соединений РАН,
199004, Санкт-Петербург, Большой 31,² – Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
Тел.: +7(812)328-56-01; факс: +7(812)328-68-69; e-mail: i.neelov@mail.ru

Недавно было показано, что заряженные дендримеры (РАМАМ, РР1 и др.) могут *in vitro* препятствовать образованию амилоидных фибрилл из фрагментов амилоидного пептида (Ab1-28) или даже полностью разрушать уже существующие зрелые фибриллы [1].

В данной работе проведено исследование взаимодействия лизиновых дендримеров с короткими фрагментами амилоидных пептидов Ab16-21, Ab17-21 и Ab17-22 с помощью методов математического моделирования. Для моделирования были использованы метод молекулярной динамики, полноатомная модель с силовым полем Amber99-SB-ildn и пакет моделирования Gromacs. Рассматривались системы, состоящие из одной молекулы дендримера и восьми молекул пептидов, помещенные в ячейку с водой с периодическими граничными условиями при температуре $T = 300\text{K}$. Все концевые группы дендримера (NH_3^+) были положительно заряжены. Контрионы (Cl^-) добавлялись, чтобы обеспечить электронейтральность системы. Расчеты проводились на суперкомпьютерном комплексе МГУ «Чебышев» и «Ломоносов».

Как было показано ранее [1], разрушение амилоидных фибрилл с помощью дендримеров сильно зависит от pH в системе (которое, в частности, приводит к изменению заряда пептидов). Особенно эффективно разрушение идет при $\text{pH}=5$, когда суммарный заряд каждого пептида равен -1 . В нашем моделировании мы рассмотрели три случая, когда заряд пептида равен -1 , 0 и $+1$. Во всех трех случаях фрагменты фибрилл довольно устойчивы, однако разрушение фибрилл дендримером идет только при отрицательном заряде пептидов.

Основным результатом этой части моделирования является то, что в последнем случае сильные электростатические взаимодействия дендримеров как со свободными олигопептидами, так и с пептидами входящими в стопку, моделирующую фрагмент протофибриллы, приводят к быстрому необратимому связыванию олигопептидов дендримером. Таким образом связывания пептидов дендримером за счет электростатических взаимодействий, по-видимому, является ответственным за разрушению фибрилл, наблюдавшееся в эксперименте [1].

Работа выполнена при поддержке РФФИ 10-04-01156-а и ОХМНЗ РАН.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИЗИНОВЫХ ДЕНДРИМЕРОВ РАЗНЫХ ПОКОЛЕНИЙ
МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ И ЯМР****Investigation of lysine dendrimers of different generations by molecular
dynamics and NMR****Неелов И.М. 1, Фалькович С.Г. 1, Маркелов Д.А. 1,2, Ильяш М.Ю. 2, Даринский А.А. 1**¹ – Институт высокомолекулярных соединений РАН,
199004, Санкт-Петербург, Большой 31² – Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
ТЕЛ.: +7(812)328-56-01; ФАКС: +7(812)328-68-69; E-MAIL: I.NEELOV@MAIL.RU

Большинство регулярных дендримеров с симметричным ветвлением имеет одинаковые спейсоры, исходящими из каждой точки ветвления. В лизиновых дендримерах один из двух спейсоров имеет длину существенно большую, чем другой (7 и 3 валентных связей, соответственно). Поэтому внутренняя структура лизиновых дендримеров может существенно отличаться от структуры обычных дендримеров (ПАМАМ, ППИ и других).

В данной работе лизиновые дендримеры разных поколений были исследованы методами компьютерного моделирования и ЯМР. Для моделирования были использованы метод молекулярной динамики, полноатомная модель с силовым полем Amber99-SB-ildn и пакет моделирования Gromacs. Рассматривались системы, состоящие из одной молекулы дендримера, помещенные в ячейку с водой с периодическими граничными условиями при температуре $T = 300\text{K}$. Все концевые группы дендримера (NH_3^+) были положительно заряжены. Контрионы (Cl^-) добавлялись, чтобы обеспечить электронеutralность системы. Расчеты проводились на суперкомпьютерном комплексе МГУ «Чебышев» и «Ломоносов».

Для отдельных дендримеров поколения $G=1-5$ мы исследовали структуру и динамические свойства. В частности, была рассчитана зависимости радиуса инерции R_g дендримеров от молекулярного веса M и анизотропия формы дендримеров. Было получено, что размеры дендримера в рассмотренном интервале M подчиняются степенной зависимости $R_g \sim M^{0.34}$, а анизотропия уменьшается с ростом M . Радиальные функции распределения плотности для всего дендримера и для концевых групп отличается от аналогичных зависимостей для дендримеров с симметричными спейсорами. Все спейсоры в лизиновом дендримере оказываются довольно сильно растянутыми (до 0.9 от контурной длин), а углы между короткими спейсорами довольно жесткими. В целом дендример оказывается более жестким, чем ПАМАМ. Характерные времена локальной ориентационной релаксации для различных групп дендримера были получены из моделирования и ЯМР. Было показано, что в обоих случаях времена для внутренних групп оказываются в несколько раз большими, чем для внешних и хорошо согласуются между собой. Работа выполнена при поддержке РФФИ 10-04-01156-а и ОХМНЗ РАН.

АНАЛИЗ ИНФОРМАЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ – НОВЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВ.

Analysis of informational structure is a new method for investigation of the structural organization of proteins

Некрасов А.Н., Зинченко А.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
Тел: +7(495) 330667; факс: +7(495) 335-71-03; e-mail: alexei_nekrasov@mail.ru

В работе рассматривается новый метод исследования структурной организации белков – метод анализа информационной структуры (АНИС метод) [1]. Используя новое представление об элементарном структурном блоке белков, названном нами «информационной единицей», разработан математический аппарат [1-2], позволяющий выявлять в первичной структуре белков иерархически организованные элементы различных рангов – Элементы Информационной Структуры (ЭЛИС). АНИС метод позволяет исследовать структурную организацию белков только на основе данных об их аминокислотной последовательности. Показано, что в белках, обладающих доменной структурой, элементам информационной структуры высшего ранга соответствуют структурные домены [1]. Выявлена корреляция между ЭЛИС высшего ранга и структурой каталитических центров ферментов [3]. Предложена методология получения новых рекомбинантных белков, основанная на использовании АНИС метода, и приведены примеры ее использования [4-6]. Приведены примеры применения АНИС метода для изучения механизмов функционирования ряда белков.

1. Nekrasov A.N. / J. Biomol. Struct. Dyn., 2004. V.21(5). P. 615-624. (anis.ibch.ru/trees)
2. Козырев С.В., Козьмин Ю.П. / Материалы II Международной научно-практической конференции [Электронный ресурс] / УО Гр. ун-т им. Я.Купалы. Гродно, 2010. 1 электр. компакт диск (CD-R). 995 с. Рус. – Деп. в ГУ БелИСА 24.05.2010 г., № Д201019. Гродно
3. Nekrasov A.N., Zinchenko A.A. / J. Biomol. Struct. Dyn., 2008. V.25(5). P. 553-562.
4. Nekrasov A.N., Radchenko V.V. / J. Biomol. Struct. Dyn., 2007. V.24(5). P.455-462.
5. Некрасов А.Н., Петровская Л.Е. и др. / Биохимия, 2009. Т.74. С. 493-500.
6. Шингарова Л.Н., Петровская Л.Е. и др. / Биоорганическая химия, 2010. Т.36(3). С. 327-36.

**КИНЕТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЕЙ
ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ****Kinetic modelling of Glutamate metabolic pathways in Mammalia****Н.А. Некрасов¹, Е.В. Машковцева², Я. Р. Нарциссов²**¹ – НИЯУ МИФИ, 115409, г. Москва, Каширское ш., 31;² – НИИ Цитохимии и молекулярной фармакологии, 115404, г. Москва, ул. 6-я
Радиальная, д. 24, стр. 14;

Тел./факс: +7 (495) 327-49-87; e-mail: icmph@yandex.ru

Глутаминовая кислота – одна из самых распространенных аминокислот в организме человека, является условно незаменимой. В стрессовых ситуациях потребность в ней обостряется, что может привести к истощению ее запасов. Глутамат является возбуждающим нейромедиатором, его эксайтотоксичность широко известна в неврологии. Эта аминокислота необходима для синтеза различных соединений, а также выполняет другие функции.

В данной работе рассматривается участок метаболической карты, включающий ряд превращений глутамата. Катализируемые реакции непосредственно сопряжены с одним из субстратов Цикла Кребса. Вместе с тем, связь глутамата с синтезом глутатиона, пуриновых и пиримидиновых оснований, позволяет предположить возможную регуляторную роль данного участка метаболических путей.

Кинетическое моделирование метаболических путей осуществляется непосредственным формированием математической модели, описывающей зависимость концентраций метаболитов от характеристик ферментов, присутствующих в определенном компартменте. В данном случае кинетический подход позволит провести приближенную количественную оценку регуляторной роли выбранного фрагмента.

Выделенный цикл преобразования глутамата и глутамина, состоящий из четырех реакций, был изучен по литературным источникам. Анализ имеющихся в них кинетических параметров выявил недостаток информации для полного кинетического описания системы в рамках одного вида организмов, что может быть обусловлено большим количеством участвующих метаболитов (реакции типа Ter-Ter). Параметризация рассматриваемых реакций позволяет перейти к более общему моделированию метаболической схемы, что расширяет возможности получения результатов по управляющим коэффициентам и зависимостям синтеза аминокислот в различных условиях. Для повышения достоверности предсказаний полученная модель может быть расширена путем включения в нее смежных участков метаболической карты.

**МОДЕЛИРОВАНИЕ СВОЙСТВ БИОМОЛЕКУЛ ГИБРИДНЫМИ МЕТОДАМИ
КВАНТОВОЙ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ**

**Modeling properties of biomolecules by using hybrid methods of quantum and
molecular dynamics**

Немухин А.В.^{1,2}, Григоренко Б.Л.¹

¹ – Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские Горы, 1/3.

²- Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН,
19334, Москва, ул. Косыгина,4

Тел.: +7(495)9391096; факс: +7(495)93902-83; e-mail: anemukhin@yahoo.com

Применение гибридных подходов к расчету энергии биомолекулярных систем, объединяющих классические силовые поля и уравнения квантовой теории, необходимо при описании разрывов и образования химических связей, а также при описании систем в электронно-возбужденных состояниях. В докладе рассматриваются современные варианты квантовой механики-молекулярной механики (КМ/ММ), соответствующие программные реализации вычислительных алгоритмов и применения в конкретных задачах. Основное внимание уделено моделированию химических превращений в активных центрах ферментов и анализу процессов в флуоресцентных белках.

**ПОВЕДЕНИЕ ПРОВОДЯЩИХ ПОР В ЧИСТО ЛИПИДНЫХ БЛМ ИЗ ДПФХ ПРИ
ТЕМПЕРАТУРНОМ ФАЗОВОМ ПЕРЕХОДЕ ЛИПИДА ИЗ ЖКС В ГЕЛЬ****Conducting pores' behavior in pure lipid BLM of DPPC at the phase- transition
temperature****Немченко О.Ю., Аносов А.А., Норик В.П., Смирнова Е.Ю., Антонов В.Ф.**Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
Тел.: +7(495) 622-96-32, rektorat@mma.ru

При температурных фазовых переходах увеличивается электрическая проводимость через липидный бислой. В работах Антонова В.Ф. и сотрудников [1] показано, что это увеличение происходит за счет появления отдельных пор, по ионной проводимости напоминающих свойства белковых каналаформеров.

В данном исследовании был проведен временной анализ флуктуаций тока при фиксации напряжения для БЛМ из 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолина (ДПФХ) в растворе LiCl (1 М) в области фазового перехода липида.

Температура ячейки с БЛМ специально не поддерживалась при выбранной температуре, а понижалась, что создавало условия достаточно быстрого прохождения состояния фазовой неустойчивости липида, составляющего БЛМ.

Обнаружено, что распределения во времени длительностей открытого и закрытого (до следующего открытия) состояний липидной поры не подчиняются экспоненциальному распределению и имеют явный максимум. Оказалось, что полученные экспериментальные распределения времени хорошо описываются распределением Эрланга.

Такие временные распределения характерны для временных интервалов, являющихся в свою очередь суммой k интервалов между некоторыми случайными событиями. Причем, каждый из k интервалов распределен по экспоненциальному закону с одним и тем же средним значением q .

Полученные данные на БЛМ из ДПФХ с добавлением различных полиэтиленгликолей (ПЭГ 300, ПЭГ600, ПЭГ 6000 и др.) и глицерина в омывающие мембрану растворы не меняют закон распределения, лишь изменяют его характеристики.

Показано, что времена открытого состояния пор равны $0,16 \pm 0,08$ с в чистом LiCl и варьируют от $0,47 \pm 0,05$ до $0,63 \pm 0,14$ с в растворах с добавками (параметр k оценивается единицами и десятками, параметр q оценивается $0,04$ и $0,005-0,03$ с, соответственно). Для среднего времени закрытого состояния полученные значения около $2,0$ с в чистом растворе и $18,0$ до $24,0$ с в растворе с добавками.

Обсуждаемые длительности интервалов лежат в диапазоне времен, характерных для достаточно крупных образований. Объяснение происходящих процессов может быть связано с процессом «вымораживания» создавшейся в стадии ЖКС поры и частичного плавления поровой выстилки на этапе фазового перехода[2].

1. Antonov V.F. et al., / Nature (London) 283, 585 (1980)
2. Gallager J. et al., / Physical Review E 81, 061925 (2010)

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПАРАМЕТРОВ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ
СИГНАЛОВ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ (НА ПРИМЕРЕ ПРОРОСТКОВ ТЫКВЫ *CUCURBITA
PEPO L.*), ИНДУЦИРОВАННЫХ МЕХАНИЧЕСКИМ И ХОЛОДОВЫМ СТИМУЛАМИ
НЕПОВРЕЖДАЮЩЕЙ ИНТЕНСИВНОСТИ**

**An analysis of parameters of electrical signals in higher plants, induced by
mechanical and cold stimuli**

Неруш В.Н., Мысягин С.А.

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23

Тел.: (831)465-61-12. Факс: (831)465-97-58. E-mail: panzerblitz@mail.ru

Известно, что электрические сигналы растений могут участвовать в восприятии внешних воздействий клетками растительного организма, вызывая в конечном итоге временное повышение устойчивости растения к действию неблагоприятных факторов. Однако до сих пор не установлено, несут ли электрические сигналы высших растений информацию о природе вызвавшего их стимула. Основной теоретической возможностью для передачи информации о природе стимула может быть зависимость параметров электрических сигналов от модальности индуцирующего их раздражителя. В связи с этим целью данной работы стал поиск общих и специфических черт местных и распространяющихся электрических реакций высших растений, индуцированных механическим и холодным стимулами неповреждающей интенсивности.

Эксперименты проводили на двухнедельных проростках тыквы (*Cucurbita pepo L.*), выращенных гидропонным способом. Использовали дозированное холодное и механическое раздражение стебля. Электрические ответы регистрировали внеклеточно, используя четырехканальный усилитель с записью результатов на персональный компьютер.

Был проведен сравнительный анализ параметров механо- и холодоиндуцированных рецепторных потенциалов (РП), а также надпороговых местных электрических реакций. Было показано, что амплитуды механо- и холодоиндуцированных РП практически не отличались. Также достоверно не отличались амплитуды механо- и холодоиндуцированных надпороговых ответов. Однако, скорость деполяризации механоиндуцированных электрических реакций была существенно выше, чем холодоиндуцированных, и составляла в случае РП 14.8 ± 1.0 мВ/с и 7.5 ± 0.5 мВ/с, а в случае надпороговых ответов 34.4 ± 2.7 мВ/с и 14.9 ± 1.4 мВ/с соответственно. Далее был проведен анализ амплитуды и скорости распространения механо- и холодоиндуцированных потенциалов действия (ПД). На расстоянии 3 см от места нанесения стимула амплитуда механо- и холодоиндуцированных ПД практически не отличалась и составляла 47.5 ± 5.6 и 50 ± 5.3 мВ соответственно. Однако, по мере удаления от зоны раздражения амплитуда холодоиндуцированных электрических реакций резко убывала. На расстоянии 9 см электрические реакции, вызванные охлаждением, не регистрировались. В то же время, амплитуда механоиндуцированных ПД на исследуемом участке оставалась практически неизменной. Скорость распространения механоиндуцированных ПД составляла 1.3 ± 0.3 см/с, что существенно выше такой для холодоиндуцированных ответов, составлявшей 0.52 ± 0.1 см/с.

В целом, показанные различия параметров электрических реакций могут теоретически служить основой для передачи информации о природе внешнего стимула, однако, не исключено, что при преобразовании электрического сигнала в функциональный ответ специфика реакций теряется и в конечном итоге может происходить повышение общей устойчивости системы, не зависящее от характера внешнего воздействия..

**СТРОЕНИЕ ДВОЙНОГО ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО СЛОЯ И АДсорбЦИЯ
КАТИОНОВ МЕТАЛЛОВ НА ПОВЕРХНОСТИ БИСЛОЙНЫХ ФОСФОЛИПИДНЫХ
МЕМБРАН В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКЕ**

**Structure of double electric layer and adsorption of metal cations on the surface of
bilayer phospholipid membranes in molecular dynamics**

Нестеренко А.М.^{1,2}, Красильников П.М.², Ермаков Ю.А.³

¹ – Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белоозерского МГУ, 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр 40;

² – Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра биофизики, 119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 24;

³ – Учреждение Российской академии наук Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, 119991 Москва, Ленинский проспект, д. 31
Тел.: +7 (919) 726-08-68; факс: +7 (095) 939-0338; email: comconadin@gmail.com

Разработаны новые молекулярно-динамические топологии фосфолипидов DPPC и DPPS в полноатомном силовом поле OPLS, которые позволили исследовать структурные характеристики жидко-кристаллического и гель-состояния бислоя в отсутствии ионов и при наличии адсорбированных на его поверхности различных катионов, таких как Na⁺, Be²⁺, K⁺, тетраметиламмоний (ТМА), существенно различающихся по эффективности связывания. Показано, что присутствие катионов не влияет на количество молекул воды, образующих водородные связи, однако катионы Be²⁺ удерживает частично гидратную воду в бислое при его замерзании [1]. Подробно изучено распределение электрического поля и ионов вблизи нейтрального и заряженного липидного бислоя. Показано, что вклад молекул липида, воды и ионов в электрический потенциал в значительной степени взаимно компенсируется и оказывается близким к нулю в той области, где расположена диффузная часть двойного электрического слоя. Распределение ионов вблизи поверхности определяется не только энергией электростатического взаимодействия иона с окружением, но также и энергией взаимодействия его гидратной оболочки. Положение «электрической» границы бислоя выбрано нами на удалении 10 Å от Са атомов глицеринового основания полярных групп фосфолипидов в системе DPPC+BeCl₂, поскольку в этой точке достигаются экстремальные значения концентрации Cl⁻ и параметра порядка воды. Это же положение границы раздела было использовано при анализе потенциала средней силы ионов в системе DPPC/DPPS. Показано, что потенциал средней силы противоионов на этой границе дает хорошую оценку поверхностного потенциала, которое может быть использовано для сравнения с экспериментальными данными. Найденные из МД значения поверхностного потенциала и плотности заряда в этой системе с различной концентрацией электролита и с содержанием DPPS в смеси 20, 40 и 60% хорошо согласуются с модели Гуи-Чепмена-Штерна при использовании параметров адсорбции ионов, близких к экспериментальным [2]. Коэффициенты адсорбции, найденные для всех исследованных катионов, находятся в хорошем качественном согласии с экспериментом. Предложена молекулярная модель центров связывания, различная для катионов щелочных металлов, бериллия и ТМА.

1. Нестеренко А. М., Красильников П. М., Ермаков Ю. А. / Биологические Мембраны, 2011. Т. 28(5), С. 397-407.

2. Нестеренко А.М., Ермаков Ю.А. 2012. / Биологические Мембраны, в печати.

МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕХАНОХИМИЧЕСКОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ ДНК ПОД ДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАЗВУКА

**Нечипуренко Д.Ю.¹, Полозов Р.В.², Гроховский С.Л.³, Ильичева И.А.³
и Нечипуренко Ю.Д.^{1,3},**

¹ – Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Физический факультет, Россия, 119899, Москва, Воробьевы Горы, ne4ipur@gmail.com

² – Институт теоретической и экспериментальной биофизики, Россия, 142290, Московская область, Пушкино, polrob@mail.ru

³ – Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32, +7 499 135 10 92, nech99@mail.ru

Анализ электрофоретических картин расщепления ДНК под действием ультразвука свидетельствует о механохимической природе наблюдаемого расщепления. Характерной особенностью профилей ультразвукового расщепления является увеличение степени расщепления фосфодиэфирных связей в центральной части молекул ДНК, зависимость степени расщепления от последовательности нуклеотидов, вязкости раствора, от длины облучаемых фрагментов ДНК и температуры. Для описания экспериментальных профилей ультразвукового расщепления предложен подход, основанный на общепринятой модели деградации полимеров под действием акустической кавитации. Данный подход включает модель, описывающую динамику схлопывания кавитационного пузырька, механическую модель фрагмента ДНК, а также кинетическую модель гидролиза фосфодиэфирных связей. Результаты моделирования показывают, что при схлопывании кавитационных пузырьков в наших экспериментах могут возникать градиенты скорости течения жидкости, превышающие 108 с⁻¹. Взаимодействие фрагмента ДНК с высокоградиентным течением жидкости в рамках предложенной модели приводит к возникновению импульсных сил растяжения, превышающих 10⁻⁹ Н, что по порядку величины соответствует теоретическому пределу прочности фосфодиэфирной связи. Полученные теоретические профили ультразвукового расщепления ДНК находятся в качественном соответствии с экспериментальными данными.

1. Гроховский С.Л., Ильичева И.А., Нечипуренко Д.Ю., Панченко Л.А., Полозов Р.В., Нечипуренко Ю.Д. / Биофизика, 2008. Т.53. С. 417-425.

2. Il'icheva I. A., Nechipurenko D. Yu., Grokhovsky S. L. Ultrasonic cleavage of nicked DNA. J. Biomol. Struct. Dyn., 2009. 27:391-397.

3. Sergei L. Grokhovsky, Irina A. Il'icheva, Dmitry Yu. Nechipurenko, Michail V. Golovkin, Larisa A. Panchenko, Robert V. Polozov and Yury D. Nechipurenko / Biophysical Journal, 2011. V.100. N1. P.117-125.

4. Sergei L. Grokhovsky, Irina Il'icheva¹, Dmitry Nechipurenko, Michail Golovkin, Georgy Taranov, Larisa Panchenko, Robert Polozov and Yury Nechipurenko / Gel electrophoresis – principles and bases. Dr. Sameh Magdeldin (Ed.), InTech, 2012.

БИОФИЗИКА ДНК: ПОДХОДЫ К ФИЗИЧЕСКОМУ КАРТИРОВАНИЮ ГЕНОМА**Biophysics of DNA: the approach to the physical mapping of genome**

Нечипуренко Ю.Д., Нечипуренко Д.Ю.¹, Ильичева И.А., Головкин М.В., Панченко Л.А.², Полозов Р.В.³, Гроховский С.Л.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32, +7 499 135 10 92, nech99@mail.ru; 1 – Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Физический факультет, Россия, 119899, Москва, Воробьевы Горы, ne4ipur@gmail.com; 2 – Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Россия, 119899, Москва, Воробьевы Горы, larandr@mail.ru; 3 – Институт теоретической и экспериментальной биофизики, Россия, 142290, Московская область, Пущино, polrob@mail.ru

Молекула ДНК проявляет свои свойства как во взаимодействии с малыми молекулами и белками, так и при воздействии разного рода физических факторов. Ранее нами был предложен и развит метод исследования ДНК, основанный на расщеплении сахарофосфатного остова молекул ДНК в водных растворах под действием ультразвука. Экспериментальные данные, полученные для выборки более чем в 20 тысяч нуклеотидов, позволили установить относительные вероятности расщепления сахарофосфатных связей для всех возможных 256 тетра-нуклеотидов. Эти вероятности значительно различаются, что свидетельствует о гетерогенности локальных структурно-динамических характеристик ДНК. На наличие подобной гетерогенности указывают и данные о химическом расщеплении ДНК под действием разного рода агентов, фермента ДНКазы I, а также лазерного излучения длиной волны 193 нм. Анализ вариаций структурно-динамических свойств молекулы ДНК при изменении локальной последовательности нуклеотидов может служить ключом к физическому картированию генома – то есть выявлению маркеров, позволяющих регуляторным белкам и факторам экспрессии узнавать участки генома. В роли таких маркеров могут выступать участки ДНК, имеющие аномальные структурно-динамические характеристики. Данные о расщеплении ДНК лазерным излучением позволяют также сделать выводы о том, что места такого расщепления связаны с местами предпочтительного размещения на ДНК гистоновых октамеров.

ФОРМИРОВАНИЕ ФИБРИЛЛ КОЛЛАГЕНА В ТЕМПЕРАТУРНОЙ ОБЛАСТИ РАЗВОРАЧИВАНИЯ ТРОЙНОЙ СПИРАЛИ**Collagen fibril formation in the temperature range of triple helix unfolding****Николаева Т.И.,¹ Кузнецова С.М.,¹ Рогачевский В.В.²**¹ – Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, г. Пущино Московской обл., ул. Институтская, 3² – Институт биофизики клетки РАН,
142290, г. Пущино Московской обл., ул. Институтская, 3
Тел.: 8-(4967)739496, факс: 8-(4967)330553, e-mail: tomivnik@yandex.ru

Температура влияет на конформационную подвижность молекул коллагена и таким образом влияет на самосборку коллагена в фибриллы. Гетерогенность молекулы коллагена, содержащей стабильные и лабильные участки тройной спирали, определяет жесткость и гибкость коллагеновых фибрилл. Предполагают, что образование нативных фибрилл коллагена *in vitro* начинается после микроразворачивания локальных участков на концах тройной спирали, имеющих пониженную стабильность. Изменением температуры можно регулировать скорость образования фибрилл и влиять на их морфологию. Однако зависимость фибриллообразования коллагена от температуры еще недостаточно используется при создании коллагеновых биоматериалов. Трудность в определении физиологической температуры для фибриллообразования коллагена ограничена применяемыми подходами и методами. Целью данной работы было определить оптимальную температуру фибриллообразования исследуемого коллагена при температурах 28–39 °С, которые влияют на микроразворачивания в тройной спирали.

Коллаген был получен из кожи поросят двумя методами: предварительная щелочно-солевая обработка ткани с последующей экстракцией 0,5 М уксусной кислотой (первый метод) и прямая экстракция 0,5 М уксусной кислотой (второй метод). Очистку от белковых примесей и агрегатов коллагена проводили NaCl и этанолом. Был получен гомогенный образец в фосфатно-солевом буфере, pH 7.0, I=0.145M, C=1.5 мг/мл. Формирование фибрилл и анализ их структуры исследовали методами спектрофотометрии, сканирующей микрокалориметрии и электронной микроскопии.

Для фибрилл, образованных из коллагена, полученного первым методом, оптимальная температура фибриллообразования, определенная как точка перегиба значений полумаксимальной мутности и микроразворачивания молекулы коллагена, соответствующая температуре первого перехода на кривой теплопоглощения, равна 35 °С. Фибриллы, сформированные из коллагена, полученного вторым методом, имеют разную степень организации в температурной области 28–39 °С. Электронно-микроскопические исследования показали, что для образования фибрилл из этого коллагена оптимальной является температура 36,5 °С. Процентное распределение диаметров фибрилл дает информацию о гомогенности фибрилл, образованных при фиксированной температуре. При температуре 36,5 °С формируется более однородная структура фибрилл по сравнению с фибриллами, образованными при температурах 34,5 °С и 38,5 °С. Фибриллы минимального диаметра (28 нм) образованы в фосфатно-солевом буфере при физиологических значениях pH, ионной силы и температуры 36,5 °С. В фибриллах, сформированных при T=34,5 °С, диаметр (41 нм) увеличен за счет иммобилизованной в фибриллы воды. В фибриллах, образованных при T=38,5 °С, кооперативное разворачивание тройной спирали коллагена приводит к повышению диаметра фибрилл (44 нм).

ВЛИЯНИЕ ЗАМЕН КОНСЕРВАТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ НА СТРУКТУРУ И СТАБИЛЬНОСТЬ ГОМОГЕКСАМЕРА БЕЛКА Hfq**Influence of conserved amino acid substitutions on the structure and stability of the homohexamer protein Hfq**

Никулин А. Д., Мурина В. Н., Мельник Б. С., Филимонов В. В., Никонов С. В.

Институт белка РАН, 114290, Московская обл., г. Пушкино, ул. Институтская, 4
Тел. +7(4967)318425, факс +7(4967)318435, e-mail: Nikulin@vega.protres.ru

Бактериальные белки Hfq относятся к семейству Sm-подобных белков (или LSm) (SCOP Superfamily b.38.1, CATH Homologous Superfamily: 2.30.30.100). Белки этого семейства характеризуются наличием Sm-фолда, содержащего консервативные аминокислотные мотивы Sm1 и Sm2. LSm белки имеют четвертичную структуру в виде тороидальных гексамеров (бактериальные белки Hfq) или гептамеров (архейные и эукариотические Lsm белки), однако есть примеры формирования LSm белками пентамеров и октамеров. В свою очередь, гексамеры/гептамеры могут формировать фибриллы, отличающиеся по морфологии и условиям образования для бактериальных и архейных белков.

Нами исследовано влияние замен консервативных аминокислотных остатков, образующие недоступные для растворителя водородные связи (Gln8, Asn28, Asp40, Tyr55 и His57), на структуру белка Hfq из *Pseudomonas aeruginosa*. Для этого были получены белки с заменами указанных остатков на аланин (для His57 также на аспарагин, треонин и фенилаланин), измерены кривые плавления при разных значениях pH, получены спектры КД при изменении температуры и добавления денатурантов, определены пространственные структуры для некоторых из них. В результате работы проведена оценка влияния полученных замен аминокислотных остатков на вторичную и пространственную структуру белка Hfq, получена новая форма фибриллоподобных частиц, ранее не наблюдавшаяся для LSm белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и фонда РФФИ.

**ЛАТЕРАЛИЗАЦИЯ ЭФФЕКТОВ ДЕЙСТВИЯ ПОВЫШЕННОГО ДАВЛЕНИЯ
КИСЛОРОДА НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ СИНАПТОСОМ МОЗГА
КРЫС В УСЛОВИЯХ ПОДАВЛЕНИЯ ПРОДУКЦИИ СУПЕРОКСИД АНИОНА И
ОКСИДА АЗОТА**

**Lateralized effects of hyperbaric oxygen on free radical processes in rat brain
synaptosomes under suppression of superoxide anion and nitric oxide production**

Новоселова Н.Ю.¹, Москвин А.Н.¹, Сапронов Н.С.², Рейхардт Б.А.²

¹ – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, 194223, Санкт-Петербург, пр. М. Тореза, 44; ² – Федеральное государственное бюджетное учреждение Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук, 197376, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, д. 12
Тел.: +7(812)552-93-44; факс: +7(812)552-30-12; e-mail:nina.novoselova@mail.ru

Для выяснения межполушарных аспектов цитотоксического действия высоких давлений кислорода, а также отдельных радикалов кислорода – супероксид аниона (O_2^-) и оксида азота (NO), изучали влияние гипербарического кислорода (3 ата, 5 ата, 30 мин) на перекисное окисление липидов (ПОЛ) синапсом полушарий мозга беспородных крыс-самцов при использовании и без применения супероксиддисмутазы (СОД) и ингибитора NO-синтазы (L-NAME). Установлено, что оксигенация 3 ата приводила к усилению ПОЛ избирательно в левом полушарии, в то время как повышение кислорода до 5 ата не вызывало изменений этого показателя ни в одном из полушарий по сравнению с нормой. Введение СОД (внутривенно в дозе 700 Ед/кг, непосредственно перед экспозицией) на фоне оксигенации 5 ата интенсифицировало ПОЛ исключительно в левом полушарии, а введение L-NAME (внутрибрюшинно в дозе 30 мг/кг, за 30 мин перед экспозицией) в аналогичных условиях активировало ПОЛ в правом полушарии и, напротив, ингибировало этот процесс в левом полушарии по сравнению с оксигенацией 5 ата. Полученные данные свидетельствуют о том, что кратковременная экспозиция давления кислорода 3 ата характеризовалась избирательной токсичностью в отношении левого полушария и, напротив, кратковременная экспозиция давления кислорода 5 ата не оказывала токсического эффекта в отношении ни одного из полушарий. Отсутствие активации ПОЛ при высоких давлениях кислорода было показано также ранее другими исследователями [1]. Известно, что O_2^- и NO являются регуляторами сосудистого тонуса – вазоконстриктором и вазодилатором соответственно. Подавление продукции O_2^- при оксигенации 5 ата и избирательная активация ПОЛ в левом полушарии свидетельствует о токсическом эффекте NO в отношении левого полушария. При этом показателем доминирования NO при введении СОД на фоне оксигенации 5 ата может являться увеличение мозгового кровотока, выявленное в условиях применения СОД при действии повышенного давления кислорода [2]. И напротив, подавление продукции NO при оксигенации 5 ата и связанное с этим ингибирование ПОЛ в левом полушарии с одновременным усилением этого процесса в правом полушарии свидетельствует о протекторном эффекте и, в то же время, о токсическом действии O_2^- соответственно в отношении левого и правого полушарий. В свою очередь показателем преобладания O_2^- при введении L-NAME в условиях оксигенации 5 ата может являться снижение мозгового кровотока, установленное при введении L-NAME на фоне действия повышенного давления кислорода [2].

ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ ПРОВОДИМОСТЬ ЧИСТО ЛИПИДНЫХ ПОР В БЛМ ИЗ ДПФХ И ДСФХ ПРИ ТЕМПЕРАТУРНОМ ФАЗОВОМ ПЕРЕХОДЕ ЛИПИДА ИЗ ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ В ГЕЛЬ.

Electrical conductance of pure lipid pores in the BLM of DPPC and DSPC at the temperature phase transition of the lipid from the liquid crystalline state to the gel one.

Норик В.П., Немченко О.Ю., Антонов В.Ф.

Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
Тел.: +7 (499) 367-18-72; e-mail: antonov.valery@gmail.com

Мягкая порация (soft perforation) БЛМ из фосфолипидов при температурном фазовом переходе липида зависит от длины молекулы липида, формирующего бислой [1]. Основной целью исследования было сравнительное изучение флуктуаций тока в условиях фиксации напряжения в области фазового перехода липида для БЛМ из основных мембранных липидов 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолина (ДПФХ) и 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолина (ДСФХ). Обнаружена зависимость средней проводимости одиночных липидных пор, возникающих при соответствующей температуре основного фазового перехода L^{α} - L^{β} от длины молекулы соответствующего фосфолипида. Показано, что для ДСФХ-БЛМ и ДПФХ-БЛМ проводимости пор равны 100 пикосименс и 800 пикосименс соответственно. В предположении цилиндрической поры радиусы пор для ДСФХ и ДПФХ были рассчитаны равными 0,34 нм и 0,95 нм соответственно. Поскольку стенки поры выстланы полярными головками молекул фосфолипидов с площадью 60 нм² в жидкокристаллическом состоянии, то можно оценить количество молекул фосфолипида участвующих в формировании трансмембранной поры. В предположении цилиндрической поры простой расчет показывает, что в БЛМ из ДПФХ формирование трансмембранной гидрофильной поры требует участия ≈ 50 молекул липида, в то время как в БЛМ из более длинноцепочечной ДСФХ для создания поры требуется около 18 молекул. Ранее была установлена корреляция между радиусом поры и размерами кооперативной единицы (домена) при температурном фазовом переходе липида L^{α} - L^{β} , определенной с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии [1]. Сравнение показывает, что размеры доменов ДСФХ и ДПФХ равные соответственно 130 и 260 молекул соответственно, намного больше размеров пор. Этот результат поддерживает гипотезу о внутримолекулярном формировании пор при фазовом переходе липидной мембраны из жидкокристаллического состояния в гель с возможным «вымораживанием» поры [1], [2].

1. Antonov V.F., Norik V.P., Smirnova E.Yu. Electric Conductance of Planar Lipid Bilayers as a Tool for the Study of Membrane Selectivity and Blockade. *Advances in Planar Lipid Membranes and Liposomes*. Ed. A. Leitmannova Liu and H.T. Tien, 2009, vol.9 pp. 29-65.

2. Wang Z.J. and Deserno M. Systematic implicit solvent coarse-graining of bilayer membranes: lipid and phase transferability of the force field. *New J Phys.*, 2010, 12 pp. 5-23

ФОРМИРОВАНИЕ ТРЁХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ТРОМБОЦИТОВ IN VITRO

Formation of three platelet subpopulations in vitro

Обыденный С.И.¹, Атауллаханов Ф.И.^{1,2,3,4}, Пантелеев М.А.^{1,2,3,4}¹Физический Факультет МГУ им. Ломоносова,
119899 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2²Центр Теоретических Проблем Физико-Химической Фармакологии РАН,
119991 Москва, ул. Косыгина, д. 4³Гематологический Научный Центр РАМН,
125167 Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4а⁴ООО «Гемакор», 125319 Москва, 4-я улица 8-го Марта, д. 3.
E-mail: obydenyj@physics.msu.ru

Тромбоциты представляют собой безъядерные клетки крови, которые играют важную роль при формировании в поврежденном сосуде гемостатической пробки, предотвращающей потерю крови, а также патологических тромбов. При взаимодействии тромбоцита с естественными стимуляторами – тромбином (PAR1), коллагеном (GPVI, $\alpha_2\beta_1$) и АДФ, в тромбоците запускается система активации, направленная на быстрое прикрепление к месту повреждения (адгезия) или другим активированным тромбоцитам (агрегация), формирующим тромб. В результате активации тромбоцит переходит в одну из трех субпопуляций:

1) клетка с активными интегринами $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (PAC1+), амёбовидной формы, имеет филоподии, низкий уровень внутриклеточного кальция;

2) клетка с большим количеством фосфатидилсерина на внешней стороне мембраны (PS+); форма – сферическая, филоподии отсутствуют, высокий уровень внутриклеточного кальция;

3) клетка с активными интегринами $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ и фосфатидилсерином на поверхности (PAC1+/PS+); недавно открытые и неохарактеризованные, низкий уровень внутриклеточного кальция. Цель работы: охарактеризовать при помощи конфокальной микроскопии субпопуляцию PAC1+/PS+.

Для решения этой задачи применялись двойное флуоресцентное окрашивание, конфокальная микроскопия, флуоресцентная сортировка клеток. Очищенные от белков плазмы тромбоциты активировались 100 нМ раствором тромбина. Клетки метили флуоресцентными красками: на внутриклеточный кальций инвертированной краской FuraRed или краской на активную форму интегрин $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (PAC1); оба варианта сопровождалась метками на фосфатидилсерин (PS). Затем активированные клетки осаждались на подложки, покрытые разными белками. При использовании подложки с фибриногеном образовывалась преимущественно PAC1+ субпопуляция, а при подложках с коллагеном и альбумином значительно увеличивалось образование круглых PS+ клеток. Были получены снимки всех трёх субпопуляций тромбоцитов, живых и фиксированных, что впервые позволило определить морфологию клеток PAC1+/PS+ как имеющих форму амёбы.

Выводы:

1) Внешний вид субпопуляции PAC1+/PS+ схож с PAC1+ и имеет амёбовидную форму с филоподиями. На поверхности клеток PAC1+/PS+ большое количество фосфатидилсерина.

2) Обнаружено, что фактором, определяющим формирование субпопуляций, является не только активатор, но и белок на подложке, на которую осуществляется адгезия тромбоцитов после активации. Эти исследования приоткрывают новые аспекты молекулярных механизмов формирования тромба.

**РЕГУЛЯЦИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ
ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАНКРЕАТИТЕ**

**Regulation of pancreatic mitochondrial membrane permeability during
experimental pancreatitis.**

Одинокова И.В.^{1,2}, Крестинина О.В.¹, Евтодиенко Ю.В.¹, Гуковская А.С.²

¹ – ИТЭБ РАН, 142290, Московская область, Пущино, ул. Институтская, 3

² – Университет Калифорнии, Лос-Анджелес, США

Тел.: +7(4967)73-91-82; факс: +7(4967)33-05-53; e-mail: odinokova@rambler.ru

Панкреатит – это заболевание экзокринной части поджелудочной железы, которое зачастую является летальным. Было показано, что ацинарные клетки гибнут как по некротическому, так и по апоптотическому пути, однако детальные механизмы гибели клеток все еще являются предметом дискуссии. Известно, что начальные стадии апоптоза/некроза индуцируются в митохондриях в результате увеличения неспецифической проницаемости, обусловленной формированием неселективной Ca^{2+} -индуцируемой CsA -чувствительной поры во внутренней митохондриальной мембране (РТР).

Целью данной работы было исследование регуляции РТР в митохондриях, изолированных из поджелудочной железы крыс с модельным панкреатитом. Для нашего исследования была использована церулеиновая модель панкреатита, при которой крысам с интервалом в 1 час вводили 4 инъекции церулеина (20 мкг/кг живого веса). Развитие панкреатита оценивали по уровню амилазы в сыворотке крови, который в наших экспериментах повышался с 65 ± 12 Е/л до 720 ± 114 Е/л. Показано, что в митохондриях, изолированных из крыс с панкреатитом, наблюдается снижение митохондриального мембранного потенциала на 10-15% по сравнению с контрольными митохондриями. Обнаружено, что в митохондриях, изолированных из опытных крыс, в ответ на добавление Ca^{2+} к среде инкубации увеличивается деполяризация митохондрий, а также наблюдается снижение Ca^{2+} -емкости, уменьшение лаг-фазы и увеличение скорости выхода кальция из митохондрий. Кроме того показано усиление выхода цитохрома с из митохондрий поджелудочной железы крыс с панкреатитом по сравнению с контрольными митохондриями. Было продемонстрировано, что при развитии панкреатита также изменяется регулирование открытия РТР в митохондриях. Согласно данным, опубликованным нами ранее, CsA обладает гораздо более низкой эффективностью при ингибировании открытия РТР и выхода Ca^{2+} из митохондрий здоровой поджелудочной железы, по сравнению с АТФ и АДФ. Однако было показано, что в митохондриях, изолированных из поджелудочной железы крыс с панкреатитом, действие адениновых нуклеотидов на закрывание РТР ослабляется, тогда как способность циклоспорина А ингибировать неспецифическую митохондриальную пору наоборот усиливается: в присутствии CsA Ca^{2+} -емкость митохондрий из опытных животных увеличивалась в 2 раза по сравнению с контролем. Наши данные указывают на то, что при панкреатите увеличивается чувствительность митохондрий поджелудочной железы к Ca^{2+} , а также изменяются механизмы регулирующие проницаемость митохондриальной мембраны.

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МОЛЕКУЛЫ ДНК С АЛКАЛОИДАМИ
БЕНЗОИМИДАЗОФТАЛАЗИНОВОГО РЯДА****Interaction of DNA molecule with the alkaloids of benzoimidazophthalasine series****Осинникова Д.Н.¹, Морошкина Е.Б.¹, Кузнецов В.А.²**

¹ – физический факультет Санкт-Петербургского государственного университета, 198504, Санкт-Петербург, Ст. Петергоф, ул. Ульяновская, 1;

² – НИИ ГПЭЧ ФМБА России, 119991, Ленинградская область, п/о Кузьмоловский
Тел.: +7(812)428-46-48; e-mail: dashik87@inbox.ru

Молекула ДНК является мишенью действия многих агентов, обладающих биологической активностью. Среди них особое внимание привлекают соединения, способные ингибировать матричную функцию ДНК в результате прямого взаимодействия с макромолекулой, так как подобные соединения обладают противоопухолевой активностью. В настоящей работе методами спектрофотометрии, кругового дихроизма (КД) и вискозиметрии было проведено исследование взаимодействия ДНК с 14 синтетическими производными бензо[4,5]имидазо[1,2-а]фталазина, имеющими в 9-ом положении заместители: пиперазин, морфолин, пирролидин или пиперидин [1]. Целью работы было исследование спектральных свойств этого ряда новых искусственно синтезированных соединений и выявление среди них комплексов ДНК. Было обнаружено, что наиболее активно взаимодействуют с ДНК производные бензоимидазофталазина, имеющие в положении 9 остаток пиперазина. Термодинамические параметры связывания и гидродинамические свойства их комплексов с молекулой ДНК свидетельствуют об интеркаляционном связывании этих соединений с макромолекулой. Интеркаляции плоского гетероциклического хромофора этих соединений в двойную спираль ДНК не препятствует наличие громоздкого заместителя в положении 5. Производные бензоимидазофталазина, имеющие в положении 9 остаток морфолина или пиперидина, имеют меньшее сродство к ДНК и интеркалируют в двойную спираль ДНК только в отсутствие громоздкого заместителя в положении 5. В отличие от пиперазиновых производных ароматический заместитель в этом положении препятствует интеркаляции соединения в двойную спираль ДНК. Это может указывать на различную ориентацию плоского гетероциклического хромофора в интеркаляционном сайте в зависимости от природы заместителя в 9-ом положении.

ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИИ ГЕМОПОРФИРИНА В МУТАНТНЫХ ВАРИАНТАХ ЦИТОХРОМА С**Investigation of hemoporphyrins conformations at mutant variants of cytochrome c**

Островерхова Т.В.^{1,2}, Браже Н.А.¹, Браже А.Р.¹, Черткова Р.В.², Некрасов А.Н.², Юсипович А.И.¹, Долгих Д.А.^{1,2}, Кирпичников М.П.^{1,2}, Максимов Г.В.¹

¹ – Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы д.1, стр.12;

² – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая д.16/10

Тел.: +7(495)335-28-88; факс: +7(495)335-28-88; e-mail: tato-tato@list.ru

Цитохром с является представителем семейства гемсодержащих белков и осуществляет перенос электрона от комплекса III к комплексу IV в дыхательной цепи митохондрий. Ранее нами было проведено компьютерное моделирование участка, включающего (76-83) аминокислотные остатки цитохрома с, и предложены мутантные варианты I81Y/A83Y/G84N, T78N/K79Y/M80I/I81M/F82N и T78S/K79P. Было показано, что полученные белки обладают существенно более сниженной электрон-транспортной активностью по сравнению с цитохромом с дикого типа.

В настоящей работе исследовали конформацию гемопорфирина в указанных восстановленных и окисленных мутантных вариантах цитохрома с методами традиционной спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) и спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР), соответственно. Выявленные изменения в спектрах восстановленных мутантов I81Y/A83Y/G84N и T78N/K79Y/M80I/I81M/F82N и окисленных мутантов T78N/K79Y/M80I/I81M/F82N и T78S/K79P свидетельствуют об изменении характера колебаний и длины метиновых мостиков между пиррольными кольцами порфирина, что указывает на более близкое расположение атома железа к плоскости порфирина в мутантных вариантах цитохрома с по сравнению с диким типом. Было показано, что у всех восстановленных мутантных цитохромов затруднены колебания боковых метильных групп пирролов и метиновых мостиков. Также было показано, что у окисленного мутанта T78S/K79P затруднены ассимметричные и симметричные колебания полукольца пирролов и боковых метильных групп по сравнению с цитохромом с дикого типа.

Таким образом, нами впервые было выявлено уменьшение подвижности гемопорфиринов в мутантных вариантах по сравнению с цитохромом с дикого типа. Обнаруженные изменения вызваны присутствием в рекомбинантных белках более жёсткого микроокружения гема. Полученные результаты хорошо согласуются с данными компьютерного моделирования и тестирования биологической активности цитохромов. Суммируя, изучаемый участок (76-83) а.о. несёт существенную функциональную нагрузку в перестройках микроокружения гема и последующего транспорта электрона между цитохромом с и его партнёрами в дыхательной цепи митохондрий.

МЕМБРАНОТРОПНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ РЯДОВ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНТИОКСИДАНТОВ

Membranotropic action of derivatives of synthetic antioxidant series

Паршина Е.Ю.¹, Лунева О.Г.¹, Рахбанова З.М.¹, Гендель Л.Я.², Рубин А.Б.¹

¹ – Биологический факультет Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова, Москва;

² – Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, Москва.
Тел.: +7(495)939-19-66, факс: +7(495)939-11-15, e-mail: parshinae@gmail.com

Методами сканирующей электронной и световой микроскопии, а также методом спиновых зондов в широком диапазоне концентраций изучено влияние синтетических антиоксидантов и биорегуляторов – представителей рядов производных 5-гидроксибензимидазола (5-ГБИ), новых синтетических антиоксидантов – анфенов, являющиеся производными L-тирозина и комбинированных антиоксидантов – ихфанов на структуру эритроцитарной мембраны и морфологию эритроцитов. Установлено, что производные ряда 5-ГБИ проявляют эхиноцитогенное действие, обусловленное их распределением во внешнем монослое эритроцитарной мембраны. На основании анализа спектров ЭПР выявлено, что наиболее гидрофобные соединения этого ряда, имеющие бензильный заместитель, оказывают структурно-модифицирующее действие на мембрану, выражающееся в изменении кинетики встраивания спинового зонда в мембрану и емкости мембраны для этого соединения. Показано, что производные ряда анфенов способны изменять морфологию эритроцитов, оказывая эхиноцитогенное (анфен-1) и стоматоцитогенное (анфены 2-4) действия. Полученные данные указывают на то, что распределение этих соединений во внешнем или внутреннем монослоях мембраны зависит от гидрофобности производного.

Выявлены изменения упорядоченности в поверхностных областях мембраны липосом, а также изменения микровязкости ее более глубоких областей под влиянием анфенов. При этом эффективность действия производного зависит от его гидрофобных свойств. Выявлены морфологические трансформации эритроцитов (индукция эхиноцитов и стоматоцитов), обусловленные встраиванием в мембрану и распределением во внутримембранном пространстве ихфанов – препаратов нового поколения, обладающих комбинированным антиоксидантным и антихолинэстеразным действием. Наблюдаемые изменения свидетельствуют о том, что антиоксидантное действие производных ряда ихфанов может реализоваться как во внешнем, так и во внутреннем монослоях эритроцитарной мембраны. При действии ихфанов наблюдаются также изменения микровязкости различных по удаленности от поверхности мембраны областей внутримембранного пространства, что позволяет сделать предположения о локализации производных с различной длиной гидрофобного заместителя. Определены различия в распределении и эффективности модифицирующего действия разных по гидрофобным свойствам производных рядов исследованных антиоксидантов, сделаны предположения об особенностях процесса мембранного транспорта и локализации в мембране данных соединений.

**ВЛИЯНИЕ ОСМОЛЯРНОСТИ СРЕДЫ НА РЕЛЬЕФ ПОВЕРХНОСТИ
ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА, ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ АСМ****Influence of medium osmolarity on surface relief of human erythrocyte, AFM study****Паршина Е.Ю., Юсипович А.И., Орлов С.Н., Максимов Г.В.**Биологический факультет Московского Государственного Университета
имени М.В. Ломоносова, Москва

Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) исследована поверхность мембран эритроцитов в нормальных условиях и инкубированных в растворах с различной осмолярностью. Для характеристики АСМ-изображений поверхности клеток использован интегральный параметр, который позволяет характеризовать рельеф клеточной поверхности и примембранного цитоскелета – параметр шероховатости, показывающий отклонение рельефа поверхности от среднего значения [1]. Известно, что параметр шероховатости эритроцитов является характеристикой функционального состояния клеток, и не зависит от типа фиксации клеток и одинаков для фиксированных и высушенных в мазке клеток [1]. В то же время, детальных исследований изменений поверхностной структуры мембраны эритроцитов на субмикро- и наномасштабах при изменении осмолярности среды не проводилось. Суспензии эритроцитов инкубировали в средах с различной осмолярностью. В работе были использованы эритроциты крови человека, фиксированные 0.5% глутаровым альдегидом. АСМ-изображения получены с использованием Зондовой нанолaborатории NTEGRA SPECTRA компании HT-МДТ (Россия, Зеленоград). Сканирование производили в полуконтактном режиме с использованием полуконтактных кантилеверов NSG 10-A, частота сканирования 0.5-1 Гц, размеры области сканирования на поверхности клетки, используемые для определения шероховатости, составляли 1 мкм². На полученных изображениях отчетливо видны глобулярные структуры с характерным размером порядка 50 нм. Эти структуры, по-видимому, соответствуют участкам транс- и примембранных белков, выступающих над поверхностью липидного бислоя. Были получены АСМ-изображения эритроцитов, инкубированных в средах с различной осмолярностью. Показано увеличение складчатости мембраны с характерными размерами порядка 200-300 нм, при этом параметр шероховатости поверхности эритроцита увеличивается. Характерные размеры и распределение при- и трансмембранных белков, по-видимому, остаются без изменений. Можно предположить, что наблюдаемая при сканировании поверхности эритроцитов методом АСМ складчатость мембраны является «мгновенным снимком» данных флуктуаций, полученным в результате фиксации мембранных белков глутаровым альдегидом. Полученные результаты могут служить важным дополнением в исследовании динамического поведения мембраны эритроцитов, а также использованы для выяснения механизмов регуляции формы и объема эритроцитов, включающие перестройки цитоскелета и распределения трансмембранных белков.

1. Girasole M., Pompeo G., Cricenti A., Congiu-Castellano A., Andreola F., Serafino A., Frazer B.H., Boumis G., Amiconi G. // *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, v. 1768, pp. 1268–1276.

ЛИПИДЫ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ И МИКРОСОМАЛЬНОЙ ФРАКЦИЙ ПЕЧЕНИ ГИБЕРНИРУЮЩЕГО ЯКУТСКОГО СУСЛИКА *S. UNDULATUS*.**Lipids of liver mitochondrial and microsomal fraction of hibernating Yakutian ground squirrel *S. undulatus*.****Перепелкина Н.И., Коломийцева И.К.**

Федеративное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук (ИБК РАН),
142290, Московская обл., г.Пушино, ул.Институтская, 3.
Тел.: +7(4697)73-93-26; e-mail: kolomiytseviskra@rambler.ru

При гибернации животное циклически погружается в оцепенение на срок от нескольких дней до месяцев (баут гибернации), с последующим переходом (на срок до 2-х дней) в активное состояние [1]. Сезон гибернации (зимней спячки) якутского суслика охватывает позднюю осень-зиму-раннюю весну. Методом высокоэффективной ТСХ исследовали количество липидов в органеллах клеток печени – митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме – летних и зимних сусликов (зимние активные и спящие) в расчете на мг белка органелл. В сезон гибернации в митохондриальной фракции печени активных и спящих животных количество фосфолипидов возросло на 70%, при этом количество фосфатидилхолина – на 56%, кардиолипина – на 54%, фосфатидилэтаноламина – на 90% по сравнению с летними. У зимних активных наблюдали уменьшение количества фосфатидилсерина на 28% по сравнению со спящими. Можно полагать, что увеличение количества фосфатидилхолина, кардиолипина и фосфатидилэтаноламина обусловлено адаптацией митохондрий к условиям баута гибернации для повышения функциональной устойчивости дыхательной цепи митохондрий. В сезон гибернации наблюдается подавление синтеза белков в печени, с дифференциальной экспрессией некоторых генов [2]. Угнетение синтетической активности эндоплазматического ретикулума сопровождалось уменьшением количества основных сигнальных липидов- фосфатидилхолина и фосфатидилинозитола. В микросомальной фракции в сезон гибернации количество фосфолипидов уменьшилось на 20%, фосфатидилхолина – на 40%, фосфатидилинозитола – на 30% по сравнению с летними. В состоянии оцепенения фосфолипидный состав микросомальной фракции не отличался от такового у активных зимних. Состав нейтральных липидов органелл печени зависел от сезона: в митохондриях у зимних сусликов количество холестерина было в 3 раза, жирных кислот – в 7 раз, моноглицеридов в 2 раза и диглицеридов в 3 раза больше, чем у летних. Отсутствие изменений фосфолипидного состава митохондрий печени при оцепенении наблюдали и у арктического суслика [3]. В микросомальной фракции зимних сусликов количество холестерина увеличено в 5 раз, жирных кислот – в 2,5 раз, моноглицеридов – в 3 раза и диглицеридов в 2 раза по сравнению с летними. Обогащение органелл холестерином, жирными кислотами, моно и диглицеридами свидетельствовало об участии нейтральных липидов адаптации мембранных структур печени к условиям гибернации. Показана важная функциональная роль липидов в модификации биоструктур для устойчивого функционирования мембран у гибернантов. Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-00993-а, 2009-2011 гг.

1. Lyman C.P. et al. Hibernation and Torpor in Mammals and Birds. 1987. N-Y., 317 p.
2. Epperson L.E., Rose J.C., Carey H.V., and Martin S.L. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2010. 298:R329-R340.
3. Chung D., Lloyd G.P., Thomas R.H. et al. // J. Comp. Physiol. B. 2011. 181(5):699-711.

КАЛЬЦИЙСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ: ИССЛЕДОВАНИЯ ПОСЛЕДНИХ ЛЕТ

Calcium binding proteins: recent studies

Пермяков Е.А.

Государственное бюджетное учреждение науки Институт биологического приборостроения РАН, 142290 Московская обл., Пущино, Институтская 7
Тел.: +7(495)624-57-49; факс: +7(4967)33-05-22; e.mail: epermyak@yandex.ru

Физическими методами исследовали процесс разворачивания различных металл-связанных форм парвальбуминов (ПА) шуки (α и β изоформы), трески и крысы (α и β изоформы) [1]. Все Ca^{2+} -ПА обнаруживают сложный механизм тепловой денатурации, причем ПА шуки и трески характеризуются наличием двух пиков теплопоглощения (два термодинамических домена). В комплексе с ионами Mg^{2+} и Na^{+} α -ПА шуки демонстрирует единственный тепловой переход типа «все-или-ничего». Показано, что у парвальбуминов с двумя тепловыми переходами стабилизирован EF-субдомен. Анализ изолированных полостей в структуре белка показал, что поверхность раздела между субдоменами CD и EF в α -ПА шуки существенно менее плотно упакована по сравнению с ПА, демонстрирующими единственный тепловой переход. Показано, что апо-ПА шуки относятся к семейству белков с внутренней неупорядоченностью. Обнаружена микрогетерогенность аминокислотной последовательности α -ПА шуки: замены K27A и L31K, дополнительный Leu между K11 и K12 (домен AB) [2]. Все эти остатки составляют единый кластер на поверхности белковой глобулы. Исследовано влияние Nt-ацетилирования на свойства ПА [3]. По сравнению с интактным α -ПА шуки, рекомбинантный (WT) белок (без Nt-ацетильной группы) демонстрирует изменение термостабильности, уменьшение α -спиральности, снижение сродства к Ca^{2+} и Mg^{2+} , а также изменение скорости диссоциации и ассоциации Ca^{2+} . Какого-либо влияния N-концевой ацетильной группы на свойства крысиного α -ПА не наблюдалось. В целом, показано, что Nt-ацетилирование необходимо для поддержания структурного и функционального статуса некоторых парвальбуминов.

Современные методы поиска нативно несвернутых участков применены к семейству кальций-связывающих белков S100 [4]. Показано, что 62% этих белков могут быть нативно развернутыми: 31% из них может находиться в состоянии «расплавленной глобулы», а 15% могут быть в полностью разупорядоченной форме. Центральная область разупорядоченности соответствует основной части псевдо-EF-петли, спирали II и начальной части спирали III. Эта область содержит около половины известных центров ферментативной пост-трансляционной модификации, что говорит о том, что она остается гибкой *in vivo*. Большинство внутренних остатков, не видных в рентгеновской третичной структуре, принадлежат области шарнира. Область шарнира и псевдо-EF-петли соответствуют локальному максимуму на графиках PONDR VSL2 и является эволюционно активной областью.

1. Permyakov S.E., Bakunts A.G., et al. / Cell Calcium, 2009, 46, 163-175.
2. Permyakov S.E., Karnoup A.S., et al. / Biochim. Biophys. Acta, 2009, 129-136.
3. Permyakov S.T., Vologzhannikova A.A., et al. / Cell Calcium, 2012, in press.
4. Permyakov S.E., Ismailov, R.G., et al. / Mol. BioSyst. 2011, 7, 2164-2180.

КВАНТОВЫЕ ОТЛИЧИЯ ОРТО/ПАРА $\text{H}_2\text{O}(\text{D}_2\text{O})$ И СКАЧОК ПРОНИЦАЕМОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ СКВОЗЬ МИКРОКАПИЛЛЯРЫ ПРИ 36.6 В H_2O И 37.4 °C В D_2O

Ortho/para $\text{H}_2\text{O}(\text{D}_2\text{O})$ quantum differences and erythrocyte permeation jump through microcapillar at 36.6 in H_2O and 37.4 °C in D_2O

Першин С.М.

Научный центр волновых исследований ИОФ им. А.М.Прохорова РАН,
Вавилова 38, 119991, Москва, Россия
E-mail: pershin@kapella.gpi.ru

Обнаруженные нами [1] методом четырехфотонной спектроскопии вращательные спектры орто и пара спин-изомеров H_2O в воде дают принципиально новое представление о свойствах воды. Физически ясно, что наличие в воде мономеров H_2O , отличающихся квантовыми свойствами: орто- H_2O вращаются всегда в отличие от пара- H_2O , часть из которых всегда не вращается, должно проявляться при конденсации. Установлено [2], что пара- H_2O энергетически выгодно образовывать структурные комплексы, чем орто- H_2O . Мы обнаружили также [1,3] спиновую селективность формирования гидратных слоев биомолекул из пара- H_2O . Известно [4] каталитическая орто-пара конверсия H_2O при столкновениях в неоднородном магнитном поле молекулы триплетного O_2 и образовании смешанных квантовых состояний, когда энергетические уровни орто-пара H_2O практически совпадают. Эти факты позволили нам обосновать [5] квантовую природу наблюдаемого скачка проницаемости молекул орто- H_2O через аквапориновые каналы мембраны эритроцитов, что обеспечивало их деформируемость и проницаемость микрокапилляров в окрестности 36.6 и 37.4 °C в растворах H_2O и D_2O , соответственно [6,7]. Скачок [5], подобно цепной реакции, обусловлен пара-орто конверсией этих молекул в поле триплетного кислорода при столкновительно-«резонансном» возбуждении в условиях, когда тепловая энергия kT совпадает с энергией кванта вращательного перехода $kT \approx h\Omega$ молекул H_2O или D_2O . Смешанные квантовые орто-пара состояния обеспечивают обогащение раствора орто-изомерами $\text{H}_2\text{O}(\text{D}_2\text{O})$ и их эвакуацию через водные каналы мембраны, а также разрушение гель-подобного гидратного слоя гемоглобина и более плотную его упаковку с уменьшением объема эритроцитов. Квантовый механизм орто-пара конверсии при $kT = h\Omega$ [8] применен нами также для обоснования корреляции температуры наблюдаемого [7] структурного перехода в растворе гемоглобина 14 организмов и температуры их тел, а также механизма запуска деления яйцеклетки и эффекта «омоложения» дрожжевых клеток [9]. Работа выполнялась при частичной поддержке гранта РФФИ 11-02-00034.

1. Бункин А., Нурматов А., Першин С. / УФН. 2006. Т.176(8). С.883-889.
2. Куянов К., Choi M.Y., Vilesov A. / J. Chem. Phys., 2010. Т.132. С.014304.
3. Бункин А. и др. / Биофизика. 2009. Т.54(3). С.396-401.
4. Michout X., Vasserot A.-M., Abouaf-Marguin L. / Vib. Spectrosc. 2004. Т.34. С.83-93.
5. Pershin S. / Phys. of Wave Phenomena. 2009. Т.17(4). С.241-250.
6. Artmann G., Kelemen C., Porst D., Buldt G., Chien S. / Biophys. J. 1998. Т.75. С.3179.
7. Artmann G., Digel I., Zerlin K., et al. / Eur Biophys J. 2009. Т.38. С.589.
8. Pershin S. / Phys. of Wave Phenomena. 2008. Т.16(1). С.15-25.
9. Першин С., Исмаилов Э., Сулейманова З., и др. / Биофизика, в печати.

УПРУГОСТНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ МЕМБРАН ГЕМОЦИТОВ *HIRUDO MEDICINALIS* И *HEMOPIS SANGUISUGA* В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕНИЯ ОСМОТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ.**Change of indicators the elastic membranes of hemocytes *Hirudo medicinalis* and *Hemopsis sanguisuga* with changes in osmotic pressure.****Пигалева Т.А.**

Белгородский государственный университет, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85
Тел.: +79087809439; e-mail: luskinia@mail.ru

Поддержание постоянства внутренней среды является важной функцией организма. Особое значение этот процесс имеет для нормальной жизнедеятельности водных животных. Адаптация происходит как на организменном уровне, так и на уровне клетки.

Целью данного исследования является оценка воздействия растворов различной концентрации на морфофункциональные характеристики клеток крови медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*) и большой ложноконской пиявки (*Hemopsis sanguisuga*).

Для изучения влияния изменения осмотического давления на целоמוциты использовали методы световой и атомно-силовой микроскопии. Одновременно фиксировали изменения морфологии клеток и упругостных характеристик.

Упругость клеточной мембраны, характеризует динамику фибрилл цитоскелета, целоמוцитов. Значения рассчитывали для каждой группы клеток. Показатели модуля Юнга различались в пределах одной клетки, и зависели от локализации точек идентификации. Так показатель упругости клеток *Hirudo medicinalis* варьирует в гипертонической среде – от $24,83 \pm 2,68$ кПа до $22,1 \pm 7,9$ кПа; в гипотонических условиях – от $18,8 \pm 6,48$ кПа до $17,93 \pm 4,48$ кПа; в изотонической среде – от $18,79 \pm 5,42$ кПа до $19,35 \pm 6,3$ кПа. Для *Hemopsis sanguisuga* эти показатели находились в широком диапазоне: в гипертонической среде – от $16,59 \pm 12,61$ кПа до $24,33 \pm 10,55$ кПа, в гипотонической – от $9,3 \pm 2,35$ кПа до $25,07 \pm 12,21$ кПа, в изотонической – от $9,25 \pm 1,33$ кПа до $18,94 \pm 2,41$ кПа. Упругость клеточной мембраны значительно отличается для точек наноидентификации в пределах одной клетки. В гипотонической среде разница между наибольшим и наименьшим значением оказалась максимальной.

Морфологические изменения при инкубации в растворах различной концентрации наблюдали на живых клетках в условиях влажной камеры. В гипотонической среде клетки удлиняли филоподии, которые в гипертоническом растворе заметно укорачивались и становились менее разветвленными. Целоמוциты в гипотоническом растворе образовывали агрегаты, а в гипотоническом – вакуолизировались.

Изменение осмотического давления оказывает влияние на способность клетки к выпячиванию филоподий и адгезии к подложке, что влечет за собой некоторую перестройку цитоскелета. Так как показатели модуля Юнга значительно варьируют в нормальных физиологических условиях, то средние показатели не отражают конформационных изменений цитоскелета.

**ПЕРЕНОС ЗАРЯДА В РЕАКЦИОННОМ ЦЕНТРЕ ПУРПУРНЫХ БАКТЕРИЙ.
КВАНТОВЫЕ ЭФФЕКТЫ, ИНИЦИИРОВАННЫЕ КОЛЕБАТЕЛЬНО-ВРАЩАТЕЛЬНЫМИ
СОСТОЯНИЯМИ МОЛЕКУЛ $H_2O(D_2O)$**

**Charge transfer in the Reaction Center of Purple Bacteria. Quantum effects caused
by the rotational-vibrational states of $H_2O(D_2O)$ molecule**

Пищальников Р.Ю.¹, Першин С.М.¹, Бункин А.Ф.¹

1 – Научный Центр Волновых Исследований Института Общей Физики им. А.М.
Прохорова РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 38;
Тел.: +7(499)503-87-75; факс: +7(499)135-82-34; e-mail: rpishchal@kapella.gpi.ru

Проведено численное моделирование динамики состояний с разделёнными зарядами с целью расчёта поляризации (в третьем порядке теории возмущений) и её эволюции в импульсном оптическом поле. Расчёты вращательных состояний орто-изомера D_2O с ненулевым магнитным моментом и смешанных орто-пара D_2O состояний проведены на основе уравнения Лиувилля для матрицы плотности и релаксационной модели Редфилда для молекулярных агрегатов [1]. Из множества расчётных частот вращательных резонансов найдены близкие к известным экспериментальным частотам модуляции кинетики (транспорта электронов) специальной пары реакционных центров в пурпурных бактериях. Это полуколичественное совпадение частот (с экспериментальной точностью) представляется доводом в подтверждение сформулированной ранее гипотезы [2]: спиновый орто-изомер $H_2O(D_2O)$ может играть роль медиатора в процессе переноса заряда в реакционных центрах пурпурных бактерий.

1. Pishchalnikov R. Yu., Pershin S.M., Bunkin A.F. / Physics of Wave Phenomena 2012, 20(3) (принята в печать)
2. Pershin S.M., Pishchalnikov R.Yu. / Physics of Wave Phenomena 2012, 20(1), 35-44

**ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ОБЪЁМА ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК
СОСУДОВ ПРИ АПОПТОЗЕ****Платонова А. А.^{1,2}, Кольцова С. В.^{2,3}, Максимов Г. В.¹, Григорчик Р.², Орлов С. Н.¹⁻³**¹-Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия²-Научно-исследовательский центр университета г. Монреаль, Канада³-Институт общей патологии и патофизиологии Российской академии медицинских наук, Москва, Россия

Известно, что изменение объёма клетки является важным параметром при классификации типов клеточной смерти: некроз (набухание) и апоптоз (сжатие). С помощью метода трехмерной микроскопии исследовали изменения объема гладкомышечной клетки сосудов, трансфицированных E1A-аденовирусным белком (E1A-VSMC). Стимулируя апоптоз клетки в отсутствии ростовых факторов и на фоне действия стауроспорина в течение 30-60 минут обнаружено увеличение на 40% объема клетки, что коррелирует с максимальной активацией каспазы 3 и разрушением хроматина. Установлено, что субклеточные структуры набухшей клетки в течение 10-15 мин переходят в стадию деградации, формируя апоптотические тельца. Стауроспорин вызывает 30% -е уменьшение объема клетки, а образование апоптотических тел наблюдается через ~2.5 часа после максимального сжатия. Предполагается, что уменьшение объема гладкомышечных клеток не может служить маркером апоптоза и функция стимулируемого изменения клеточного объёма должна исследоваться дополнительно.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА (НА) С ЛИПОСОМАМИ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ

**Researche interaction hemagglutinin of flu virus (HA) with liposomes of the
fluorescence method**

Погарская И.В., Контаров Н.А., Балаев Н.В., Юминова Н.В.

Научно – исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, РАМН,
Москва, 105064, Малый Казенный пер., д. 5а;
тел.: +7(495) 674-01-99;
e-mail: kontarov@mail.ru

В наших предыдущих исследованиях было выявлено вирусингибирующее действие безхолестериновых липосом в отношении вирусов гриппа. Механизм данного явления заключается в экстракции холестерина из вирусной оболочки липосомами, что, в свою очередь, приводит к невозможности слияния вирионов гриппа с клетками [1]. Однако, о взаимодействии НА вируса гриппа с липосомами на данный момент ничего не известно. С помощью метода тушения собственной флуоресценции белка исследовано влияние фосфолипидов на конформационное состояние НА. Показано, что взаимодействия НА с модельными фосфолипидными мембранами сопровождается изменением структурно – динамической организации белка. Данный метод может быть использован с целью контроля структурной организации белков при получении виросом, в частности, гриппозной виросомальной вакцины.

1. Контаров Н.А., Артюшенко С.В. и др./ Материалы международной конференции Органическая химия для медицины, Черноголовка, 2008. С. 78-79.

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
АМИЛОИДОВ МЫШЕЧНЫХ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА ТАЙТИНА****Functional and pathological properties of amyloids of muscle proteins of titin family**

Подлубная З.А.^{1,2}, Вихлянцев И.М.¹, Бобылёв А.Г.¹, Бобылёва Л.Г.¹, Окунева А.Д.^{1,2},

¹ – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Моск. обл., ул. Институтская, 3;

² – Пущинский государственный естественно-научный институт,
Тел: +7 (4967) 739269; факс: +7 (4967) 330553; e-mail: podlubnaya@iteb.ru

Белки семейства тайтина (тайтин, С-, Х-, Н-белки) локализируются на миозиновых нитях в саркомерах скелетных и сердечной мышц и выполняют структурную, регуляторную и сигнальную функции [1]. Мы исследовали свойства этих белков в мышцах человека и животных в норме, при адаптационных (зимняя спячка) и патологических (кардиомиопатии, миопатии) процессах [2-4]. При этих процессах открыта их способность формировать амилоидные фибриллы с функциональными и патологическими свойствами, соответственно [5-8]. В частности, мы полагаем, что подобно другим белкам, которые строят функциональные амилоидные фибриллы [9], белки семейства тайтина строят такие структуры во время спячки [10]. Этому способствуют условия в период спячки: снижение рН в клетке и фосфорилирование этих белков.

1. Вихлянцев И.М., Подлубная З.А. / Биофизика, 2007, Т.52. С.1030-1040.
2. Вихлянцев И.М., Подлубная З.А. / Биофизика, 2003, Т.48. С.499-504.
3. Вихлянцев И.М., Карадулева Е.В. и др. / Биофизика. 2008, Т.53. С.1066-1072.
4. Вихлянцев И.М., Подлубная З.А. / Биофизика, 2008, Т.53. С.1058-1065.
5. Марсагишвили Л.Г., Шпагина М.Д. и др. / Биофизика, 2005. Т.50. С.803-809.
6. Подлубная З.А., Марсагишвили Л.Г. и др. / Технологии живых систем, 2008. Т.5, № 5-6, С.11-21.
7. Бобылёв А.Г., Марсагишвили Л.Г. и др. / Технологии живых систем, 2009. Т.6. С.46-53.
8. Bobylev A.G., Kornev A. B., et al. / Organic & Biomol. Chem., 2011. V.9. P.5714-5719.
9. Chiti F. and Dobson Ch. M. / Annu. Rev. Biochem., 2006. V.75. P.333-366.
10. Podlubnaya Z.A., Alekseeva Y.A., et al. / J. Muscle Res. & Cell Motil., 2004. V.25(3), P.263-264.

СВЕТОЗАВИСИМОЕ ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СВЯЗАННОГО БИКАРБОНАТА В МЕМБРАНАХ ТИЛАКОИДОВ**Подорванов В.В., Полищук А.В.**Институт ботаники им. Н.Г.Холодного НАН Украины, г. Киев, Украина, 01601
Тел: +380(44)272-32-31; факс: +380(44) 272-32-31; e-mail: membrana@ukr.net

Зависимость скорости фотохимических реакций в хлоропластах от присутствия в среде неорганического углерода (Сн) обнаружена около 50 лет назад. Было отмечено, что даже в изолированных из фотосинтезирующих организмов структур, не способных к фотосинтетической ассимиляции CO₂, удаление CO₂ из среды приводит к замедлению электронного транспорта, который восстанавливается при добавлении в среду бикарбоната, вследствие чего это явление получило название "бикарбонатного эффекта". Есть, по крайней мере, два пула бикарбоната с различной прочностью связывания с ФС2 и очевидно, только один крепко связана молекула (1 молекула на 400-600 молекул хлорофилла, или на один реакционный центр ФС2) контролирует активность ФС2, в то время как пул менее прочно связанного бикарбоната (с концентрацией, близкой концентрации хлорофилла) может быть удален без существенных последствий для активности ФС2. Тилакоиды изолировали из свежих 40-дневных листьев шпината и суспендировали в среде хранения, содержащей 200 мМ сорбитол, 10 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 10 мМ трицин-NaOH (pH 7,8) и 2,5 мМ MgCl₂ при концентрации хлорофилла (хлф) 4 мг/мл. Концентрацию хлф определяли по Арнону. Эксперименты по определению свето-индуцированных изменений концентрации CO₂ в газовом объеме выполнялись при постоянной продувке объема воздухом с известной концентрацией CO₂ (600 ppm) с помощью инфракрасного газового анализатора (ИКГА) фирмы Qubit Systems (Канада). Количество бикарбоната в тилакоидах определяли по количеству CO₂, выделявшегося при разрушении мембран. Для этого препарат тилакоидных мембран уравнивали с воздухом, не содержащим CO₂, в герметичной изолированной от атмосферы ячейке. После однократного добавления к суспензии концентрированной HCl pH среды падал до 1, мембраны разрушались с высвобождением связанного CO₂, количество которого определяли с помощью ИКГА. Перед измерением количества связанного HCO₃⁻ тилакоиды тщательно промывали буферным раствором, приготовленным на свежеперегнанной дистиллированной воде. Количество мембраносвязанного бикарбоната рассчитывали по разности между количеством HCO₃⁻ в супернатанте и в осадке после центрифугирования суспензии. Общее количество связанного бикарбоната в препарате тилакоидов за вычетом бикарбоната, который находился в среде суспендирования, составляла 0,33 – 0,45 мкмоль/мг хл. В ходе темновой инкубации часть слабосвязанного с мембранами бикарбоната переходила в водную фазу, тогда как фракция прочно связанного HCO₃⁻ сохранялась в мембранах даже при многочасовой инкубации и после промывки препаратов свежей средой. Распределение мембраносвязанного бикарбоната между мембранной фракцией и супернатантом менялось в зависимости от присутствия в среде ингибиторов карбоангидразы. Если в контрольных хлоропластах количество мембраносвязанного бикарбоната составляло 0,35 мкмоль/мг хл, то в присутствии в среде инкубации ингибиторов карбоангидразы (КА) ацетозоламида (АА) или этоксизоламида (ЭА), выход бикарбоната из тилакоидов значительно ускорялся. Освещение изолированных хлоропластов (класс II) шпината, салата или гороха, суспендированных в закрытой стеклянной клетке, индуцировало поглощение CO₂ из газовой фазы, до 250 нмоль CO₂/мг хлф. Процесс развивался в течение 15-20 сек, и после включения света наблюдался обратный выход эквимольного количества CO₂ в газовую фазу. Светозависимое поглощение CO₂ блокируется разобщителями, разрушающими трансмембранный протонный градиент, и ингибиторами КА.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИОФЕРРИТИНА Dps E. COLI С РАЗНЫМИ ПО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМ СВОЙСТВАМ ФРАГМЕНТАМИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДНК**Interaction of *E. coli* bacterioferritin Dps with different in physicochemical properties fragments of bacterial DNA****Покусаева В.О.¹, Антипов С.С.¹, Озолинь О.Н.^{2,3}**¹ – Воронежский государственный университет, 394018, Воронеж, Университетская пл., 1;² – Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 3;³ – Пушинский государственный естественно-научный институт, 142290, Пущино, проспект Науки, 3

Тел.: +7(473) 220-8981; Факс: +7(4967)33-05-09; e-mail.: ss.antipov@gmail.com

Додекамер Dps является мультифункциональным белком. Он защищает бактериальную ДНК от различного рода повреждений, окисляет Fe²⁺ до Fe³⁺ и депонирует 400-500 молекул оксидов железа внутри белковой полости. Такое сочетание функциональных свойств позволяет рассматривать Dps как перспективную основу для создания сложных ферритовых конструкций на ДНК-матрицах. Однако в 3D-структуре Dps нет обычных ДНК-связывающих модулей, поэтому способ его взаимодействия с ДНК и предпочтительные мишени пока не установлены. Известно, что в контакт с ДНК вступает неструктурированный N-концевой фрагмент, имеющий 3 аминокислотных остатка лизина [1]. Это предполагает возможность предпочтительного связывания в участках с низким электростатическим потенциалом. С другой стороны, шарообразная форма белка, на поверхность которой экспонированы 12 N-концевых модулей, допускает возможность его одновременного взаимодействия с несколькими сайтами. В таком случае определенные преимущества могут иметь изогнутые участки ДНК. Не исключено также, что Dps, подобно другим белкам нуклеоида, преимущественно связываются с А/Т-богатыми участками генома, которые легче поддаются адаптивной изомеризации. Поэтому для сравнительного анализа было выбрано 4 фрагмента, отличающихся электростатическим потенциалом (выбраны по базе данных DEPPDB [2]), величиной анизотропного изгиба (использован сетевой ресурс DNA tools [3]) и содержанием А/Т пар. Три из них взяты из промоторной (*dps* и *hns-1*) и кодирующей (*hns-2*) частей активно транскрибируемых генов, а один из транскрипционно неактивного «промоторного островка» гена *yeal*. Методом задержки в геле было установлено, что все они связываются с Dps. По эффективности взаимодействия фрагменты расположились в следующем порядке: *yeal=dps>hns-2>hns-1*. Это коррелирует с содержанием в них А/Т-пар и не соответствует другим градиентам: *dps>hns-2=hns-1>yeal* (электроотрицательность); *dps>hns-2>hns-1>yeal* (анизотропный изгиб). Конформационная подвижность ДНК, следовательно, может быть важным фактором, определяющим взаимодействие с Dps и гетерохроматизацию ДНК в определенных сайтах.

1. Ceci P. et al./Nucleic Acids Res., 2004. V.32. P.5935–5944.

2. Osypov A.A. et al./J. Bioinform. Comput. Biol., 2010. V.8(3), P.413–425.

3. Vlahovicek K. et al./Nucleic Acids Res., 2003 V.31(13). P.3686–3687

Работа поддержана грантом РФФИ (10-04-01218-а), Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере («У.М.Н.И.К.») и Министерством образования и науки Российской Федерации.

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ FGF НА НАКОПЛЕНИЕ АЛК В МСК
КОСТНОГО МОЗГА И ЖИРОВОЙ ТКАНИ****Comparative analysis of FGF effect on ALA accumulation between MSC from bone
marrow and fat tissue****Полешко А.Г.¹, Василевич И.Б., Лобанок Е.С.**

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
220072, Беларусь, г. Минск, ул. Академическая 27.
Тел.: 8-017-284-17-49; факс: 8-017-284-23-59; e-mail: renovacio888@yandex.ru

Основными источниками выделения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) для накопления клеточной биомассы, используемой в восстановительной терапии, являются костный мозг (КМ) и жировая ткань (ЖТ). Практика последних лет показывает, что использование ЖТ как источника МСК может быть более оправданным по сравнению с КМ по ряду причин. Забор ЖТ менее травматичен. МСКЖТ обладают более высокой пролиферативной активностью и колониобразующей способностью, в большей степени подавляют пролиферативный ответ Т-лимфоцитов на аллотрансплантат, в меньшей вызывают РТПХ и секрецию провоспалительных цитокинов. Все это наряду со способностью сохранять широкий дифференцировочный потенциал, делает МСКЖТ перспективным биоматериалом для регенеративной медицины. В связи с этим целью исследования явилось сравнение влияния фактора роста фибробластов (FGF), поддерживающего выживание и пролиферативную активность МСК в культуре, на накопление в клетках раннего предшественника гема – аминокислоты (АЛК), индуцирующей, как было показано нами ранее, в МСККМ и ЖТ процесс гемообразования. МСК, выделенные из КМ и ЖТ крыс, культивировали в одинаковых условиях в среде α -MEM с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС). На 3-м пассаже культуры переводили в среду с 2% ЭТС, после образования монослоя в среду роста вносили FGF (10 нг/мл), через 18 ч клетки снимали и инкубировали 4 ч с экзогенной АЛК (0.8мМ, 37 С). Внутриклеточное содержание АЛК определяли спектрофотометрически, при $\lambda=555$ нм.

Выявлено, что добавление FGF в среду роста МСК 2-х типов повышает пролиферативный потенциал культур. Время удвоения популяции МСККМ на протяжении 3-х пассажей в 1,4 раз больше, по сравнению с МСКЖТ. Установлено, что уровень эндогенной АЛК в МСКЖТ в 1,5 раза выше, чем в МСККМ. Внесение в среду роста FGF увеличивает эндогенный уровень АЛК в обоих типах клеток. При добавлении к клеткам экзогенной АЛК ее общее внутриклеточное содержание возрастает для МСККМ в 1,9 раз и для МСКЖТ – в 4,7 раз. Однако в процессе АЛК-индуцируемого гемообразования чувствительность клеток к FGF становится практически одинаковой.

Полученные результаты свидетельствуют о более высоком содержании и накоплении в ответ на FGF эндогенной и экзогенной АЛК в МСКЖТ и нивелировании этой разницы по сравнению с МСККМ в процессе гемообразования.

**ЗАВИСИМОСТЬ ПРОТОННОГО ТРАНСПОРТА В ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ
МЕМБРАНАХ ГОРОХА ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ****Temperature dependence of the proton transfer in pea chloroplasts****Полищук А.В., Подорванов В.В., Онойко Е.Б.**

Институт ботаники им. Н.Г.Холодного НАН Украины, г. Киев, Украина, 01601
Тел: +380 (44)272-32-31; факс: +380 (44) 272-32-31; e-mail: membrana@ukr.net

Текучесть липидного бислоя резко снижается при температурах фазового перехода липидов, регистрируемого обычно при 12-14 °С. В мембранных липидах растений, выращенных при пониженных температурах, или испытывавших непродолжительный холодовой стресс, увеличивается относительное содержание ненасыщенных жирных кислот, и порог фазового перехода сдвигается в область более низких температур. Зависимость электронного и протонного транспорта в тилакоидных мембранах хлоропластов от температуры также связана с изменением их текучести. До настоящего времени зависимость кинетики протонного транспорта в тилакоидах, сформированных при температурах ниже фазового перехода липидов не изучалась. Целью настоящей работы было изучение протонного обмена в изолированных мембранах хлоропластов в температурном диапазоне 4-20 °С. Растения гороха выращивали на среде Прянишникова при температуре 25 °С и фотопериоде 12/12 час в течение 10-11 суток. Затем в течение последующих 5-6 дней часть растений на ночь помещали в холодильную камеру с температурой 6 °С. Из листьев двух верхних ярусов 15-17-ти дневных растений выделяли хлоропласты класса «С» по методике Уокера в нашей модификации. Препараты суспендировали в среде хранения, содержащей 200 мМ сорбитол, 10 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 10 мМ трицин-NaOH (pH 7,8) и 2,5 мМ MgCl₂ при концентрации хлорофилла 4 мг/мл. Концентрацию хлорофилла определяли по методу Арнона. Кинетику формирования и диссипации трансмембранного ΔpH оценивали по кривым светоиндуцированного тушения и темнового разгорания флуоресценции 9-аминоакридина на импульсном флуориметре XE-PAM (Walz, Германия), величину и кинетику светозависимого поглощения протонов (ΔH⁺) определяли потенциометрическим методом. В качестве акцепторов электронов использовали феназинметасульфат (ФМС), метилвиологен (МВ) или феррицианид калия (FeCy). Величины ΔpH в освещенных тилакоидных мембранах, изолированных из листьев контрольных растений и выращенных при ночном охлаждении, значительно не отличались во всем диапазоне изученных температур (4-20 °С). Величина светоиндуцированного поглощения протонов в присутствии ФМС также практически не зависела от температуры в этом диапазоне. Поглощение протонов в реакциях электронного переноса от воды к FeCy или МВ снижалось при снижении температуры от 20 до 14 оС в контрольных препаратах. У хлоропластов, изолированных из «холодовых» растений, температурный предел, при котором снижалась величина ΔH⁺ в присутствии FeCy или МВ, смещался в область более низких температур – до 10-11 °С. Различная температурная зависимость ΔH⁺ в реакциях циклического (с ФМС) и нециклического (с FeCy или МВ) электронного транспорта может быть связана с замедлением при снижении температуры диффузии пластохинона, не принимающего участия в реакциях переноса электронов на ФМС. Данные, полученные при изучении кинетики выхода протонов из хлоропластов после выключения света, показали, что протонная проницаемость тилакоидов резко снижалась при температуре 13-14 °С у контрольных и 10-11 °С у мембран, сформированных при охлаждении, что согласуется с данными о влиянии холодового закаливания на жирнокислотный состав тилакоидных мембран.

**СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КОМПЛЕКСОВ ДНК С «АРХИТЕКТУРНЫМИ»
БЕЛКАМИ ХРОМАТИНА**

**Structural organization of the complexes between DNA and “architectural”
chromatin proteins**

Поляничко А.М.^{1,2}, Чихиржина Е.В.²

¹ Физический факультет Санкт-Петербургского государственного университета, 198504, Санкт-Петербург, ул. Ульяновская, д. 1, Тел.: +7(812)4284410; факс: +7(812)4287240; e-mail: a.polyanichko@pobox.spbu.ru

² Институт цитологии Российской академии наук, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр. 4, Тел.: +7(812)2973740.; факс: +7(812)2970341; e-mail: chikhir@gmail.com

В работе проведено исследование комплексов ДНК с негистоновым белком HMGB1 и линкерным гистоном H1 в присутствии ионов двухвалентных металлов. Основными использованными нами методами стали круговой дихроизм (КД) в ультрафиолетовой области и инфракрасная спектроскопия поглощения и кругового дихроизма (ВКД). ВКД является относительно новым спектральным подходом для изучения ДНК-белковых комплексов [1]. Основными преимуществами этого метода являются (1) возможность исследовать надмолекулярные комплексы, вызывающие рассеяние света в УФ диапазоне; и (2) возможность проводить анализ спектральных полос, соответствующих колебаниям отдельных химических групп в составе ДНК и белков. Последнее даёт возможность следить за участием во взаимодействии конкретных участков двойной спирали ДНК и полипептидной цепи белка.

Значительное внимание в работе было уделено изменению структуры ДНК под действием ионов марганца. Была показана возможность наблюдения В→Z перехода в образцах ДНК тимуса телёнка под действием ионов Mn²⁺. Рассмотрено влияние белков HMGB1 и H1 на эффективность такого перехода. Установлено, что совместное действие этих двух белков способно приводить к образованию упорядоченных комплексов [2], чувствительных к присутствию ионов двухвалентных металлов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ: 10-04-00092 и 12-08-01134). Часть работ выполнялась в рамках реализации проекта по ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы (ГК П1163).

1. Polyanichko A.M., Chirkhizhina E.V. et al. Biopolymers, 2006, Vol. 83, Iss. 2, 182-192.

2. Chikhirzhina E., Polyanichko A. et al. Spectroscopy, 2010, Vol. 24, Iss. 3-4, p. 361-366.

РАЗЛИЧИЕ В ХАРАКТЕРЕ НУКЛЕАЗНОЙ ФРАГМЕНТАЦИИ ХРОМАТИНА КОДИРУЮЩЕЙ ОБЛАСТИ ГЕНА *try*-ДИОКСИГЕНАЗЫ В РЕПРЕССИРОВАННОМ, КОМПЕТЕНТНОМ К ТРАНСКРИПЦИИ И ТРАНСКРИБИРУЕМОМ СОСТОЯНИЯХ

Differences in nuclease fragmentation patterns of coding region chromatin of *try*-dioxigenase gene in the repressed, competent to transcription and transcribed states

Прияткина Т.Н.

СПбГУ, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9, кафедра биохимии.
Тел.: (812)328-21-82; факс: (812)323-24-54; e-mail: tpriyatkina@mail.ru

Несмотря на развитие знаний о структуре нуклеосом, механизмы обратимого перехода хроматина в активную конформацию, обеспечивающую реализацию матричных функций ДНК, остаются не выясненными. Для регистрации изменений в ДНК-гистоновых взаимодействиях, на которых основана динамика нуклеосомной структуры, широко используется анализ доступности ДНК в составе различных форм хроматина к нуклеазному перевариванию. Мы исследовали фрагментацию хроматина кодирующей области гена *try*-диоксигеназы (*to*) крыс в активном, активированном (компетентном к транскрипции) и репрессированном состояниях ДНКазой I и микрококковой нуклеазой (МНазой). Использовали кратковременную обработку ферментами при насыщающей концентрации, когда нуклеазные разрывы ДНК реализуются практически во всех потенциально доступных сайтах хроматина. Установлено, что в ядрах клеток печени крыс, где ген *to* экспрессируется, ни одна из нуклеаз не продуцирует *to*-ДНК с длиной моно- или олигонуклеосомных фрагментов, типичных для нуклеолитического рапада репрессированного хроматина. В компетентном состоянии до индукции транскрипции (первые 15 суток постнатального развития) на всём протяжении кодирующей области *to* (19000 п.н.) не обнаруживаются сайтов, доступных для МНазы. Включение транскрипции (в печени взрослых крыс) приводит к появлению МНазочувствительных зон со случайным распределением, возможно, фланкирующих РНК-полимеразы. На обеих стадиях активации гена *to* ДНК его кодирующей области переваривается ДНКазой I до кислоторастворимых продуктов.

ДНКаза I вводит в ДНК одностранные надрезы (ники) и расщепляет двойную спираль при совпадении их позиций на комплементарных цепях. МНаза осуществляет симметричный разрыв двух цепей. Высокая вероятность двунитовых разрывов внутрикоревой ДНК ДНКазой I в хроматине дерепрессированных генов свидетельствует об освобождении фосфодиэфирных связей, экранированных гистонами в компактных частицах. Однако ДНК остаётся недоступной для МНазного разрыва двух связей, противлежащих на двойной спирали. При этом зона резистентности распространяется на всю длину структурных единиц хроматина. Рассматривается модель линеаризации нуклеосомной ДНК, сопряжённой с преобразованием гистонового октамера в линейную двуцепочечную структуру, сохраняющую с ДНК ограниченный контакт.

ПЕРМЕАБИЛИЗАЦИЯ ЦИТОХРОМОМ С И H₂O₂ ПЛАНАРНЫХ БЛМ**Permeabilization of planar BLM by cytochrome c and H₂O₂****Пучков М.Н.¹, Антонов В.Ф.², Корепанова Е.А.¹, Осипов А.Н.¹**¹ – ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздравсоцразвития России,
117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1;² – ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова Росздрава
119992, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Тел./факс: +7(495)434-11-74; e-mail: maximbf@mail.ru

Важнейшим этапом апоптоза является выход цитохрома с из митохондрий в цитоплазму клетки. Ключевую роль в этом процессе играют липидные бислои мембран митохондрий. Целью исследования являлось изучение влияния цитохрома с на пермеабиллизацию мембран в присутствии H₂O₂. Исследования проводились на планарной БЛМ (пБЛМ) из азолектина и кардиолипина (80% и 20%) или фосфатидной кислоты (80% и 20%), сформированных по методу Мюллера. Это позволяет достигать значительной длительности эксперимента и одновременно измерять проводимость и емкость мембраны. Было установлено, что добавка в раствор молекул цитохрома с и пероксида водорода вызывает образование и развитие пор в пБЛМ, содержащей тетраолеилкардиолипин или фосфатидную кислоту. Образование пор происходит при достижении порогового импульсного напряжения (100 мВ, 2Гц) при низкой ионной силе раствора. В режиме мониторинга пБЛМ электрическими импульсами треугольной формы показано, что адсорбция молекул цитохрома с (до 1мкМ) из раствора буфера с низкой ионной силой (<40 мМ КС1), содержащего H₂O₂ (до 40 мМ), приводит к появлению долгоживущих пор диаметром порядка 3,5 нм. Контрольные опыты показали, что в пБЛМ из азолектина без добавки тетраолеилкардиолипина; из азолектина и тетраамиристоилкардиолипина; а также в тетраолеилкардиолипин-содержащих пБЛМ при высокой ионной силе (>40 мМ КС1) поры не возникали. Поры не являются результатом электрического пробоя пБЛМ, поскольку пробойное напряжение модифицированных пБЛМ превышало 180 мВ. Вольт-амперные характеристики пор имели линейный вид и проходили через начало координат, что свойственно большим ион-неселективным порам. Измерения емкостного тока в пБЛМ, модифицированной цитохромом с и H₂O₂ обнаружили уменьшение удельной емкости пБЛМ, обусловленное, по-видимому, изменением толщины бислоя в результате адсорбции молекул цитохрома с. Предполагается, что изменение проводимости мембраны вызывается пероксидазной активностью цитохрома с, проявляющейся в присутствии H₂O₂. В результате этой активности происходит окисление ненасыщенных углеводородных радикалов в молекулах кардиолипина и фосфатидной кислоты. Это приводит к появлению промежуточных форм окисления липидов, способных влиять на барьерные свойства мембраны, в том числе к увеличению проводимости. Предполагается, что поры, наблюдаемые при адсорбции цитохрома с в присутствии H₂O₂, относятся к липидным порам тороидального типа. Такие поры могут способствовать выходу цитохрома с в цитоплазму и т.о. поддерживать процесс апоптоза.

СВОЙСТВА МОЛЕКУЛ ФОСФОЛИПИДОВ В БИСЛОЯХ: КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ**Properties of phospholipid molecules in bilayers: computer simulations****Рабинович А.Л.¹, Любарцев А.П.²**¹ – Институт биологии Карельского научного центра РАН,
185910, Петрозаводск, ул.Пушкинская, 11;² – Stockholm University, Svante Arrhenius väg 12, Stockholm, Sweden, SE-10691
Тел.: +7(8142)57-18-79; факс: +7(8142)76-98-10; E-mail: rabinov@krc.karelia.ru

Компьютерное моделирование широко используется для моделирования липидных мембранных систем [1]. В настоящей работе методом молекулярной динамики моделировали совокупность бислоев, образованных молекулами фосфатидилхолинов разного строения, в жидкокристаллическом состоянии. Одна из двух углеводородных цепей липидной молекулы каждого бислоя была насыщенной и содержала 16 или 18 атомов углерода, а вторая – ненасыщенной и содержала 18, 20 или 22 атома углерода, а также 1, 2, 3, 4, 5 или 6 двойных связей цис; всего рассмотрено 16 бислоев. Химическое строение липидных молекул воспроизведено строго, атомы водорода учтены явно. Моделирование осуществлено с помощью пакета MdynaMix v.5.2. Длина траектории каждого бислоя составляла 100 нс, из которых первые 20 нс считали участками релаксации.

Показано, что можно провести классификацию векторов-связей (как C-C, так и C-H) в цепях липидов по форме ориентационных функций распределения относительно нормали к поверхности бислоя, т.е. по характеру их упорядочения в бислоях. Все функции распределения можно разделить на группы качественно однотипных функций, и соотнести эти группы (типы) с определенными местоположениями связей в углеводородных цепях разной степени ненасыщенности.

Показано, что две жирнокислотные цепи, соединенные в липидной молекуле посредством глицеринового остова, оказывают взаимное влияние на конформационные свойства друг друга; эффект можно описать в терминах упругости углов, которые образуют последовательные атомы углерода, расположенные на обеих цепях, и атомом углерода глицерина, а также расстояний между упомянутыми парами углеродных атомов цепей ацилов. Рассчитаны соответствующие коэффициенты упругости в гармоническом приближении. В обоих случаях приведено три варианта аппроксимации: для малых, средних и больших величин отклонения (углов или расстояний). Каждая молекула фосфолипида может быть охарактеризована профилями коэффициентов упругости, – углов и расстояний между атомами, расположенными на разных олигомерных цепях.

Выделены особые свойства полиненасыщенных цепей липидов и обсуждены фундаментальные причины их существования. Результаты способствуют дальнейшему углублению знаний о физических основах функционирования биологических мембран.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 10-03-00201а) и программы Президента РФ “Ведущие научные школы” НШ-1642.2012.4.

**ПОИСК ЭФФЕКТИВНЫХ ГИБРИДНЫХ СВЕТОСОБИРАЮЩИХ СИСТЕМ
НА ОСНОВЕ КОМПОНЕНТОВ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА И
ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ НАНОКРИСТАЛЛОВ («КВАНТОВЫХ ТОЧЕК»)**

**Search for efficient hybrid light-harvesting systems based on components of the
photosynthetic apparatus and semiconductor nanocrystals ("quantum dots")**

**Разживин А.П.¹, Максимов Е.Г.², Schmitt F.-J.³, Махнева З.К.⁴, Москаленко А.А.⁴,
Renger G.³, Пащенко В.З.²**

¹ – НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, 119992, Москва, Ленинские горы, НИИ ФХБ МГУ; Тел.: +7(495)939-54-13; факс: +7(495)939-31-81; e-mail: razjivin@belozersky.msu.ru; ² – Кафедра биофизики Биологического факультета МГУ, 119992, Москва, Ленинские горы, Биологический факультет, кафедра биофизики; Тел.: +7(495)939-11-07; факс: +7(495)939-11-15; e-mail: paschenko@biophys.msu.ru; ³ – Institute of Chemistry, Biophysical Chemistry, Berlin Institute of Technology, 10623 Berlin, Germany, e-mail: schmitt@physik.tu-berlin.de; gernot.renger@mailbox.tu-berlin.de; ⁴ – Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 142290, Пущино Московской обл.; Тел.: +7(4967)73-18-49; факс: +7(4967)33-05-32; e-mail: andrey-moskalenko@issp.serpukhov.su

Возможность создания фотопреобразователей на основе фотосинтетических ПБК объясняется их очевидным преимуществом по сравнению традиционными элементами – квантовый выход фотоиндуцированного разделения зарядов в РЦ достигает 100%. Одной из проблем при этом является повышение эффективности светосбора фотопреобразователем во всем оптическом диапазоне. Решение проблемы возможно путем создания гибридных систем на основе КТ и фотосинтетических ПБК.

Исследовали эффективность переноса энергии возбуждения в гибридных системах на основе полупроводниковых нанокристаллов (квантовых точек) и различных пигмент-белковых комплексов, входящих в светособирающие антенны фотосинтетического аппарата. В качестве доноров энергии возбуждения использовались различные наноразмерные квантовые точки из CdSe, покрытые ZnS оболочкой с нанесением на поверхность анионных или катионных групп. Акцепторами энергии служили светособирающие комплексы LH2 и LH1 пурпурных бактерий, фикобилипротеины цианобактерий и палочковидные полипептидно-пигментные комплексы из цианобактерии *Acaryochloris marina*. В водных буферных растворах квантовые точки и пигмент-белковые комплексы могли путем самосборки образовывать гибридные системы. Показали, что эффективность переноса энергии возбуждения от квантовых точек к палочковидным полипептидно-пигментным комплексам может достигать 90%. Также эффективно происходил перенос энергии от квантовых точек на тримеры фикоэритрина. Перенос энергии от квантовых точек на светособирающие комплексы LH2 и LH1 пурпурных бактерий практически отсутствовал. Обсуждаются структурные, спектральные и температурные факторы, влияющие на эффективность переноса энергии возбуждения в изученных гибридных системах. Полученные результаты частично представлены в публикации [1].

1. Schmitt F.-J., Maksimov E.G., Hätti P., Weißborn J., Jeyasagar V., Razjivin A.P., Paschenko V.Z. Coupling of different isolated photosynthetic light harvesting complexes and

2. CdSe/ZnS nanocrystals via Förster resonance energy transfer. /Biochim. Biophys. Acta, 2012. doi:10.1016/j.bbabi.2012.03.030.

УСТОЙЧИВЫЕ ПРОЧНОСВЯЗАННЫЕ СТОПОЧНЫЕ АГРЕГАТЫ НУКЛЕИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ – ПЕРВЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАТРИЦЫ**Stable tightly bonded stacking aggregates of nucleic bases – the first genetic matrices****Рапопорт В.Л.**

НИИ физики им. В.А. Фока СПбГУ

Тел.: +7(812)428-4556; факс: +7(812)428-7240; e-mail: victor.rapoport@paloma.spbu.ru

Обсуждаются результаты цикла работ группы автора, посвященных изучению люминесценции димерных и полимерных компонентов НК и люминесценции и самоассоциации нуклеиновых оснований (НО) в воде, приведших к обнаружению прочносвязанных и плотноупакованных стопочных (стэкинг-) димеров и других стопочных агрегатов, которые не распадаются даже при 85°C [1]. Спектры люминесценции и ее возбуждения димеров аденозина практически совпадают с теми же спектрами динуклеозидмонофосфатов, что говорит о близости структур: максимумы спектров люминесценции при 400–500 нм (разные конформеры).

Было предположено, что эти прочносвязанные стопочные агрегаты НО в воде могли быть первыми генетическими матрицами на основе НО, названными прото-РНК [1], и что они могут размножаться в смешанных водных растворах комплементарных оснований при последовательных росте и спаде температуры в интервале от 1–2°C до температуры разрыва водородных связей в комплементарных парах (6–7°C для аденина и урацила в микроспирали из двух молекул аденина и двух молекул урацила (тимина)) [1]. Предполагалось, что при низкой температуре на стопочном димере будут связываться Н-связями комплементарные мономеры, а затем будет образован новый стопочный димер, который освободится при нагреве до температуры разрыва Н-связей [1].

В последнее время получены результаты, подтверждающие эту гипотезу. При смешивании растворов аденина и урацила (тимина) (10⁻³ М, рН 7.0) при 2°C наблюдалось тушение люминесценции стопочных димеров за счет образования Н-связей с комплементарными основаниями. При последующих нагревах до 7°C (урацил) или 6°C (тимин) наблюдался аномальный рост интенсивности люминесценции за счет разрыва этих Н-связей, приводящего к освобождению новообразованных димеров, и вследствие этого рост концентрации стопочных димеров до 15% за 5-6 циклов нагрев–охлаждение, оцененный по интенсивности люминесценции при 2°C. Т.е. смешанные растворы комплементарных оснований можно считать первыми живыми системами на основе НО.

Рассмотрена возможность построения других простейших живых систем на основе других молекул, например, ароматических аминокислот, в которых есть вертикальные и горизонтальные комплексы, причем энергия вертикального взаимодействия должна быть больше энергии горизонтального.

ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ГЛЮКАНТРАНСФЕРАЗЫ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ДРОЖЖЕЙ *S. CEREVISIAE* BGL2P ФОРМИРОВАТЬ ФИБРИЛЛЫ *IN VITRO*

Yeast cell wall *S. cerevisiae* Bgl2p glucantransferase *in vitro* fibrillation ability

Рекстина В.В.¹, Безсонов Е.Е.¹, Кудряшова И.Б.¹, Довженко М.А.¹, Семисотнов Г.В.², Калебина Т.С.¹

1 – Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12.

² – Институт белка РАН, 142290 Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, 4. Тел.: +7(495)939-50-75; e-mail: vrexтина@gmail.com

Bgl2p относится к семейству 17 гликозидгидролаз (ЕС 3.2.1.58). Несмотря на более чем 20-летнюю историю изучения, структура молекулы Bgl2p практически не охарактеризована. Изучение структуры Bgl2p необходимо, поскольку он является мажорным белком клеточной поверхности и играет важную роль в создании прочной и устойчивой к внешним воздействиям клеточной стенки (КС). Ранее в нашей лаборатории была продемонстрирована способность Bgl2p, выделенного из КС дрожжей *S. cerevisiae*, формировать фибриллы [1]. В данной работе представлены результаты, характеризующие процесс фибриллообразования Bgl2p *in vitro*: способность Bgl2p фибриллизироваться при разных значениях pH, особенности морфологии фибрилл, формируемых белком Bgl2p, данные, демонстрирующие обратимость процесса фибриллообразования; изменение степени контакта остатков триптофана молекулы белка с водным окружением в процессе образования и разборки фибрилл [2]. Будут представлены также данные, полученные с помощью компьютерного моделирования трёхмерной структуры Bgl2p, свидетельствующие о том, что N-концевая область этого белка (24-102 аминокислоты), следующая за сигнальной последовательностью, может формировать структуру, аналогичную пространственной структуре прионообразующего домена белка HET-s (218-289 аминокислоты) *Podospora anserina* [3,4].

1. Kalebina T.S., Plotnikova T.A., Gorkovskii A.A., Selyakh I.O., Galzitskaya O.V., Bezsonov E.E., Gellissen G., Kulaev I.S. *Prion*, 2008. V.2(2). P.91-96.

2. Безсонов Е.Е., Калебина Т.С., Горковский А.А., Кудряшова И.Б., Семисотнов Г.В., Кулаев И.С. / Молекулярная биология, 2010. Т.44(3). С.551-554.

3. Wasmer C., Lange A., Van Melckebeke H., Siemer A.B., Riek R., Meier B.H. / *Science*, 2008. V.319(5869). P.1523-1526.

4. Saupé J.S. / *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2011. V.22. P.460-468.

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПОРОД КАРПА БЕЛОРУССКОЙ СЕЛЕКЦИИ С ПОМОЩЬЮ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ**Assessment of genetic diversity of Belarusian carp breeds by use of microsatellite markers****Ровба Е.А., Конева О.Ю., Дромашко С.Е.**Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Республика Беларусь,
220072, Минск, ул. Академическая, 27;

Тел.: +375(17)284-21-90; факс: +375(17)284-19-17; e-mail: S.Dromashko@igc.bas-net.by

До сих пор геном такого важного с рыбоводческой точки зрения вида как карп (*Cyprinus carpio* L) изучен крайне мало. Последовательность ДНК карпа до сих пор не отсеквенирована, хотя информация о геноме является необходимой для проведения эффективных работ в области его селекции. Наличие подобной информации призвано ускорить селекционный процесс и оценку эффективности проведения селекции в направлениях хозяйственно ценных признаков, в частности, в таких важных направлениях, как продуктивность и устойчивость.

С помощью методов ДНК-типирования зарубежными исследователями выявлена высокая генетическая изменчивость некоторых европейских (Венгрия) и азиатских (Китай) пород карпа. В странах СНГ лишь в России проводились единичные исследования местных и европейских пород этой рыбы методом мультилокусного геномного типирования.

В Беларуси исследование генетического разнообразия пород карпа белорусской селекции впервые проведено нами с использованием RAPD-маркеров. Оценка геномной изменчивости отечественных пород карпа с помощью SSR-маркеров ранее не проводилась.

Целью данной работы стало изучение полиморфизма пород карпа белорусской селекции (лахвинская, тремлянская, изобелинская) с помощью микросателлитных маркеров.

В результате проведенных молекулярно-генетических исследований, для некоторых отводок изучаемых пород карпа были обнаружены специфические аллели, по исследуемым микросателлитным локусам (MFW7, MFW16, MFW28, MFW31), которые могут быть использованы в качестве генетического маркера отводки и для генетической паспортизации.

– для лажвинской чешуйчатой отводки был обнаружен специфический ампликон – тип 6 (282 п.о.) по праймеру MFW28, который встречался в выборке с частотой 30,77%;

– для тремлянской зеркальной отводки по праймеру MFW7 был обнаружен специфический ампликон – тип 7 (517 п.о.), который встречался в выборке с частотой 30,00%;

– для изобелинской стальной XVIII отводки обнаружен специфический ампликон – тип 1 (326 п.о.) по праймеру MFW-28 с частотой встречаемости 57,14%.

Для остальных отводок изучаемых пород карпа (тремлянская чешуйчатая, изобелинская смесь зеркальная, изобелинская смесь чешуйчатая, изобелинская триприм, лажвинская зеркальная) по исследуемым микросателлитным локусам (MFW7, MFW16, MFW28, MFW31) не было обнаружено специфических ампликонов.

Таким образом, данные микросателлитные маркеры дают некоторую информацию о генетическом разнообразии пород карпа белорусской селекции, но оказываются малоэффективными для целей их паспортизации.

РОЛЬ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ УЧАСТКОВ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ И МОРФОЛОГИИ МИЕЛИНОВОГО НЕРВНОГО ВОЛОКНА

A role of membrane protein extracellular parts in regulation of myelinated nerve function and morphology

Родионова Н.Н.¹, Юсипович А.И.¹, Ревин В.В.², Максимов Г.В.¹

1 – Государственное учебно-научное учреждение биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12.

2 – Государственное учебно-научное учреждение биологический факультет МГУ имени Н.П. Огарева, 430019, РМ, г. Саранск, ул. Ульянова, 26 б

Тел.: +7 (499) 939-19-66; факс: +7 (495) 939-11-15; nrوديонова@mail.ru

Известно, что проведение возбуждения миелиновым нервным волокном осуществляется за счет функционирования всех компонентов комплекса «аксон-глиальная клетка» (А-Гк). Нарушение в работе одного из компонентов А-Гк является причиной развития многих патологий центральной и периферической нервных систем. Между аксоном и Гк существуют специфические контакты посредством белковых молекул, локализованных как в аксолемме, так и в плазматической мембране Гк.

Целью данной работы являлось выяснить роль экстраклеточных участков мембранных белков в регуляции функционирования и морфологии миелинового нерва.

Белки модифицировали как за счет блокирования свободных SH-групп белков (с помощью пара-хлормеркурибензоата), так и гидролиза пептидных связей (с помощью фермента проназа Е). С помощью ЭПР- и КР- спектроскопии, а также газо-жидкостной хроматографии исследовали состав и упорядоченность мембранных фосфолипидов нерва. Установлено, что гидролиз пептидных связей экстраклеточных участков мембранных белков приводит к быстрому (до 12 мин.) увеличению упорядоченности мембранных липидов, тогда как при длительном воздействии (30-50 мин.) упорядоченность мембранных липидов нерва снижается. Параллельно происходит падение амплитуды и увеличение скорости проведения потенциала действия (ПД). С помощью лазерной интерференционной микроскопии выявлены изменения морфологии волокна и распределения компонентов аксоплазмы. Блокирование свободных SH-групп экстраклеточных участков белков не меняло морфологию нервного волокна и скорость проведения ПД, тогда как вызывало обратимую десорбцию Ca²⁺ с мембран миелина и снижение амплитуды проведения ПД. Таким образом, изменение структуры и конформации белковых молекул отражается на состоянии мембранных липидов.

Предположено, что при длительном проведении серии ПД изменение белок-липидных взаимодействий в миелине может являться причиной функциональной демиелинизации.

**ТЕРМОДИНАМИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ
КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ ВОДА-БЕЛОК-СОЛЬ ПРИ ВАРИАЦИЯХ КОНЦЕНТРАЦИЙ
И ТЕМПЕРАТУРЫ**

**Thermodynamic stability and interaction of components of the water-protein-salt
system on concentration and temperature variations**

Рожков С.П., Горюнов А.С.

Институт биологии Карельского НЦ РАН, 185910, Петрозаводск, Пушкинская, 11
тел. (8142)765264, факс (8142)769810. E-mail: rozhkov@krc.karelia.ru

Вопросы растворимости, взаимодействия и агрегации биополимеров имеют важное значение в исследовании механизмов развития патологии ряда заболеваний, известных как конденсационные, в механизмах адаптационных реакций молекулярных систем на изменение условий среды, а также при очистке, разделении, стабилизации, кристаллизации и консервации биоматериалов в биотехнологии и фармакологии. Один из путей решения этих вопросов основан на исследовании взаимодействия белок-растворитель и состоит в изучении закономерностей нарушения термодинамической устойчивости системы вода-белок-соль по отношению к процессам диффузии, ведущей к возникновению неоднородности по концентрации [1]. Ряд работ в этом направлении [2–4] позволил установить наличие спинодали (области нестабильности) на фазовой диаграмме системы вода-белок-соль и сопряженной с ней бинодали как условия сосуществования разбавленной и метастабильной плотной (концентрированной) фазы раствора белка, а также критической точки, выше которой раствор макроскопически гомогенен. Более того, такой подход дает возможность обосновать существование статических и динамических кластеров белка нано- и мезоскопических размеров в закритической области фазовой диаграммы, обнаруживаемых экспериментально методами ЭПР спиновых меток [5], динамического светорассеяния [6,7] и другими динамическими методами. В работе обсуждаются особенности построения теоретических фазовых диаграмм системы вода-белок-соль при вариациях концентрации компонент и температуры в различных системах координат, позволяющих сопоставить структурно-динамическое состояние раствора с соответствующими областями фазовой диаграммы, в которых взаимодействия между компонентами раствора претерпевают существенные изменения. Это также дает возможность описать фазовые переходы типа жидкость-жидкость, золь-гель и жидкость-твердое тело, исходя из аналитического выражения для химического потенциала воды, зависящего от специфических характеристик молекулы белка, концентраций компонентов, активности электролита, температуры и других абиотических факторов.

[1] Пригожин И., Дефей Р. Химическая термодинамика. Новосибирск: Наука, 1966.

[2] Rozhkov S.P. // J.Cryst.Growth. 2004.Vol.273. P.266-279.

[3] Rozhkov S.P., Goryunov A.S. // Biophys.Chem. 2010. Vol.151. P.22-28.

[4] Рожков С.П. // Биофизика. 2005. Т.50. С.115-122.

[5] Rozhkov S.P., Goryunov A.S. // Eur.Biophys.J. 2000. Vol.28. P.639-645.

[6] Muranov K.O., Maloletkina O.I., Poliansky N.B., Markossian K.A., Kleymenov S.Yu., Rozhkov S.P., Goryunov A.S., Ostrovsky M.A., Kurganov B.I. // Exp.Eye Res. 2011. Vol.92. P.76-86.

[7] Vekilov P.G. // J.Phys.: Condens.Matter. 2012. Vol.24. 193101.

БОРИРОВАННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ХЛОРИНА e_6 И ФТОРСОДЕРЖАЩИХ ПОРФИРИНОВ КАК ПРОНИКАЮЩИЕ АНИОНЫ: ИССЛЕДОВАНИЕ НА БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ.**Boronated derivatives of chlorine e_6 and fluoride-containing porphyrins as penetrative anions: investigation on bilayer lipid membranes.****Рокицкая Т.И.¹, Зайцев А.В.², Ольшевская В.А.², Калинин В.Н.², Мойсенович М.М.³, Агапов И.И.³, Антоненко Ю.Н.¹**

1 – НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского, МГУ имени М.В.Ломоносова;

2 – Институт элементоорганических соединений им. А.Н.Несмеянова, РАН;

3 – биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова,

119991, Москва, Ленинские горы, д.1 стр.40

Факс: (7-495) 939 31 81, rokitskaya@genebee.msu.ru

Гидрофобные ионы с делокализованным зарядом по системе ароматических связей представляют класс молекул, способных проникать через липидные мембраны, в отличие от других заряженных молекул и неорганических ионов. Типичными проникающими катионами являются производные трифенилфосфония, тогда как среди проникающих анионов можно выделить полиэдрические карбораны. В последние годы проникающие катионы активно используются в качестве «электрических локомотивов» для адресной доставки антиоксидантов и других соединений в митохондрии поскольку эти органеллы имеют отрицательный электрический потенциал относительно цитоплазмы. В то же время, использование анионных группировок, способных проникать через мембраны, является другим перспективным подходом для адресной доставки соединений в клетки и другие клеточные компартменты. Поскольку клетки разных тканей имеют различный потенциал покоя, то анионные группировки могут обеспечить селективное накопление заряженных соединений в ряду таких клеток животного.

Карборан-содержащие производные порфиринов активно изучаются в связи с перспективой их использования в бор-нейтронозахватной терапии и фотодинамической терапии рака. Понимание механизма их проникновения через клеточную мембрану является важным условием для выявления наиболее эффективных в терапии соединений. Мы изучили способность борированных производных хлорина e_6 и порфирина, являющихся моно-, ди- или тетра-анионами, проникать через плоские бислойные липидные мембраны (БЛМ). Методом измерения релаксации тока через БЛМ в ответ на прикладывание напряжения были оценены константы скорости транслокации монокарборана и конъюгата хлорина e_6 с одной молекулой монокарборана через гидрофобную часть липидной мембраны. Они оказались близки и равны $6,6 \text{ с}^{-1}$ и $6,8 \text{ с}^{-1}$, соответственно. Конъюгаты порфирина с двумя и четырьмя молекулами монокарборана также оказались проникающими анионами несмотря на то, что они несут заряд минус два и минус четыре, соответственно. Скорость проникновения тетрааниона, оцененная по величине тока через БЛМ, нелинейно зависела от потенциала на мембране. Поскольку большинство клеток имеет потенциал покоя с минусом внутри, то можно заключить, что наличие анионных группировок будет препятствовать накоплению таких порфиринов внутри клеток.

МЕХАНИЗМЫ АФФЕРЕНТНОЙ НЕЙРОПЕРЕДАЧИ ВО ВКУСОВЫХ КЛЕТКАХ**Mechanisms of afferent neurotransmission in taste cells****Романов Р.А., Рогачевская О.А., Колесников С.С.**

Институт биофизики клетки РАН,
142290, Московская область, Пущино, ул. Институтская, 3
Тел.: +7(4967)739311; e-mail: roman.al.romanov@gmail.com

Среди клеток вкусовой почки выделяют несколько типов: клетки типа II являются рецепторными для вкусовых категорий горького, сладкого и умами (вкус аминокислот); вкусовые клетки III типа ответственны за восприятие кислого, а клетки I типа, помимо глиальной функции, участвуют в рецепции соленого. Долгое время оставалось неясным, каким образом клетки II типа осуществляют передачу информации о вкусе на нервные окончания, ведь в этих клетках отсутствуют классические синаптические структуры, пре-синаптический белок SNAP-25 и потенциал-зависимые кальциевые каналы. Наше исследование посвящено анализу механизмов афферентной нейротрансмиссии в идентифицированных вкусовых клетках.

С использованием метода клеточного АТФ-биосенсора мы выяснили, что клетки типа II высвобождают афферентный нейромедиатор, АТФ, в ответ на деполяризацию. Как оказалось, выброс АТФ клетками типа II не зависит от кальция, что свидетельствовало против классического Ca^{2+} -зависимого везикулярного механизма. Дальнейшие исследования с применением методов флуоресцентных трэйсеров и электрофизиологического анализа селективности каналов показали, что секреция АТФ обеспечивается АТФ-проницаемыми ионными каналами. Ингибиторный анализ, сравнение свойств нативных потенциал-зависимых АТФ-проницаемых каналов во вкусовых клетках с рекомбинантным паннексином 1 и эксперименты на мышах, нокаутных по паннексину1, свидетельствовали о том, что во вкусовых клетках II типа АТФ-проницаемый канал формируется канальными белками из семейства коннексинов. Важным свойством клеток II типа является их способность генерировать потенциалы действия (ПД). В то же время другие вторичные сенсорные клетки, не имеющих аксонов, не используют ПД для кодирования и передачи сенсорной информации и не способны их генерировать. Поэтому целесообразность генерации ПД для вкусовой трансдукции была не вполне ясна. В своей работе мы предложили и обосновали идею, что ПД обеспечивают квантовый характер невезикулярного высвобождения афферентного нейромедиатора АТФ из клеток типа II.

В то же время, для клеток типа III характерны события, типичные для нейрональных клеток: стимул-индуцированная деполяризация приводит к генерации серии потенциалов действия, частотные характеристики которой пропорциональны интенсивности стимула. Связанная с деполяризацией активация потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов ведет к резкому увеличению цитозольного кальция, что стимулирует высвобождение нейромедиатора (серотонина).

**МИКРОСПОРЫ КАК ОДНОКЛЕТОЧНЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ
НЕЙРОТРАНСМИТТЕРНЫХ СИСТЕМ****Microspores as unicellular models for the study of neurotransmitters systems****Рощина В.В.**ФГБУН Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 3
Тел.: +7(4967)739293; e-mail: roshchinavic@mail.ru

Показаны возможности анализа хемосигнальных процессов с участием найденных во всех живых организмах нейротрансмиттеров – ацетилхолина, дофамина, гистамина и их антагонистов [1] – на одноклеточных моделях как биосенсорах – растительных микроспорах (вегетативные микроспоры хвоща полевого *Equisetum arvense*, пыльца *Hippestrium hydridum*, *Vallota speciosa*) [2,3]. Методами люминесцентной микроскопии, микроспектрофлуориметрии и лазерной сканирующей конфокальной микроскопии [2] изучено проникновение этих соединений и их антагонистов в клетку и связывание с отдельными компартаментами. Флуоресцирующие в голубой области спектра антагонисты d-тубокурарин, иохимбин и азулен (блокаторы соответственно холинорецепторов, адренорецепторов и гистаминовых рецепторов) вызывали заметные изменения свечения клеток в сине-зеленой области спектра при возбуждении ультрафиолетовым или фиолетовым светом. Тубокурарин и иохимбин не проникали внутрь клеток, связываясь на их поверхности. Азулен связывался как на поверхности клеток, так и проникал внутрь исследуемых клеток, в результате чего наблюдали голубую (возбуждение 360-380 нм) или зеленую (возбуждение 420 нм) флуоресценцию ДНК-содержащих органелл. Все антагонисты, действуя на деление клеток и в частности хлоропластов, снижали количество микроспор, флуоресцирующих в красной области спектра. Показано влияние липофильных (лецитин и амфотерицин В) и белковых (альбумин, холинэстераза, белки цитоскелета – актин, миозин и тайтин) [4] соединений на проявление эффектов нейротрансмиттеров и антагониста тубокурарина на автофлуоресценцию микроспор. Интенсивность красного свечения *E. arvense* при 680 нм изменялась во многих вариантах. Наиболее заметным было снижение этого свечения в присутствии альбумина и холинэстеразы по сравнению с действием собственно дофамина. Обсуждается возможность моделирования на одноклеточных биосенсорах при анализе действия на клеточном уровне антагонистов нейротрансмиттеров как лекарственных препаратов.

1. Roshchina V.V. Neurotransmitters in Plant Life. Enfield, Plymouth: Science Publ. 2001. 280 p.
2. Roshchina V.V. Fluorescing World of Plant Secreting cells. Enfield, Jersey, Plymouth: Science Publ. 2008. 283 p.
3. Рощина В.В. Успехи Современ. Биол, 2006. Т.126. 366-378.
4. Рощина В.В., Яшин В., Вихлянцева И.М./Биол. мембраны, 2011. Т. 28. С. 1-12.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ
РАСТВОРОВ ОКСИГЕМОГЛОБИНА, ИНДУЦИРОВАННЫХ ОКСИДОМ АЗОТА (II)
РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ**

**Study of changes in absorption spectra of oxyhemoglobin solutions induced by
different concentrations of nitric oxide (II)**

Рубан М.К.^{1,2}, Лавриненко И.А.¹, Вашанов Г.А.¹

1 – Воронежский государственный университет, 394006, Воронеж, Университетская площадь, 1

2 – Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н.Бурденко, 394036, Воронеж, ул. Студенческая, 10

Тел.: +7(473)220-84-50; факс: +7(473)239-92-81; e-mail: vga@main.vsu.ru

Среди физиологически наиболее значимых лигандных форм внутриэритроцитарного гемоглобина оксигемоглобин (HbO₂) является самым многочисленным. Следовательно, оксид азота (II) (NO) при проникновении в эритроцит в первую очередь будет взаимодействовать с HbO₂. Механизмы реакций различных лигандных форм Hb, в частности HbO₂, и NO, являются дискуссионными [1]. В связи с этим, в данной работе мы изучили изменения спектральных характеристик растворов HbO₂, индуцированные NO различных концентраций.

Нами показано, что с ростом концентрации NO в растворе происходит окисление HbO₂ до MtHb, о чем свидетельствуют появление в спектрах λ_{max} MtHb при 499,0 нм и 629,0 нм, а также исчезновение λ_{max} HbO₂ при 541,5 нм и 576,5 нм. При равных молярных соотношениях Hb:NO HbO₂ полностью переходил в MtHb. Механизм этого взаимодействия может заключаться в окислении Fe²⁺ гема пероксинитритом (ONOO⁻), первоначально координирующимся с атомом Fe. Далее следует диссоциация ONOO⁻ и/или его преобразование до NO₃⁻. Другой предполагаемый механизм состоит в замещении молекулы O₂ на NO в силу того, что сродство атомов Fe к NO почти в 2×10⁵ раз больше, чем к O₂. Затем происходит окисление атомов Fe гемов в реакции O₂ с HbNO через ONOO⁻ [1]. Кроме того, часть NO будет расходоваться на взаимодействие с O₂, растворенным в буфере или диссоциировавшим из HbO₂. При этом образуется NO₂, который также реагирует с HbO₂ с образованием MtHb [2]. Повышение концентрации NO в растворе до соотношений HbO₂:NO = 1:12,5 (по гему) в наших экспериментах приводило к восстановлению MtHb до HbNO, о чем свидетельствует исчезновение максимумов при 499,0 нм и 629,0 нм и появление λ_{max} HbNO при 544,0 нм и 572,0 нм.

Таким образом, при возникновении в кровеносном русле высоких концентраций NO HbO₂ способен утилизировать свободнорадикальную молекулу, преобразуя ее в NO₃⁻ или HbNO. Однако накопление в ходе этого процесса таких концентраций MtHb, которые не могут быть восстановлены метгемоглобинредуктазной системой эритроцитов, очевидно, будет приводить к ухудшению кислородтранспортных характеристик крови.

1. Herold S. Reactions of deoxy-, oxy-, and methemoglobin with nitrogen monoxide. Mechanistic studies of the S-nitrosothiol formation under different mixing conditions / S. Herold, G. Rock // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278. – P. 6623-6634.

2. Kim-Shapiro D.B. Hemoglobin-nitric oxide cooperativity: is NO the third respiratory ligand? / D.B. Kim-Shapiro // Free Radic. Biol. Med. – 2004. – Vol. 36. – P. 402-412.

**ВЛИЯНИЕ МАЛЫХ ДОЗ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ
НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ И ЕЕ
РЕГУЛЯЦИЮ ЭЛЕКТРИЧЕСКИМИ СИГНАЛАМИ**

**Influence of small doses of ionizing radiation on photosynthetic activity of sprouts
of wheat and its regulation by electric signals**

Румянцев Е.А., Сухов В.С., Орлова О.В., Воденев В.А.

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, 603950,
Нижний Новгород, пр-т Гагарина д. 23
Тел.: 89877425245; e-mail: csanter@rambler.ru

Ионизирующее излучение (ИИ) оказывает влияние на многие физиологические процессы в растении. При исследовании воздействия малых доз ИИ необходимо оценивать и ответ организма на регулирующие факторы, к которым относятся потенциал действия и вариабельный потенциал (ВП). Целью нашего исследования стало изучение влияния малых доз ИИ на фотосинтетическую активность (ФА) проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и ее регуляцию электрическими сигналами.

Объектом исследования служили проростки пшеницы возрастом от 11 до 18 суток. ИИ (905r-90У, 1 см ниже прорастающих семян) действовало на проростки с момента посадки и в течение всего времени выращивания. Интенсивность облучения составляла – 1,04 сГр в сутки. Исследование ФА проводилось с использованием РАМ-флуориметра (Dual-РАМ-100) и газоанализатора (GFS-3000). Регистрация электрической активности осуществлялась внеклеточно с помощью стандартной электрофизиологической системы.

Показано, что с увеличением возраста проростков пшеницы как у опытных, так и у контрольных растений наблюдается тенденция к снижению ФА (уменьшение поглощения CO₂ на свету), что связано с замедлением ростовых процессов и накоплением продуктов фотосинтеза, замедляющих работу цикла Кальвина. Действие ИИ на проростки пшеницы вызывает снижение поглощения CO₂ на 11,9%, что обусловлено изменением ионной проницаемости мембраны и инактивацией отдельных фотосинтетических ферментов. При исследовании влияния ИИ на индуцированные ВП изменения ФА показано, что с 11 по 13 сутки ВП снижает поглощение CO₂ в опыте и контроле на 40-45%, с 13 по 18 сутки ингибирование поглощения увеличивается, достигая 73% у опытных и 60% у контрольных растений. Для некоторых параметров световой стадии, таких как квантовый выход фотосистемы I, нефотохимического тушения и квантового выхода потерь на донорной стороне характерно изменение с возрастом амплитуды индуцированных ВП ответов, а для квантового выхода фотосистемы II и фотохимического тушения на 14 сутки происходит изменение и направленности. Амплитуды изменений параметров световой стадии различны у контрольных и опытных проростков.

Таким образом, результаты экспериментов указывают на изменение ФА и ее регуляции электрическими сигналами под действием малых доз ИИ. Данные изменения могут быть связаны с нарушениями, как самого фотосинтетического аппарата, так и его регулирующей системы.

Работа поддержана грантами Президента Российской Федерации (МК-1869.2012.4) и РФФИ (12-04-00837-а).

**ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ СОСТОЯНИЯ В ПРОЦЕССАХ
ДЕНАТУРАЦИИ И РЕНАТУРАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНОГО ШАПЕРОНА КЛЕТОК *E. COLI* GROEL**

Intermediate states in denaturation and renaturation processes of *E. coli* molecular chaperone GroEL

Рябова Н.А., Марченков В.В., Селиванова О.М., Котова Н.В., Семисотнов Г.В.

Институт белка РАН, 142290, Пушкино, Московская обл., ул. Институтская, 4
Тел. +7(495)514-02-18; факс: +7(4967)31-84-35; e-mail: nina@vega.protres.ru

В настоящей работе проведено исследование равновесных и кинетических процессов денатурации и ренатурации олигомерного белка теплового шока клеток *Escherichia coli* – GroEL (Hsp60). Этот белок состоит из 14-ти идентичных субъединиц с молекулярной массой около 60 kDa каждая. Субъединицы содержат три хорошо разделенных домена и организованы в две взаимодействующие торцами гептамерные кольцевые структуры. Известно, что GroEL является молекулярным шапероном, участвующим вместе со своими лигандами (Mg-АДФ, Mg-АТФ) и ко-шапероном GroES в приобретении нативной (функционально-активной) конформации широким многообразием клеточных белков, как вновь синтезированных, так и денатурированных в результате различных стрессов. Поэтому ответ на вопрос – как сворачивается сам GroEL? – приобретает особый интерес.

Мониторинг процессов разворачивания и сворачивания GroEL осуществляется с использованием ряда физико-химических методов, отражающих наличие различных уровней структурной организации белка: кругового дихроизма в дальней ультрафиолетовой области, электрофорезов в нативных условиях и в поперечном градиенте мочевины, гель-хроматографии, рассеяния света и электронной микроскопии. В результате было показано следующее. Во-первых, в отсутствие лигандов (Mg-АДФ и Mg-АТФ) при низкой ионной силе (~0.02 M) GroEL разворачивается в две стадии, первая из которых отражает диссоциацию олигомерной структуры до частично свернутой мономерной формы, а вторая – ее окончательное разворачивание до клубкообразной конформации. Во-вторых, в этих условиях ренатурация GroEL происходит с образованием глобулярной мономерной формы с развитой третичной структурой через формирование раннего кинетического промежуточного состояния типа «расплавленная глобула». В-третьих, специфическая олигомеризация мономерной формы GroEL происходит только в присутствии его лигандов (Mg-АДФ или Mg-АТФ) и осуществляется через формирование кинетического метастабильного промежуточного олигомерного состояния – гептамерной кольцевой структуры, взаимодействующей с гептамерным ко-шапероном GroES. Присутствие GroES совершенно необходимо для специфической олигомеризации GroEL в условиях низкой стабильности гептамерного промежуточного состояния (низкие значения концентрации белка и ионной силы раствора) и не обязательно при высоких значениях концентрации белка и ионной силы раствора.

Работа поддержана грантами РФФИ № 09-04-00768-а, Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Госконтрактом Минобрнауки № 02.740.11.0295.

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СВОБОДНЫХ ПРЕДЕЛЬНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ РАЗЛИЧНОЙ ДЛИНЫ ЦЕПИ С МИТОХОНДРИЯМИ В ПРОЦЕССЕ РАЗОБЩЕНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ**Features of the interaction of free saturated fatty acids of different chain length with mitochondria in the process of uncoupling of oxidative phosphorylation****Самарцев В.Н., Рыбакова С.Р., Дубинин М.В., Григорьева Л.В., Чернядьева А.В.**Марийский государственный университет, 424001, Йошкар-Ола, пл. Ленина, 1
Факс:(836-2) 56-57-81; e-mail: samvic56@mail.ru

Свободные жирные кислоты при взаимодействии с митохондриями животных вызывают разобщение окислительного фосфорилирования и это их действие имеет большое значение в различных физиологических и патологических процессах [1]. Недавно в опытах на митохондриях печени установлено, что в отсутствие ионов кальция жирные кислоты являются не только индукторами разобщения окислительного фосфорилирования при участии ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров, но и регуляторами этого процесса [2, 3]. Представляет интерес выяснить, каким образом эффективность различных предельных жирных кислот: каприловой, каприновой, лауриновой, миристиновой, пальмитиновой и стеариновой, как индукторов и регуляторов разобщения окислительного фосфорилирования, зависит от их содержания во внутренней мембране митохондрий печени. В настоящей работе исследована модель, описывающая взаимодействие жирных кислот с гидрофобной областью внутренней мембраны митохондрий. Основываясь на этом, разработан метод определения коэффициентов распределения жирных кислот между липидной фазой внутренней мембраны и водной фазой при сохранении функциональной активности митохондрий. Установлено, что при равной разобщающей активности жирных кислот значение величины регуляторного эффекта минимально для каприловой кислоты и повышается по мере увеличения их гидрофобности, достигая максимального значения для стеариновой кислоты. Значение величины регуляторного эффекта увеличивается линейно при повышении содержания жирных кислот в гидрофобной области внутренней мембраны. При условии, что молекулы различных жирных кислот, находясь в гидрофобной области мембраны, одинаково эффективны как регуляторы разобщения, их удельная разобщающая активность отличается. Наиболее высокой разобщающей активностью обладает самая короткоцепочечная каприловая кислота. По мере увеличения длины ацильной цепи удельная разобщающая активность жирных кислот экспоненциально снижается. В этом случае составляющие разобщающей активности, характеризующие участие в разобщении ADP/ATP антипортера, аспартат/глутаматного антипортера и чувствительной к циклоспорину А структуры, изменяются в равной степени.

1. Skulachev V.P. / Biochim. Biophys. Acta, 1998. V. 1363. P. 100-124.
2. Самарцев В.Н., Марчик Е.И., Шамаргулова Л.В. / Биохимия, 2011. Т. 76. С. 264-273.
3. Самарцев В.Н., Кожина О.В., Марчик Е.И. / Биофизика, 2012. Т. 57. С. 267-273.

СИГНАЛ ГЛУТАМАТА В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА**Glutamate signal in heart mitochondria****Селин А.А.¹, Лобышева Н.В.², Нарциссов Я.Р.¹, Ягужинский Л.С.²**

1- НИИ Цитохиин и молекулярной фармакологии, Москва, Россия
2 – НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия

Согласно работе [1] в клетках сердца присутствует несколько типов глутаматных рецепторов. Согласно работам [2,3] связывание глутамата с рецептором сопровождается индукцией генерации АФК в клетках.

В настоящей работе предпринята попытка обнаружить присутствие глутаматного рецептора в митохондриях сердца и охарактеризовать его основные свойства.

Работа проводилась на суспензии митохондрий сердца в присутствии ротенона (2 мкМ) и сукцината (5 мМ). Измерялась скорость образования H₂O₂ с помощью AmplexRed.

Был обнаружен эффект стимуляции скорости образования H₂O₂ низкими (не субстратных) концентрациями глутамата. Концентрация глутамата, при которой достигался полумаксимальный эффект составляет 50 мкМ. Максимальное ускорение образования H₂O₂ составлял 400%. Этот эффект подавляется одним из ингибиторов глутаматных рецепторов — МК-801. Полученные результаты позволяют предполагать, что в митохондриях сердца действительно присутствует рецептор глутамата, который по своим свойствам качественно отличается от трех основных подгрупп глутаматных рецепторов. Он содержит специфический сайт аллостерического ингибирования, связывающий МК-801. Этот сайт обнаружен в подгруппе NMDA рецепторов. Однако предполагаемый митохондриальный рецептор не активируется под действием NMDA. Эффект глутамата потенциалзависим, т. к. эффект не наблюдается если добавлен разобщитель (пентахлорфенол 2мкМ), который сбрасывает потенциал на митохондриальной мембране.

В работе методом ингибиторного анализа определена локализация терминальной стадии процесса генерации H₂O₂ под действием глутамата. Показано, что эта реакция локализована в P- и N- центрах комплекса III дыхательной цепи. Кроме того была проведена серия исследований в условиях отсутствия сукцината и ингибирования комплекса I ротеноном, в условиях значительного повышения концентрации NADH в митохондриях. Потенциал на мембране митохондрий был создан добавлением АТФ (1мМ). При этом ингибиторным анализом было строго установлено существование шунта между НАДН и комплексом III (НАДН — СДГ — комплекс III), активность которого достаточна, что бы обеспечить синтез 20-30 мкМ H₂O₂. Полученные результаты обсуждены в рамках гипотезы о роли глутамата в митохондриях как специфического медиатора глутаматного рецептора сигнал которого регулирует скорость синтеза H₂O₂ в митохондриях.

1. Gill SS и др. / Brain Res Bull, 1998. 46(5). С.429-34.

2. Guemez-Gamboa A и др. / J Neuropathol Exp Neurol, 2011. 70(11). С.1020-35.

3. Ha JS и др. / Exp Cell Res, 2010. 316(10). С.1651-61.

КАРБОАНГИДРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ, АССОЦИИРОВАННАЯ С КОМПЛЕКСОМ CF_1CF_0 ХЛОРОПЛАСТОВ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ**Carbonic anhydrase activity associated with CF_1CF_0 complex of higher plant chloroplasts****Семенихин А.В. , Золотарёва Е.К.**Институт ботаники им. Н.Г.Холодного НАН Украины, г. Киев, Украина, 01601
Тел: +380(44)272-32-31; факс: +380(44) 272-32-31; e-mail: e.zolotareva@mail.ru

Диффузия протонов от светозависимых протонных помп к АТФсинтазе, как мы предполагаем, облегчается за счет обратимого протонирования бикарбоната, присутствующего в значительном количестве в тилакоидных мембранах. Этот процесс катализируется карбоангидразой (КА), несколько форм которой найдено в тилакоидах. Одна из форм КА ассоциирована с воду-окисляющим комплексом фотосистемы II и, возможно, препятствует локальному повышению концентрации протонов вблизи центров их освобождения за счет связывания последних с бикарбонатом. Целью работы была проверка предположения о существовании карбоангидразной активности в ассоциации с АТФсинтазным комплексом тилакоидных мембран.

Тилакоиды изолировали из свежих листьев шпината. Концентрацию хлорофилла (хлф.) определяли по Арнону (1949), белок – по Лоури (1951). К мембранам (0,2 мкг хлф/мкл), суспендированным в 50 мМ Нерес-NaOH (pH 7,5), 10 мМ $MgCl_2$ и 100 мМ сорбитолу добавляли 0,2% дигитонин. После двух последовательных центрифугирований при 1000 г (3 мин) и 29 000 г (30 мин) и 4 °С супернатант собирали, после чего стромальную фракцию мембранных фрагментов осаждали в течение 90 мин при 150 000 г и 4 °С.

Бесцветный нативный электрофорез мембранных фрагментов (CN-PAGE) проводили, в основном, согласно [1]. Для анализа субъединичного состава полипептидов нативного геля, белковые полосы вырезали и проводили ДДС-денатурирующий электрофорез во втором направлении, субъединицы окрашивали Кумасси бриллиантовым синим.

Для определения локализации АТФазной активности гели после CN-PAGE погружали на ночь в раствор, содержащий Na-АТФ, 0,05% $Pb(NO_3)_2$, 5 мМ АТФ, 5 мМ $MgCl_2$ и 50 мМ глицин-NaOH, (pH 8,6). По окончании реакции гели промывали водой и на 10-15 мин помещали в 0,3% раствор Na_2S . Места локализации АТФазы проявлялись в виде коричневых полос из-за образования PbS . Визуализацию карбоангидразной активности в CN-PAGE проводили по методу Эдвардса и Паттона после инкубации в 44 мМ вероналовом буфере с 1 мл 0,2% бромтимоловым синим на льду в течение 30 мин. Затем гель переносили в воду, насыщенную CO_2 при 0°С. Локализацию КА регистрировали по переходу синей окраски индикатора в желтую.

После проявления геля CN-PAGE в присутствии АТФ и нитрата свинца была выявлена единственная белковая полоса, имеющая АТФазную активность. Молекулярный вес этого полипептида соответствовал приблизительно 515-525 кДа. В параллельном эксперименте по локализации КА было показано, что этом же полипептидном комплексе присутствует и карбоангидразная активность. ДДС-электрофорез полипептидного комплекса 515-525 кДа выявил наличие всех субъединиц АТФсинтазы и олигомера субъединицы III. Данные подтверждают сделанное предположение об ассоциации одной из форм КА с комплексом тилакоидной АТФсинтазы.

**НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНОЙ АДАПТАЦИИ МОЗГА
ЗИМОСПЯЩИХ ЖИВОТНЫХ****Neurochemical mechanisms of the brain cell adaptation of the hibernators****Семенова Т.П., Захарова Н.М.**

Институт биофизики клетки РАН,
142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская ул.3
Тел: +8(495)623-74-67, доб. 246; факс: +8(4967)33-05-09; e-mail: tat_semenova@mail.ru

Процесс гибернации представляет собой уникальный образец адаптации животных к действию экстремальных факторов внешней среды. Изменения функционального состояния и биохимического статуса мозга зимоспящих животных, адаптивных возможностей их организма в переходные периоды находятся под контролем ЦНС. Задача данного исследования состояла в сравнительном изучении характера адаптивных возможностей организма зимоспящих животных в разные фазы годового цикла и уровня активности моноаминергических систем, нейрональной NO – синтазы, ранних генов и липидов мембран клеток различных отделов головного мозга. Эксперименты выполнены на 57 якутских сусликах *Spermophilus undulatus* массой 500 – 800 г. Обнаружено, что уровень активности моноаминергических систем претерпевает значительные сезонные изменения. В осенний период у животных выявлено превалирование уровня содержания 5-ОТ и понижение уровня НА в структурах мозга, активности 5-ОТ 1А рецепторов мозговых структур, увеличение доли наиболее гидрофобных липидов в суммарном спектре всех липидов нейрональных мембран. Отмеченные биохимические изменения развиваются у нормотермных животных при температуре их мозга +36 °С. Подобный характер биохимических изменений углубляется во время спячки. В период выхода животных из состояния гибернации отмечено преобладание активности НА системы мозга, увеличение уровня активности NO – синтазы на 30-40% ($p < 0,001$), понижение доли гидрофильных липидов нейрональной мембраны, а также активация ранних генов в ряде структур головного мозга по сравнению с периодом спячки. Наблюдаемые изменения развиваются уже при температуре мозга +25 °С, т.е. предшествуют процессу полного пробуждения животных. Результаты проведенного исследования и данные литературы свидетельствуют о том, что системная перестройка метаболических процессов в нервных клетках головного мозга зимоспящих животных в течение годового цикла определяет высокий уровень их адапционных возможностей к действию экстремальных факторов внешней среды.

**МЕХАНИЗМ ГЕНЕРАЦИИ ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА В «РАЗОБЩЕННЫХ»
МЕМБРАННЫХ ПРЕПАРАТАХ ФОТОСИСТЕМЫ 2 БЕЗ КАЛЬЦИЯ. РОЛЬ
АНИОНОВ ХЛОРА****Mechanism of electron transport generation in the “decoupled” Ca²⁺-depleted
photosystem II membranes. Role of Cl⁻ anions****Сёмин Б.К.¹, Давлетшина Л.Н.¹, Иванов И.И.¹, Рубин А.Б.¹, Сэйберт М.²**

1 – Кафедра биофизики биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12;

2 – Energy Sciences Directorate, National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado 80401, USA

Тел.: +7(495)939-33-15; факс: +7(495)939-11-15; e-mail: semin@biophys.msu.ru

Экстракция Ca²⁺ (без использования хелатора) из кислород-выделяющего комплекса фотосистемы 2 (ФС2) ингибирует выделение O₂ без значительного подавления свето-зависимого восстановления экзогенного акцептора электронов 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ). Хотя природа субстрата окисления (источника электронов для восстановления ДХФИФ) и продуктов окисления этого субстрата в «разобщенных» препаратах ФС2 [1] не была определена, было установлено, что в отсутствие анионов Cl⁻ восстановление ДХФИФ не происходит. В данной работе мы исследовали природу субстрата окисления и продуктов этого процесса и выяснили, что субстратом окисления в препаратах ФС2 без кальция [ФС2(-Ca)] является вода. С целью идентификации продуктов неполного окисления воды мы исследовали генерацию активных форм кислорода, а именно, супероксидного анион-радикала O₂⁻ и перекиси водорода H₂O₂. В процессе изучения механизма образования O₂⁻ в аэробных и анаэробных условиях в препаратах ФС2(-Ca), а также в присутствии и в отсутствие анионов Cl⁻, мы обнаружили, что: 1) O₂⁻ образуется на акцепторной стороне в результате восстановления кислорода; 2) экстракция анионов Cl⁻ из препаратов ФС2(-Ca) не ингибирует окисление воды; 3) экстракция анионов Cl⁻ уменьшает эффективность восстановления экзогенного акцептора электронов на акцепторной стороне «разобщенных» препаратов ФС2(-Ca). В отсутствие анионов хлора поток электронов с донорной стороны ФС2(-Ca) переключается с экзогенного акцептора электронов на O₂, что приводит к увеличению скорости генерации O₂⁻, и, в свою очередь, в результате реакции дисмутации, к увеличению скорости генерации перекиси водорода. В отличие от процесса генерации O₂⁻, синтез большей части H₂O₂ имеет место на донорной стороне ФС2(-Ca), что свидетельствует об образовании перекиси водорода из воды. Полученные нами результаты свидетельствуют, что 1) субстратом окисления в «разобщенных» препаратах ФС2(-Ca) является вода; 2) продуктом окисления в «разобщенных» препаратах ФС2(-Ca) является H₂O₂; 3) анионы хлора не участвуют в окислении воды в препаратах ФС2(-Ca); 4) экстракция анионов Cl⁻ из препаратов ФС2(-Ca) сопровождается переключением электронного потока на акцепторной стороне ФС2 с экзогенного акцептора электронов на молекулярный кислород, что приводит к увеличению скорости генерации O₂⁻ и H₂O₂.

[1] Semin, B.K., Davletshina, L.N., Ivanov, I.I., Rubin, A.B., and Seibert, M. (2008) Photosynth. Res., 98, 235-249.

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ИНГИБИРОВАНИЯ ЭЛЕКТРОННОГО
ТРАНСПОРТА В ПРЕПАРАТАХ ФОТОСИСТЕМЫ 2 АНИОНАМИ ФТОРА****Investigation of electron transport inhibition mechanism in PSII preparations by
fluorine anions****Семин Б.К., Ловягина Е.Р., Иванов И.И., Рубин А.Б.**

Кафедра биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, 119234,
Москва, Ленинские Горы, 1, стр.12

Тел.: +7(495)939-33-15; факс: +7(495)939-11-15; e-mail: seminbk@mail.ru

Проведено сравнительное исследование влияния анионов фтора на электронный транспорт в мембранных препаратах ФС2 (ВВУ-тип; выделение кислорода и восстановление экзогенного акцептора электронов 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ)) и в препаратах ФС2, не содержащих катиона Ca^{2+} в кислород-выделяющем комплексе (восстановление ДХФИФ). В нативных препаратах ФС2 выделение O_2 ингибируется при меньших концентрациях анионов F^- , чем восстановление ДХФИФ (т.е. наблюдается эффект "разобщения" функциональной активности). Ингибирующий эффект анионов фтора ослабляется при повышении в системе концентрации анионов Cl^- . В препаратах ФС2 без Ca^{2+} анионы F^- также ингибируют восстановление ДХФИФ и даже с большей эффективностью, чем в нативных препаратах ФС2 (константы ингибирования ~ 5 и ~ 30 мМ, соответственно). Предполагается, что в нативных препаратах ФС2 инактивация функциональной активности фторид-ионами происходит в два этапа. Вначале за счет инактивации катиона Ca^{2+} в результате его взаимодействия с анионами фтора подавляется выделение кислорода. Последующее ингибирование электронного транспорта (восстановление ДХФИФ) обусловлено, по-видимому, действием анионов фтора на акцепторную сторону ФС2.

**ОЦЕНКА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ НЕРВНОЙ
ТКАНИ ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МЕТОДОВ МАТЕМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА**

**Estimation of the energy state of nerve tissue in cerebral ischemia by the methods of
mathematical analysis**

Сергеева Т. Ф.¹, Мошкова А.Н.², Ерлыкина Е. И.¹, Хватова Е.М.¹

¹ – ГБОУ ВПО НижГМА Минздравсоцразвития России,
603005, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

² – ФГБОУ ВПО НГТУ им. Р.Е. Алексеева,
603950, ГСП-41, Нижний Новгород, ул. Минина, 24
Тел.: +7(831)465-41-01; e-mail: prazina@yandex.ru

Целью исследования явилась оценка и прогнозирование энергетического состояния мозга по содержанию АТФ и активности митохондриальной и цитоплазматической креатинкиназы (миКК и цтКК) на разных сроках нарушения мозгового кровообращения.

Ишемия головного мозга моделировалась путем билатерального двойного лигирования общих сонных артерий. Использовали регрессионную модель, аппроксимирующую зависимость между активностью миКК и уровнем АТФ в ткани мозга, коэффициенты которой находили методом наименьших квадратов Ньютона или сопряженных градиентов. Исследовали математическую зависимость активности цтКК от активности миКК на разных сроках ишемии.

Проведенные экспериментальные исследования показали, что ишемия головного мозга приводит к значительному снижению содержания АТФ на 33% и изменению активности изоферментов КК. Установлено достоверное уменьшение активности миКК примерно на 21% в условиях острой ишемии, в то же время активность цтКК несколько растет относительно интактных животных.

При увеличении продолжительности ишемии мозга до 18 часов выявлен незначительный прирост уровня АТФ (до 8%) и дальнейший рост активности цтКК, при этом активность миКК также увеличивается по сравнению с острой ишемией, но остается сниженной относительно интактных животных.

С использованием численных методов математического анализа была получена регрессионная модель, аппроксимирующую зависимость активности миКК и содержания АТФ в мозге интактных животных и в условиях ишемии. Был выполнен расчет активности миКК по содержанию АТФ, а также расчет уровня АТФ по активности миКК в группе интактных животных и в условиях 30 минутной и 18 часовой ишемии. Относительная ошибка расчета колебалась от 1,9 до 13,2% и укладывалась в интервал допустимой погрешности (меньше 20%) аппроксимирующей функции. Это свидетельствовало о том, что регрессионная модель хорошо объединяла зависимые показатели креатинкиназной реакции. Исследование каталитических свойств изоферментов КК выявило колебательный характер зависимости активности цтКК от активности миКК как у интактных животных, так и в условиях ишемии.

Таким образом, использование метода аппроксимации эмпирических зависимостей дает возможность расчетным способом прогнозировать активность цтКК и миКК и проводить оценку уровня АТФ в нервной ткани на разных сроках церебральной ишемии.

**ВОЗДЕЙСТВИЕ ЦИТОСТАТИКА 5-ФТОРУРАЦИЛА И ТРАНСПЛАНТАЦИИ
КОСТНОГО МОЗГА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК СИСТЕМЫ
КРОВИ МЫШЕЙ**

**Effect of 5-fluorouracil and bone marrow transplantation on the functional activity
of blood system cells in mice**

**Сергиевич Л.А.¹, Карнаухова Н.А.¹, Карнаухова Е.В.¹, Смирнов А.А.²,
Карнаухов В.Н.¹, Манохина И.А.¹, Карнаухов А.В.¹**

¹ – Институт биофизики клетки РАН, 142290, г. Пущино, ул. Институтская, 3

² – Институт экспериментальной и теоретической биофизики РАН,
142290, г. Пущино, ул. Институтская, 3

Тел: +7(4967)73-93-05; факс: +7(4967)33-05-09; e-mail: nakarnaukhova@mail.ru

В данной работе исследовали функциональную синтетическую активность ядерных клеток костного мозга (КМ), селезенки, тимуса и крови мышей линии C57BL/6 под действием 5-Fu, а также под действием 5-Fu с последующей трансплантацией клеток КМ от мышей-доноров C57BL/6 – Tg(CTB-EGFP)10sb/J, содержащих в хромосоме 15 трансген egfp. Мыши были получены при содействии А.М. Малашенко из Научного Центра биомедицинских технологий РАМН, куда они поступили из Jackson Laboratory, Bar Harbor, США с любезного разрешения А.В. Червонского. В работе также оценена приживаемость EGFP+ клеток КМ в органах системы крови мышей-реципиентов при трансплантации КМ без иммуносупрессии и при трансплантации КМ с предварительным введением 5-Fu. Исследования проводили в период с 7 по 15 день после введения 5-Fu (6-14 дни после трансплантации КМ). Синтетическую активность клеток, окрашенных флуорохромом акридиновым оранжевым, определяли по параметру α , представляющему собой отношение интенсивностей флуоресценции в красной (640 нм) области спектра, обусловленной димерами красителя, связанными с односпиральными нуклеиновыми кислотами (ПНК), и в зеленой (530 нм) области спектра, обусловленной мономерами красителя, интеркалированными в двухспиральные нуклеиновые кислоты (ДНК) [1]. Результаты исследований были обработаны с помощью программы "Cell Analyzer 2" [2]. Было показано, что без введения 5-Fu трансплантация EGFP+ клеток КМ донора не вызвала достоверных изменений параметра α ядерных клеток исследуемых органов мышей-реципиентов по сравнению с контролем. Максимальные значения параметра α наблюдались в клетках КМ, селезенки и крови на 10 день как после введения 5-Fu, так и 5-Fu совместно с КМ донора, что связано с активацией гемопоэза в КМ и селезенке и выходом незрелых форм клеток в кровь в восстановительный период после повреждающего действия 5-Fu. На 14 день в клетках КМ и селезенки происходило снижение параметра α , определяемое депрессией синтетических процессов в клетках в этот период. С 7 по 15 день наблюдались инволюция тимуса и снижение параметра α тимоцитов. При трансплантации КМ с предварительным введением 5-Fu наблюдалась более высокая концентрация EGFP+ клеток в органах системы крови реципиента по сравнению с трансплантацией КМ без иммуносупрессии. Трансплантация КМ приводит к повышению выживаемости животных после воздействия 5-Fu.

1. В.Н.Карнаухов Спектральный анализ в клеточном мониторинге состояния окружающей среды. Наука, Москва, 2001, 186 с.

2. Карнаухов В.А., Карнаухова Н.А., Сергиевич Л.А., Карнаухов В.Н. III Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии. Москва, 2010. Сборник материалов. Т.4, С.43-46.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛПС И МОРФОЛОГИИ КЛЕТОК ДИКОГО ТИПА И *ipt*-ТРАНСФОРМАНТА ФОТОТРОФНОЙ ПУРПУРНОЙ БАКТЕРИИ *RHODOBACTER SPHAEROIDES* МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Study of LPS and cell morphology of wild-type and *ipt*-transformant of phototrophic purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides* by atomic force microscopy

Сердюк О.П.¹, Санникова Е.П.¹, Смолыгина Л.Д.¹, Иванова Е.П.¹, Мачулин А.В.²

1-Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 142290 г. Пущино, Московская обл., Институтская ул., 2. Тел.: 8(4967)732608; факс: 8(4967)330532;
e-mail: serdyuko@rambler.ru

2-Институт биофизики клетки РАН,
142290 г. Пущино, Московская обл., Институтская ул., 3

Впервые методом электропорации проведена трансформация фототрофных пурпурных бактерий *Rhodobacter sphaeroides* rGA482 вектором с геном *ipt* биосинтеза фитогормона цитокинина и показана его экспрессия.

Методами АСМ и электронной микроскопии установлены изменения морфологии трансформированных клеток. У них выявлено существенное уменьшение числа жгутиков и образование капсулярных структур вокруг клеток. На поверхности клеток дикого типа обнаружены сферические образования по форме и размерам подобные фагам, в то время как поверхность трансформированных клеток покрывали углубления. Профили сечений фагоподобных частиц клеток дикого типа и углублений на поверхности трансформированных клеток совпадали по размерам. Это дало основание предположить, что обнаруженные углубления могли быть местами связывания утраченных фагоподобных структур. Аналогичная картина была получена в работе [1] при сравнении поверхности энтеробактерий с фагами и после их удаления в результате обработки клеток ультразвуком. В нашем случае фагоподобные структуры могли быть утрачены в результате изменений их наружной мембраны после трансформации.

Было обнаружено, что внешний слой поверхности клеток дикого типа представлен длинными, волнистыми структурами. Похожие структуры наблюдали и у трансформированных клеток, но они были более короткими и имели более плотную упаковку. Было сделано предположение, что такие деформации обусловлены изменениями в составе липополисахаридов (ЛПС) наружной мембраны клеточной стенки. Это подтверждено результатами биохимических исследований: уменьшением степени агглютинации трансформированных клеток в 4% NaCl, снижением содержания в них ЛПС и О-антигена.

Таким образом, установлено влияние цитокининов, синтезируемых в трансформированных бактериях, на биосинтез ЛПС – фактора токсичности энтеробактерий, что может найти применение в медицине при исследовании патогенеза.

1. Dubrovin E.V. et al. Atomic force microscopy investigation of phage infection of bacteria/
2. Langmuir, 2008. Vol. 24. P. 13068-13074.

**НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДОВ ЯМР И МРТ В ИССЛЕДОВАНИИ
МЕЖКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА ВОДЫ В РАСТЕНИЯХ****Potentials of NMR and MRI methods in study of intercellular water
transport in plants****Сибгатуллин Т.А.¹, Vergeldt F.J.², Gerkema E.², Анисимов А.В.¹, Van As H.²**

- 1 – Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111, Казань, ул. Лобачевского, 2, а/я 30
2 – Laboratory of Biophysics and Wageningen NMR Centre, Wageningen University, Dreijenlaan 3, 6703 HA Wageningen, The Netherlands
Тел: +7(843)231-90-19; факс: +7(843)292-73-47; e-mail: timsdance@mail.ru

Транспорт воды – один из ключевых процессов жизнедеятельности растений. Клетки различных тканей растения в зависимости от их функций могут по-разному регулировать проницаемость мембран и плазмодесм, связывающих протопласты соседних клеток. В результате, для исследования реакций растения на внешние воздействия (например, водный стресс) необходимы методы, позволяющие на целом растении проводить измерения проницаемости межклеточных транспортных путей в различных тканях. Метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР) зарекомендовал себя как наиболее информативный в исследовании транспортных процессов благодаря возможности неинвазивного измерения параметров переноса воды [1].

В работе продемонстрирован спектр возможностей методов ЯМР диффузометрии и релаксометрии и их комбинаций с магнитно-резонансной томографией (МРТ) для исследования межклеточного переноса воды в масштабах от субклеточного уровня до целого растения. Предложен метод анализа корреляции между временем спин-спиновой релаксации ядерной намагниченности и наблюдаемым коэффициентом диффузии воды (DRCOSY), позволяющий оценить спектр проницаемости межклеточных транспортных путей воды и ширину распределения клеток по размеру в гетерогенных растительных объектах. В случае медленного обмена между компартментами клетки метод DRCOSY позволяет исследовать такие субклеточные процессы, как цитоплазматическое течение [2,3].

Техника МРТ позволила пространственно разрешить не только сигнал намагниченности, но так же все доступные методам ЯМР параметры исследуемого объекта. Разработан метод анализа данных диффузионно-взвешенной МРТ, с помощью которого получены карты проницаемости мембран клеток и размера клеток в гетерогенных растительных объектах [4]. В случаях, когда недостаточно использования МРТ для пространственного разрешения сигнала от клеток с различной функциональностью, перспективным является применение комбинации методов МРТ и анализа корреляции DRCOSY.

1. Van As H. / J. Exp. Bot., 2007. Vol.58. P.743-756.
2. Sibgatullin T.A., de Jager P.A. et al. / Biophysics, 2007. Vol.52. P.196-203.
3. Sibgatullin T.A., Vergeldt F.J., Anisimov A.V., Van As H. / Doklady Biological Sciences, 2006. Vol.411. P.488-490.
4. Sibgatullin T.A., Vergeldt F.J., Gerkema E., Van As H. / Eur. Biophys. J., 2010. Vol.39. P.699-710.

**ИЗМЕНЕНИЕ УПРУГИХ СВОЙСТВ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ ПРИ
ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРАМИ**

**Change of elastic parameters of lipid bilayer caused by the interaction with
photosensibilizers**

Синцов М. Ю.^{1,3}, Парьева Е. С.^{1,3}, Антоненко Ю. Н.², Башкиров П. В.¹

1 – Институт физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН,
119071, Москва ГСП-1, Ленинский проспект, 31, корп. 4

2 – НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского
государственного университета им. М. В. Ломоносова, Россия,
119899, г. Москва, Воробьевы горы, кор. А

3 – Московский физико-технический институт (государственный университет),
141700, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский переулок, 9.

Большинство клеточных процессов, связанных с морфогенезом мембран, зависит от упругих свойств липидного бислоя, в частности, от сопротивления мембраны изгибу, которое характеризуется модулем изгибной жесткости. Модуль изгиба мембраны определяется ее липидным составом, изменение которого может приводить к серьезным нарушениям клеточных функций. Окисление липидов – наиболее типичный патологический процесс, связанный с изменением химического состава мембраны, который лежит в основе повреждения клеток в случае инфаркта миокарда, инсульта и многих других заболеваний. Было показано, что при сильном окислении нарушаются барьерные свойства мембраны, что приводит к гибели клетки. Однако до сих пор неизвестно, как при этом изменяются упругие свойства мембраны.

В данной работе мы провели исследование влияния окисления липидов на механические параметры липидного бислоя. В качестве модельной системы использовалась мембранная нанотрубка (НТ), вытягиваемая из плоской бислоистой мембраны. Был разработан метод, позволяющий следить за изменениями модуля изгиба мембраны НТ. Окисление липидов производилось с помощью фотосенсибилизаторов, которые адсорбировались на поверхности мембраны и затем активировались светом (длина волны = 650 нм) в течении 60 сек. Было показано, что окисление липидов приводит к постепенному уменьшению жесткости мембраны в 2–3 раза. При дальнейшем облучении (около 300 сек) в мембране начинают образовываться поры, что со временем приводит к разрушению НТ и мембраны. Таким образом, мы показали, что окисление липидов приводит к значительному изменению упругих свойств мембраны, которое предвещает нарушение ее барьерных функций.

**ВЛИЯНИЕ КАЛЬПОНИНО-ПОДОБНОГО 40 КДА БЕЛКА МИДИИ НА
КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ F-АКТИНА В ЦИКЛЕ ГИДРОЛИЗА АТФ****Effect of calponin-like 40 kDa protein of the mussel on conformational changes of
F-actin in ATP hydrolysis cycle.****В.В. Сиренко¹, А.О. Симонян¹, А.В. Добржанская², Н.С. Шелудько², Ю.С.
Боровиков¹**

¹ Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4;
факс: (812)247-03-41, электронная почта: boroviko@mail.cytspb.rssi.ru

² Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, 690041, Владивосток, ул.
Пальчевского, 17, электронная почта: sheludko@stl.ru; факс: (423) 231-09-00

Используя «теневые» одиночные мышечные волокна кролика, реконструированные экзогенным G-актином, меченным по Cys-374 флуоресцентным красителем 1,5-IAEDANS в одних экспериментах и модифицируя F-актин ФИТЦ-фаллоидином- в других, методом поляризованной флуоресценции изучали влияние недавно открытого кальпонино-подобного белка запирательных мышц мидии на конформационные перестройки актиновых молекул в процессе моделирования цикла гидролиза АТФ. О конформационных перестройках актиновых мономеров судили по изменению углов наклона флуоресцентных зондов при моделировании «слабосвязанного» состояния актомиозина в присутствии АТФ и «сильносвязанных» – в присутствии АДФ и без нуклеотидов. Ингибиторное действие кальпонино-подобного белка мидии на АТФазную активность сопровождалось молекулярными перестройками актиновых мономеров, в частности, С-концевого участка субдомена-1 актина и центральной части актинового филамента на границе соприкосновения трех соседних мономеров, к которым присоединялся ФИТЦ-фаллоидин. Эти конформационные изменения затрагивали «сильносвязанное» состояние актомиозина, ослабляя его и «выключая» актиновые мономеры. Влияние 40 кДа белка мидии на тонкие филаменты выражалось в увеличении жесткости актиновых нитей, о чем можно было судить по уменьшению значений угла

Результаты позволяют предположить участие 40 кДа белка в регуляции сокращения запирательных мышц мидии *Srenomytilus grayanus*, из которых они были выделены.

РОЛЬ ЦЕРАМИДОВ В ИЗМЕНЕНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ КЛЕТОК К ДЕЙСТВИЮ КСЕНОБИОТИКОВ

Role of ceramides in changes of functional activity of proteins associated with cell resistance to xenobiotics

Слобожанина Е.И., Петрович В.А., Козлова Н.М.

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»,
220072, Минск, ул. Академическая, 27

Тел.: +(375)172-842-633; факс + (375)172-842-359; e-mail slobozhanina@ibp.org.by

Церамиды участвуют в трансдукции сигнала в клетке и играют важную роль в таких клеточных процессах как апоптоз и клеточная пролиферация. Хотя точный механизм осуществления церамидами биологических функций до конца не выяснен, исследования последних лет указывают на то, что изменения в метаболизме церамидов могут быть ответственны за приобретение клетками множественной лекарственной устойчивости. До сих пор не ясен вопрос о влиянии церамидов на функциональную активность белков-транспортеров ксенобиотиков в клетках крови, в том числе и белков семейства MRP, ассоциированных с устойчивостью клеток к действию ксенобиотиков. Данные о локализации этих белков в плазматической мембране противоречивы: существуют как сведения о расположении MRP-белков в липидных рафтах, так и противоположные мнения. Ранее в нашей лаборатории показано, что экзогенные и эндогенные церамиды способны вызывать нарушение структуры упорядоченных липидных доменов (рафтов) в мембранах эритроцитов. Цель данной работы – изучить влияние церамидов на функциональную активность MRP-белков. Об активности этих белков судили по параметрам экспорта из клеток конъюгатов глутатиона с монохлорбиманом. Накопление эндогенных церамидов в мембранах эритроцитов достигалось обработкой клеток сфингомиелиназой.

Показано, что инкубация эритроцитов человека *in vitro* со сфингомиелиназой (0,025 U/мл, в течение 1ч) приводила к повышению скорости выхода биман-S-глутатиона из эритроцитов в среднем 30-35% по сравнению с контрольными эритроцитами. В качестве экзогенных церамидов нами были использованы короткоцепочечные C2- и C6-церамиды, которые легко проникают в клетку. Установлено, что после инкубации эритроцитов в среде, содержащей 50 мкМ C2- или C6-церамидов, также происходит возрастание скорости выхода биман-S-глутатиона из клеток. Поскольку изменение скорости экспорта конъюгатов глутатиона может быть связано с влиянием сфингомиелиназы и церамидов на активность ферментов, катализирующих образование конъюгатов, также было изучено влияние использованных условий обработки клеток на активность глутатион-S-трансферазы в эритроцитах. После инкубации эритроцитов со сфингомиелиназой и экзогенными C2- и C6-церамидами активность глутатион-S-трансферазы практически не отличалась от активности фермента в контрольных клетках.

Таким образом, используя эритроциты в качестве модельной системы, мы получили экспериментальные доказательства участия церамидов в регуляции функциональной активности белков-транспортеров ксенобиотиков.

КИНЕТИКА АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВ, ИНДУЦИРУЕМОЙ АМФИФИЛЬНЫМИ ПЕПТИДАМИ; МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ БЕЛКОВЫХ СТРУКТУР

Kinetics of protein aggregation induced by amphiphilic peptides: Morphological properties of the protein supramolecular structures

Смирнова Е.Ю., Артемова Н.В., Гурвиц Б.Я.

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,
119071, Москва, Ленинский проспект 33, Россия.
Тел.: +7-962-954-98-25; факс: +7(495) 954-27-32; e-mail: smeu1989@mail.ru

В настоящее время весьма актуальным представляется выявление низкомолекулярных регуляторных агентов, индуцирующих или подавляющих агрегацию белков и участвующих в формировании определенных надмолекулярных ассоциатов, отличающихся по форме и размерам. Целью настоящей работы являлось изучение молекулярных механизмов агрегации модельных белковых субстратов, индуцируемой под действием ряда синтетических амфифильных пептидов в различных условиях. С использованием динамического лазерного светорассеяния, турбидиметрии, флуориметрии и кругового дихроизма исследована кинетика индуцируемой дитиотрептолом агрегации модельных белковых субстратов, α -лактальбумина коровьего молока (рI 4-5) и лизоцима куриного яйца (рI 9-11), в присутствии противоположно заряженных пептидов, Arg-Phe и Asp-Phe соответственно. Показано, что агрегация белков может индуцироваться пептидами в условиях, при которых белки в отсутствие лигандов не агрегируют. На примере взаимодействия дрожжевой алкогольдегидрогеназы (рI 5-6) с пептидами в неденатурирующих условиях впервые обнаружен феномен агрегации «нативных» белков, индуцируемой амфифильными низкомолекулярными лигандами [1]. С помощью трансмиссионной электронной и атомно-силовой микроскопии показано, что образующиеся таким образом агрегаты отличаются по морфологическим свойствам от частиц, наблюдаемых при термоиндуцированной агрегации этого белка. Продемонстрирована также трансформация формы и размеров агрегатов α -лактальбумина и лизоцима под действием пептидов. В присутствии пептидов наблюдалось образование надмолекулярных структур, состоящих из глобулярных частиц диаметром 2–5 нм, способных выстраиваться в нитевидные разветвленные цепочки длиной около 200 нм. В отсутствие пептидов происходило формирование лишь аморфных агрегатов. Полученные данные свидетельствуют об образовании комплексов пептид–белок на основе электростатических и гидрофобных взаимодействий. Исследовано взаимодействие агентов, влияющих на агрегацию, с интермедиатами белковых структур, образующимися на различных стадиях процесса агрегации. Представляется возможным применение коротких амфифильных пептидов для структурирования белковых агрегатов с заданными свойствами, что актуально при решении биотехнологических и медицинских задач.

Работа поддержана программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 11-04-00932-а).

**АНАЛИЗ ВЕЛИЧИН СДВИГОВ АТОМОВ В ПРОЦЕССЕ СВОБОДНОГО
КРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКОГО УТОЧНЕНИЯ ПОЗВОЛЯЕТ ВЫЯВЛЯТЬ
АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ КОНФОРМАЦИИ БОКОВЫХ ЦЕПЕЙ**

The values of atomic shifts in unrestrained refinement can hint alternative conformations.

Соболев О.В., Лунин В.Ю.

Институт математических проблем биологии РАН,
142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, 4.
Тел.: +7(4967)318540; факс: +7(4967)318500; e-mail: oleg@impb.psn.ru

В настоящее время уточнение без стереохимических ограничений (свободное уточнение) часто применяется к хорошо упорядоченным участкам полипептидной цепи на заключительных этапах определения структуры белков по данным рентгеновского рассеяния при наличии экспериментальных данных атомного разрешения. Однако при этом стереохимические ограничения сохраняются для плохо упорядоченных фрагментов, поскольку иначе такие фрагменты существенно искажаются. Искажение геометрии фрагмента в процессе свободного уточнения может быть, в свою очередь, использовано для идентификации боковых групп, присутствующих в исследуемом кристалле в альтернативных конформациях (АК) [1-2].

Выявление АК является необходимым и трудоемким этапом исследования структуры при высоком разрешении. Разработанная нами методика позволяет облегчить этот процесс, так как позволяет выявить участки структуры, обладающие АК с наибольшей вероятностью. Предложенная методика заключается в проведении нескольких циклов свободного уточнения для полной модели структуры и последующего визуального [1] или автоматизированного [2] анализа сдвигов атомов в результате такого уточнения.

При использовании автоматизированной процедуры решение о наличии АК принимается либо по результатам сравнения величин атомных сдвигов с предопределенным пороговым значением, либо путем сравнения условных вероятностей обнаружения достигнутых величин сдвигов, при условии нахождения цепи в одиночной или множественных конформациях соответственно. Для изучения характера подвижности атомов разного типа при свободном уточнении, определения оптимальных параметров метода и проверки эффективности предсказания был проведен анализ 225 структур атомного разрешения из Protein Data Bank.

Разработанные программы для построения диаграмм и анализа атомных сдвигов доступны по адресу: www.impb.ru/lmc/programs/ac_prediction.

Данная работа была поддержана грантом РФФИ №10-04-00254а

[1] Соболев О.В., Лунин В.Ю. / Математическая биология и биоинформатика, 2008. Т.3. С.50-59.

[2] O.V. Sobolev and V.Y. Lunin / Acta Cryst., 2012. D58. (in press).

**ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗИ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ
КОМПЛЕКСОВ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА С ЛАКТОФЕРРИНОМ И МИЕЛОПЕРОКСИДАЗОЙ**

**Study of connection structure and function complexes of ceruloplasmin with
lactoferrin and myeloperoxidase**

Соколов А.В.¹, Самыгина В.Р.^{2,3}, Захарова Е.Т.¹, Бартуник Г.⁴, Васильев В.Б.¹

¹ – ФГБУ «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАМН,
197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12;

² – Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова, РАН,
119333, Москва, Ленинский пр-т, 59;

³ – CICbioGUNE, Structural Biology Unit, 48160, Derio, Bizkaia Technology Park, Spain.

⁴ – ASMB-MPG, DESY, Hamburg, Germany

Тел. +7(812)234-56-06, e-mail: biochemsokolov@gmail.com

В данной работе проведен анализ связи ряда функций и структурной организации комплексов, образуемых церулоплазмином (ЦП), медьсодержащей ферроксидазой плазмы крови человека, с белками гранул нейтрофильных лейкоцитов, лактоферрином (ЛФ) и миелопероксидазой (МПО). Показано, что ЛФ увеличивает ферроксидазную активность ЦП, увеличивая как сродство ЦП к ионам Fe (II), так и скорость их окисления. Ингибируя активность МПО, ЦП выступает в роли фактора, препятствующего образованию гипохлорита, вызывающего окислительный/галогенирующий стресс при ряде воспалительных заболеваний. Нами изучены кинетические параметры ингибирования ферментативной активности МПО под действием ЦП. На основании полученных результатов сделан вывод, что ЦП выступает как конкурентный ингибитор, препятствуя связыванию ароматических субстратов с активным центром МПО. Нами решена структура комплекса ЦП-МПО с разрешением 4.7 Å. Стехиометрическое соотношение МПО:ЦП равно 1:2. В независимой части элементарной ячейки находится одна из двух субъединиц димера МПО и одна молекула ЦП. Анализ структуры также позволил определить область белок-белкового контакта. При формировании комплекса гемовый карман МПО контактирует спетлей ЦП, соединяющей 5 и 6 домены белка (а.о. 885-892). Эта петля в первую очередь подвергается протеолитической атаке при ограниченном гидролизе ЦП сериновыми протеиназами. Сопоставление данных о взаимном влиянии на активность ЦП и МПО с данными рентгеноструктурного анализа позволяет сделать предположение о механизме ингибирующего действия ЦП на МПО посредством контакта петли ЦП (а.о. 885-892) с гемовым карманом МПО и активации МПО катализируемого ЦП окисления *p*-фенилендиамина за счет контакта с сайтом связывания данного субстрата. С помощью SAXS получены модели комплексов ЦП-ЛФ, ЦП-2МПО и трехкомпонентного комплекса МПО-2ЦП-2ЛФ. В контакте ЦП и ЛФ участвует N-концевой катионный кластер ЛФ, ответственный за его связывание с полианионами (ДНК, гепарин, липополисахариды), и участки из 1 и 6 доменов ЦП, расположенные вблизи аминокислотных остатков, лигандирующих ионы меди активного центра ЦП. Структурная организация взаимодействия ЦП с МПО в двух- и трехкомпонентном комплексе не отличается от данных, полученных с помощью кристаллизации комплекса ЦП-МПО. Исследование поддержано грантами РФФИ (10-04-0820, 12-04-00301) и грантом президента РФ МК-1484.2012.4.

**ВЛИЯНИЕ МАЛЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ТРИТЕРПЕНОВОГО ГЛИКОЗИДА
КУКУМАРИОЗИДА A2-2 НА ИОННУЮ ПРОВОДИМОСТЬ РЕЦЕПТОРОВ МЕМБРАНЫ
МАКРОФАГОВ**

**The effect of small concentrations of triterpene glycosides cucumariosides A2-2 on
the ionic conductivity of membrane receptors of macrophages**

Соколов Р.А.¹, Асташев М. Е.²

1 – ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород (Россия);

2 – Институт биофизики клетки РАН, Пущино (Россия)

E-mail: crazy_hedgehog@mail.ru

Известно, что гликозид кукумариозид A2-2 из голотурии *Cucumaria japonica* способен перфорировать мембрану эукариотических клеток и токсичен в концентрациях > 1 мкМ. На основе данного гликозида созданы иммуностимулирующие препараты. Найден Са-ответ у макрофагов на аппликацию этого гликозида в токсических и нетоксических концентрациях. Макрофаги являются не делящимися клетками поэтому для повторных выделений использовались мыши линии balb в возрасте 2х месяцев.

Работа проводилась с клетками, после краткосрочной культивации (до би часов) с апиразой (фермент, расщепляющий АТФ до АДФ и АМФ), что делалось для изменения функционального состояния макрофагов – свежевыделенные макрофаги являются более активными, по сравнению с культивируемыми. Апираза необходима для исключения влияния эндогенного АТФ на пуринорецепторы мембраны макрофагов. Протокол работы выбран в связи с предположительным действием кукумариозид A2-2 на P2X рецепторы макрофагов. На мембране макрофагов присутствуют P2X1, P2X4 и P2X7 рецепторы, сопряженные с ионными каналами, имеющими высокую Ca²⁺ проводимость.

В исследовании был подтвержден Са-ответ на электрофизиологическом методе (patch-clamp) и расширены показания Са-имиджинга. С помощью пэтч-метода было показано, что в нетоксических концентрациях токовый ответ у клеток на аппликацию кукумариозид A2-2 без АТФ отсутствовал. Это же было подтверждено на Са-имиджинге, при работе с клетками по данному протоколу.

Амплитуда кальциевого тока в ответ на аппликацию АТФ увеличивалась при условии предварительной 2-х минутной аппликации кукумариозид A2-2 на клетки. Интегральные значения тока увеличивались в большей степени, чем амплитуда, что говорит о значительно большем входе кальция внутрь клетки.

Наиболее важный эффект, отмеченный для кукумариозид A2-2 при его аппликации на клетки это значительное стабильное снижение десенситизации у P2X рецепторов на мембране макрофагов. Известно, что десенситизация P2X рецепторов макрофагов развивается после первого ответа на АТФ, и является необратимой, без добавления специальных фармакологических агентов. Данный эффект, кукумариозид A2-2 может говорить о специфической модуляции активности P2X рецепторов на мембране макрофагов.

**МАЛОТОКСИЧНЫЙ РАЗОБЩИТЕЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ
НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНОГО ГРАМИЦИДИНА А****Glutamate-substituted analogue of gramicidin A as nontoxic
mitochondrial uncoupler**

**Сорочкина А.И.¹, Плотников Е.Ю.¹, Рокицкая Т.И.¹, Ковальчук С.И.², Котова Е.А.¹,
Сычев С.В.², Зоров Д.Б.¹, Антоненко Ю.Н.¹**

1 – НИИФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ,
119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40

2 – Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
Тел.: +7(495)939-54-13; факс: +7(495)939-31-81; e-mail: antonen@genebee.msu.ru

Частичное разобщение окислительного фосфорилирования может быть полезным для жизнедеятельности клетки с точки зрения предотвращения избыточной генерации активных форм кислорода. Известно, что для типичных разобщителей, представляющих собой слабые органические кислоты, способные проникать через мембрану, характерно узкое окно между действующими и токсическими концентрациями. С целью создания нетоксичного разобщителя, был синтезирован аналог пентадекапептида грамицидина А (gA), на N-конце которого остаток валина был заменен на протонируемый остаток глутамата. Модифицированный пептид [Glu1]gA проявлял высокую разобщающую активность на выделенных митохондриях, снижая мембранный потенциал на внутренней митохондриальной мембране с несколько большей эффективностью, чем исходный gA. На митохондриях в культуре клеток деполяризирующая активность [Glu1]gA наблюдалась при концентрациях на порядок ниже, чем у gA, тогда как на плоских бислойных липидных мембранах [Glu1]gA гораздо менее эффективно индуцировал ионный ток через мембрану, чем gA. Одиночные протонные каналы [Glu1]gA имели практически такую же амплитуду как и каналы gA, однако время жизни этих каналов было значительно короче (примерно в 7 раз). Оба пептида одинаково эффективно подавляли светоиндуцированную генерацию градиента pH на мембранах липосом со встроенным бактериородопсином. Существенно, что в разобщающих концентрациях [Glu1]gA не оказывал влияния на морфологию клеток и был нетоксичен согласно МТТ-тесту, в отличие от gA, проявлявшего высокую токсичность. Различие в поведении [Glu1]gA и gA на природных и искусственных мембранах может быть связано с повышенной способностью [Glu1]gA проникать через мембрану и/или перераспределяться между различными мембранами. [Glu1]gA и другие протонофоры-аналоги gA могут рассматриваться в качестве прототипов лекарственных препаратов, поскольку разобщители окислительного фосфорилирования являются перспективными средствами борьбы с ожирением и другими патологиями.

СПОНТАННАЯ ДЕСТАБИЛИЗАЦИЯ СПАРЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН НЕЙРОНОВ

Spontaneous destabilization of the neuron twin biological membranes

Сотников О.С.¹, Арчакова Л.И.², Парамонова Н.М.¹, Лактионова А.А.¹

1 – Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, Набережная Макарова, 6;

2 – Институт физиологии НАН Беларуси, 220072, Минск, ул. Академическая, д.28;
Тел.: +7(813)707-25-37; факс: +7(813)707-24-85;
e-mail: ossotnikov@mail.ru, novakovskaya@tut.by

В настоящее время разработаны методы формирования пор и последующего слияния ненервных клеток с помощью искусственной электропорации спаренных мембран контактирующих клеток, воздействия лазера, использования полиэтиленгликоля, вируса Сендай, протамин сульфата, латекса полистирола и др. Однако слияние мембран нейронов обычно не исследуется, так как согласно ортодоксальной нейронной доктрине в нервной системе синцитиальная межнейронная связь и слияние нейронов невозможны. Однако целенаправленный поиск межнейронных синцитиальных связей обнаружил их наличие в симпатических ганглиях, в культуре нейронов, в гиппокампе и мозжечке [1]. Среди структурных изменений мембран, предшествующих образованию пор, отмечается появление пятислойных мембранных структур, напоминающих плотные мембранные контакты. Как показано нами, синцитиальные связи и слияния нейронов имеют место как закономерность на определенных стадиях нормального нейроонтогенеза крыс и человека. С помощью культуры нейронов удалось разработать метод массового образования синцитиальных межнейронных связей и слияния нейронов [2].

В настоящей работе анализируются общие спонтанные ультраструктурные изменения спаренных наружных клеточных мембран нейронов и глиоцитов, а также внутриклеточных мембран эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и аппарата Гольджи различных животных. Обнаружена неустойчивость ультраструктуры при контактировании двух мембран. При сближении мембран возникает закономерная варикозная деформация 20 нм – межклеточной щели в результате формирования множественных точечных и продленных пенталаминарных мембранных контактов. В местах контактов появляются наноскопические поры, которые, расширяясь, образуют синцитиальные перфорации и остаточные мембранные тельца. Края перфораций и остаточные тельца приобретают термодинамически наиболее устойчивую везикулярную форму. Происходит превращение плоских биологических мембран в сферические. Синцитиальные связи образуются между нейронами, между нейронами и глией и между отростками глиацитов. Механизм преобразования спаренных мембран ЭПР и аппарата Гольджи подобен перестройке наружных клеточных мембран. Доказательство возможности синцитиальной связи нейронов ликвидирует несоответствие нейронной и клеточной теорий.

1. О.С.Сотников. Статика и структурная кинетика живых асинаптических дендритов. Санкт-Петербург, Наука, 2008. 397 С.

2. Сотников О.С., Фрумкина Л.Е., и др. Двухядерные нейроны: синцитиальное слияние или амитоз. / Успехи физиол. наук, 2011. Т. 42. № 4. С. 38-51.

МЕХАНИЗМ СВЕТОВОЙ ЗАЩИТЫ ФИКОБИЛИСОМ У ЦИАНОБАКТЕРИЙ**Photoprotection of phycobilisomes in cyanobacteria**

Стадничук И.Н.¹, Янюшин М.Ф.², Максимов Е.Г.³, Лукашев Е.П.³, Еланская И.В.³, Красильников П.М.³, Жармухамедов С.К.², Пащенко В.З.³

¹ – Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33;

² – Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 142290, Московская область, Пущино, пр-т Науки, 5; ³ – Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, ул. Менделеева, 1

Тел. +7(495)954-1472; факс +7(495)954-2732; e-mail: stadnichuk@mail.ru

Фикобилисомы (ФБС) – гигантские, массой 3-7 млн. дальтон, надмолекулярные комплексы, которые состоят из белков-пигментов, фикобилипротеинов, и служат антенной в фотосинтетическом аппарате цианобактерий. Общее число хромофоров в ФБС достигает нескольких сот и поэтому избыточный свет способен привести к фотоповреждению как самих ФБС, так и реакционных центров фотосинтеза, куда передается поглощенная энергия. Длительное время считалось, что, в отличие от хлорофильных антенн, ФБС не имеют механизма фотопротекции. В 2004 г. было обнаружено, что интенсивный свет вызывает в клетках цианобактерий обратимое нефотохимическое защитное тушение флуоресценции ФБС, спектр действия которого с тремя характерными пиками в сине-зеленой области показал, что найденный эффект вызван каротиноидами [1]. Как было установлено (2006 г.), защитную функцию выполняет кетокаротиноид 3-гидроксиэксиненон в составе специфического для цианобактерий ОСР-белка массой 35 кДа [2]. Затем, в 2008 г. было выявлено, что ОСР существует в двух формах, темновой стабильной и неустойчивой световой форме, где каротиноид претерпевает превращение, что и приводит к развитию фотоэффекта, наблюдаемого как падение флуоресценции ФБС [3]. Наконец, опытами по прямому взаимодействию выделенных из цианообктерий в раствор ОСР и ФБС установлено, что ОСР является не только фоторецептором, но и эффектором процесса, напрямую контактирующим с ФБС и вызывающим тушение флуоресценции [4,5]. Важнейший вопрос о нахождении в ФБС сайта связывания с ОСР оставался открытым. В осуществленных нами *in vivo* и *in vitro* опытах были проанализированы все хромофорсодержащие белки в составе ФБС как возможно ответственные за связь с ОСР и развитие нефотохимического тушения. Как оказалось, единственным белком-пигментом, отвечающим за взаимодействие с ОСР, является так называемый LCM-протеин, выполняющий главную структурную роль по стабилизации ФБС и роль главного терминального эмиттера, аккумулирующего энергию от остальных пигментов ФБС. Другие фикобилипротеины, включая второстепенные терминальные эмиттеры, АрсD- и АрсF-белки, не имеют прямого контакта с ОСР и их флуоресценция тушится опосредованно. В стереомодели, созданной на основе известных кристаллографических данных, расстояние между хромофорами ОСР и LCM оценено равным 15 Å, что достаточно для развития тушения, молекулярный механизм которого служит предметом наших дальнейших исследований [6].

[1] M. Rakhimberdieva et al., FEBS Lett. 2004, 45, 85-88; [2] A. Wilson, et al., Plant Cell 2006, 18, 992-1007; [3] A. Wilson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008, 33, 12075-12080; [4] I. Stadnichuk et al., Dokl. Biochem. Biophys. 2011, 439, 167-170; [5] M. Gwizdala et al., Plant Cell, 2011, 23, 2631-2643; [6] I. Stadnichuk et al., Biochim. Biophys. Acta, 2012, doi:10.1016/j.bbabo.2012.03.023.

МЕХАНИЗМ СТРУКТУРНОЙ АДАПТАЦИИ НЕГИСТОНОВОГО ХРОМОСОМНОГО БЕЛКА HMGB1 К УЧАСТКУ СВЯЗЫВАНИЯ НА ДНК

The mechanism of non-histone chromosomal protein HMGB1 adaptation to the DNA binding region

Старкова Т.Ю.¹, Поляничко А.М.², Костылева Е.И.¹, Чихиржина Е.В.¹

¹ – Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4;

² – Физический факультет СПбГУ,

198504, Санкт-Петербург, Старый Петергоф, ул. Ульяновская, 3

Тел.: +7(812)297-37-40; e-mail: tatirod9@gmail.com

Белок HMGB1 семейства HMGB (от англ. High Mobility Group) является наиболее распространенным среди негистоновых белков хроматина. Из многочисленных экспериментов следует, что белки данного семейства принимают участие в регуляции основных генетических процессов путем локальной модификации структуры хроматина. Наряду с транскрипцией HMGB также вовлечены в репликацию, рекомбинацию и репарацию ДНК. Однако на фоне широкой распространенности HMGB-мотива до сих пор остаётся до конца невыясненными как природа большого разнообразия выполняемых белком HMGB1 функций, так и детальные механизмы взаимодействия двухдоменного HMGB1 с ДНК.

Зачастую структурная организация ДНК-белковых и белок-белковых комплексов определяет их функциональное назначение и играет ключевую роль в функционировании хроматина. Мы предполагаем, что многообразие выполняемых белком функций может быть связано со способностью HMGB1 по разному изменять свою структуру в зависимости от мишени связывания. С помощью сочетания разнообразных физико-химических методов (круговой дихроизм (КД), поглощение в УФ диапазоне, спектрофотометрическое плавление) мы попытались проследить за структурными изменениями HMGB1 и ДНК в составе ДНК-белкового комплекса.

Методом кругового дихроизма нами было показано, что при температуре +25°C степень α -спиральности HMGB1 не превышает 30%. Анализ полученных нами термодинамических данных свидетельствует о частичной неупорядоченности А-домена белка в области физиологических температур, что хорошо согласуется с результатами исследований других авторов. При взаимодействии с высокомолекулярной ДНК тимуса телят происходит структуризация HMGB1, что выражается в увеличении степени его α -спиральности на 20%. В то же время взаимодействие белка с плазмидной ДНК pUC19 происходит без изменения вторичной структуры HMGB1. Основываясь на данных литературных источников, и экспериментальных данных, полученных нами, мы предложили модель структурной адаптации HMGB1 к участку связывания на ДНК. Согласно нашей модели взаимодействие HMGB1 с высокомолекулярной ДНК тимуса телят характеризуется наличием двух механизмов связывания посредством одного и двух доменов. Изменение вторичной структуры А-домена белка происходит только в случае двухдоменного связывания HMGB1 с ДНК. Для каждого случая проведена оценка размера участка связывания.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 10-04-00092 и Правительства Санкт-Петербурга. Часть работ проводилась в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы.

**МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ РЕГУЛЯЦИИ НЕЙРОННОЙ АКТИВНОСТИ
МОЛЕКУЛАМИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА МОЗГА****Mathematical model of regulation neural activity by molecules extracellular matrix****Стасенко С.В.^{1,2}, Гордлеева С.Ю.^{1,2}, Казанцев В.Б.^{1,2}, Дитятев А.Э.^{2,3}**

1 – Институт прикладной физики РАН, 603950, г. Нижний Новгород, Россия

2 – Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского,
603950, г. Нижний Новгород, Россия3 – Итальянский институт технологий,
16163, Генуя, Италия, stasenko@neuro.nnov.ru

Одной из важных задач современной нейронауки является отыскание принципов и механизмов обработки информации в мозге. Считается, что ключевую роль в процессе обработки информации играют нейроны. Недавние экспериментальные данные показали, что молекулы внеклеточного матрикса вносят вклад в регуляцию нейронных функций [1], тем самым влияя на данный процесс. Такая регуляция не сказывается на нейронной динамике в течение миллисекунд или секунд, но, являясь интегральной, оказывает воздействие на длительных временах порядка часов, дней и месяцев.

В данной работе мы предлагаем математическую модель регуляции нейронной активности за счет молекул внеклеточного матрикса, базирующуюся на экспериментальных данных. Она содержит в себе три вида обратной связи, включающие: (i) колебания порога возбуждения, зависящие от концентрации внеклеточного матрикса, (ii) модуляцию синаптических весов благодаря сигнальному рецептору внеклеточного матрикса на дендритном шипике и (iii) деградацию внеклеточного матрикса благодаря активности протеаз. Математическая модель состоит из системы из восьми обыкновенных дифференциальных уравнений. Внеклеточный матрикс, моделируемый феноменологической переменной, вовлечен в несколько механизмов регуляции активности нейрона, на который действуют возмущения со стороны нейронной сети, моделируемые с помощью процесса Пуассона. Было получено, что внеклеточный матрикс способен осуществлять гомеостатическую регуляцию средней нейронной активности. Он предотвращает перевозбуждение нейрона, если средняя активность становится выше порога и, наоборот, возвращает нейрон к гомеостатическому уровню активности в случае уменьшения средней активности. Мы обнаружили, что взаимодействие между обратными связями может индуцировать бистабильность и сосуществование двух стабильных уровней активности в гомеостатическом состоянии. Это означает, что под некоторыми возмущениями (к примеру, кратковременное увеличение/ уменьшение входящей частоты спайковой активности) нейрон может перескакивать между низким и высоким уровнями спайковой активности.

Работа поддержана грантом Правительства РФ (контракт № 11.G34.31.0012).

1.Dityatev A., Schachner M., Sonderegger P. The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis. // Nature Reviews Neuroscience. Nature Publishing Group, 2010. Vol. 11, № 11. P. 735–746.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ДИФфуЗИИ В КЛЕТочНУЮ МЕМБРАНУ ПИРАЗИНА И ЕГО МЕТИЛПРОИЗВОДНЫХ**Simulation of diffusion into the cell membrane of pyrazin and its methyl derivatives****Стефанов В. Е.¹, Мамонов А. А.¹, Калацкий Ю.М.¹, Щеголев Б. Ф.²**

1 – Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб., 7-9, 199034, Санкт-Петербург;

2 – Учреждение РАН, Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, наб. Макарова, д. 6, Санкт-Петербург, 199034

Тел.: +7(812)3282182; e-mail: vastef@mail.ru

Пиразин, молекула которого представляет собой шестичленный ароматический цикл с двумя гетероатомами азота, и его метилпроизводные вызывают ряд физиологических эффектов. Было предположено [1], что зависимость активности алкилпиразинов от заместителей связана с изменением физико-химических свойств мембраны при растворении в ней производных пиразина. Для анализа соответствующего механизма, используя вычислительный пакет GROMACS 3.3 [2], мы провели молекулярно-динамическое моделирование процесса диффузии пиразина (П), 2-метилпиразина (2-МП), 2,3-диметилпиразина (2,3-ДМП), 2,5-диметилпиразина (2,5-ДМП) и тетраметилпиразина (ТМП) в фосфолипидный бислой модельной мембраны, включавшей два типа липидов: дипальмитоилфосфатидилхолин и дипальмитоилфосфатидилэтанолламин. Наши расчеты показали, что молекулы замещенных пиразинов переходят из раствора в бислой за 2-6 нс, а затем локализуются в нем. При этом их локализация в бислой и процесс латеральной диффузии зависят от числа заместителей и распределения свободного объема в бислой. Локализации П и 2,5-ДМП отвечает область фосфатных групп и полярных остатков фосфолипидов на границе бислоя, 2-МП и 2,3-ДМП – область глицериновых остатков и упорядоченных частей алкильных цепей, а ТМП – область разупорядоченных алкильных хвостов в центре бислоя. Вторая из них характеризуется наименьшим свободным объемом, что объясняет наименьшие значения коэффициента диффузии, полученные для 2-МП и 2,3-ДМП. В области избытка свободного объема в центре мембраны располагается молекула ТМП, обладающая наибольшей латеральной подвижностью. Геометрические и структурные характеристики бислоя согласованно изменяются в зависимости от числа заместителей. Толщина мембраны и средняя площадь на липид, соответственно, уменьшается от 4.05 нм до 3.97 нм и увеличивается от 0.59 нм² до при 0.61 нм² с уменьшением числа метильных групп с четырех в ТМП до нуля в П, что сопровождается ростом упорядоченности алкильных цепей липидов при локализации молекулы на определенной глубине в бислой. Вероятно, различное заглубление и латеральная диффузия производных пиразина, в особенности ТМП, может соответствовать активному поиску потенциально возможных мест связывания, что в свою очередь может быть связано с механизмами реализации некоторых функций молекул замещенных пиразинов.

1. Nie S.Q., Majarais I., e.a. / Eur. J. Pharm. 1994, 266(1), 11-18

2. van der Spoel D., Lindahl E., e.a. / J. Comp. Chem. 2005, 26, 1701-171

ДЕЙТЕРООБМЕН И НУКЛЕАЦИОННЫЕ САЙТЫ СВОРАЧИВАНИЯ В БЕЛКАХ**Hydrogen-deuterium exchange and nucleation sites of folding for proteins**

Суворина М.Ю., Сурин А.К., Довидченко Н.В., Лобанов М.Ю., Соколовский И.В., Галзитская О.В.

Институт белка РАН, 142290, Московская обл., Пушкино, ул. Институтская, 4;
Тел.: +7(4967) 318275; e-mail: ogalzit@vega.protres.ru

Одним из наиболее распространенных методов, используемых для изучения конформационных изменений в белковых молекулах, стал метод, сочетающий водородно-дейтериевый (H/D) обмен и масс-спектрометрический анализ. Исследования, связанные с H/D обменом белков, главным образом сфокусированы на обмене протонов, вовлеченных в образование водородных связей, которые помогают стабилизировать вторичную и третичную структуры белков. Поскольку на сегодняшний день белков с известной структурой гораздо меньше, нежели белков, для которых известна только аминокислотная последовательность, очень важно уметь предсказывать защищенность протона от H/D обмена, исходя только из первичной структуры белка. В основу нашего метода легло предположение, что отсутствие защищенности может быть объяснено, по большей части, большой амплитудой колебаний участков полипептидной цепи между упакованными элементами вторичной структуры, что способствует контакту флукутирующего участка с растворителем.

Сделаны предсказания числа протонов, способных к H/D обмену, для десяти глобулярных белков ранее разработанным нами методом. Методом масс-спектрометрии для этих же белков было измерено среднее число протонов, замещенных на дейтерий в белковых молекулах, находящихся в нативных конформациях. На основании полученных экспериментальных данных можно сделать вывод, что обе предложенные нами ранее модели согласуются между собой по количеству протонов, замещенных на дейтерий. При использовании шкалы вероятности образования водородных связей мы получаем оценку числа протонов, способных к H/D обмену близкую к экспериментальным данным, соответствующим длительной инкубации в D₂O (24 ч). В то время как шкала ожидаемых контактов в глобулярных белках лучше согласуются с экспериментальными данными, полученными после малой инкубации в D₂O (15 мин). Таким образом, первая модель позволяет определить слабо флукутирующие участки, которые находятся короткое время в контакте с растворителем, в то время как вторая модель предсказывает подвижные участки цепи, экспонированные на поверхность глобулы или неструктурированные участки белковой цепи. Предсказания участков, защищенных от H/D обмена, для 20 белков показали, что аминокислотные остатки, входящие в экспериментально выделенное ядро сворачивания, часто находятся в этих участках, т.е. защищены от дейтерообмена. Разработан сервер для предсказания остатков, защищенных и незащищенных от H/D обмена.

Работа выполнена при поддержке "МКБ" и "ФНМ" Президиума РАН, грантом РФФИ.

ИЗУЧЕНИЕ ОДИНАРНЫХ И ПАРНЫХ ТОЧЕК РАЗЛАДКИ В КОДИРУЮЩИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ ДНК**Analysis of single and paired change points in DNA coding sequences****Суворова Ю.М., Коротков Е.В.**

Центр "Биоинженерия" РАН, Москва, пр-т 60-летия Октября д.7, корп.1
Тел.: +7(499)-135-2161; факс: +7-(499)-135-0571; email: suvorovay@gmail.com

Из литературных данных известно, что в процессе эволюции ранее независимые гены могут соединяться, образуя при этом новые сложные белки [1]. Также известно, что триплетная периодичность является отличительным свойством кодирующих последовательностей [2]. Таким образом, можно предположить, что точки разладки триплетной периодичности могут служить маркером склейки генов. Для поиска таких точек разладки был разработан метод, основанный на сравнения частотных матриц смежных участков с учетом возможного сдвига рамки считывания. Точке разладки триплетной периодичности соответствует значимое различие частотных свойств периодичности смежных участков. В качестве меры различия использовалось поэлементное сравнение двух матриц, элементы которых предварительно нормализуются. Для определения порогового уровня была создана контрольная выборка случайных последовательностей. В результате, был выбран уровень, соответствующий 5% вероятности ошибки I рода. На этом уровне в банке данных KEGG/Genes было найдено более 300 тысяч последовательностей (около 10% известных генов), содержащих одну одиночные точки разладки триплетной периодичности [3]. Для поиска парных точек разладки в дополнение к мере различия была введена мера подобия частотных матриц двух участков гена. Кроме того, при разработке алгоритма учитывался возможный сдвиг рамки считывания после точки разладки на одну или две позиции. Поиск парных точек разладки был произведен в кодирующих последовательностях 17 бактериальных геномов. Всего в них было найдено 6459 генов, содержащих одиночную точку разладки триплетной периодичности и 2700 генов, содержащих парные точки разладки.

1. Pasek S et al. Gene fusion/fission is a major contributor to evolution of multi-domain bacterial proteins. *Bioinformatics*, 2006, 22 n 12, 1418–1423.

2. Frenkel F.E. and Korotkov E.V. Classification analysis of triplet periodicity in protein-coding regions of genes, *Gene*, 2008, 421(1-2), 52-60.

3. Suvorova Y.M., Rudenko V. M., Korotkov E.V. Detection change points of triplet periodicity of gene, *Gene*, 2012, v.491, 58-6.

РОЛЬ ВАРИАБЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА В РАЗВИТИИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ОТВЕТА У ГЕРАНИ (*PELARGONIUM ZONALE* L.)**The role of variation potential in induction of photosynthetic response in geranium (*Pelargonium zonale* L.)**

Сурова Л.М., Шерстнёва О.Н., Сухов В.С.

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, 603950,
Нижний Новгород, пр-т Гагарина, 23.

Тел.: +7(831)465-61-06; факс: +7(831)462-30-85; e-mail: lyubovsurova@mail.ru

Для выживания в неблагоприятных условиях растению нужна экстренная сигнальная связь, которая способна объединить его в единое целое. Таким свойством обладают электрические сигналы, в частности, переменные потенциалы (ВП). Считается, что ВП является основным звеном в развитии функциональных ответов растения (в том числе изменений фотосинтеза) на локальное повреждение. Однако, количество экспериментальных данных, доказывающих связь ВП с фотосинтетическим ответом, весьма ограничено, поэтому актуален дальнейший анализ такой связи.

Исследования проводили на двух-трехмесячных растениях герани, выращенных в почве в комнатных условиях. ВП вызывали ожогом небольшого участка листа открытым пламенем. Электрофизиологические измерения проводили с помощью стандартной двухканальной системы, включающей Ag-Sl-макроэлектроды и высокоомный милливольтметр ИПЛ-113. Анализ фотосинтетических процессов осуществляли с помощью РАМ-флуориметра Dual-PAM-100 и инфракрасного газоанализатора GFS-3000.

Показано, что ожог соседнего листа индуцировал ВП, который проходил в исследуемый лист в 80% случаев. При этом развивалось снижение квантовых выходов фотосистем I и II, уровня ассимиляции CO₂ и проводимости устьиц, а также рост нефотохимического тушения флуоресценции и потеря на донорной и акцепторной стороне фотосистемы I. Если ВП не проходил в лист, на котором проводились измерения, фотосинтетического ответа не наблюдалось. Однако, при ожоге этой листовой пластинки, в ней наблюдалось развитие ВП и ответа фотосинтеза.

Во всех случаях фотосинтетический ответ развивался с запозданием на 1-2 мин по отношению к ВП. Детальный анализ времени развития ответа показывает, что наиболее ранние изменения наблюдаются на акцепторной стороне фотосистемы I, затем происходит снижение квантовых выходов фотосистем I и II, фотохимического тушения и уровня ассимиляции CO₂. Наиболее поздние изменения наблюдаются для потерь на донорной стороне фотосистемы I и нефотохимического тушения.

Наши данные подтверждают, что ВП является связующим звеном между развитием фотосинтетического ответа и локальным ожогом. При этом изменения разных показателей фотосинтеза развиваются с различной задержкой. На основании анализа таких задержек можно выделить две основных группы показателей, изменения в первой из них связаны скорее с нарушением потока электронов в цепи, во второй – со сдвигами рН стромы и люмена.

Работа поддержана грантами Президента Российской Федерации (МК-1869.2012.4) и РФФИ (11-04-97071-р_поволжье_a).

**ИССЛЕДОВАНИЕ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕЙ И АНТИВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ
ДИМЕРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НЕТРОПСИНА И ДИСТАМИЦИНА****Studies on DNA-binding properties and antiviral activities of bis-linked netropsin
and distamycin derivatives****А.Н. Суrowая,¹ С.Л. Гроховский,¹ В.Л. Андрoнова,² Г.А. Галегов,² Г.В. Гурский¹**

¹ ФГБУ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва ул. Вавилова, 32. ² ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития России, 123098 Москва, ул. Гамалеи, 16.

Тел.: +7(499)135-99-95; факс: +7(499)135-14-05; e-mail: annasur@eimb.ru

В настоящей работе мы сравнили ДНК-связывающую и антивирусную активность двух бис-нетропсинов, содержащих цис-диаминоплатиновую группу, присоединенную к каждому нетропсин-подобному фрагменту через один (Pt-bis-Nt) или два (Pt*-bis-Nt) глициновых остатка. Показано, что Pt-bis-Nt и Pt*-bis-Nt избирательно и прочно связываются с протяженным кластером АТ-пар в начале репликации вируса герпеса. Однако, Pt*-bis-Nt практически не обладает антивирусной активностью в экспериментах в культуре клеток Vero, в то время как Pt-bis-Nt ингибирует репродукцию вируса простого герпеса типа 1 с индексом селективности примерно равным 60. С помощью КД-спектроскопии исследовано взаимодействие Pt-bis-Nt и Pt*-bis-Nt с фрагментом OriS в начале репликации вируса герпеса OriS, содержащего протяженный АТ-кластер. Мы показали, что производные бис-нетропсинов связываются с А+Т-кластером в различных конформациях: растянутой конформации, шпильчатой конформации с параллельной и антипараллельной ориентацией нетропсиновых фрагментов и в форме антипараллельного димера. Профили спектров КД, отражающие связывание бис-нетропсинов в форме параллельной шпильки существенно отличаются от профилей, характерных для связывания бис-нетропсинов в растянутой конформации и в форме димера. Методом КД-спектроскопии показано, что при малых заполнениях оба лиганда связываются с OriS преимущественно в растянутой конформации и константа их связывания существенно выше для Pt-bis-Nt, чем для Pt*-bis-Nt. При заполнениях равных или больших, чем две молекулы лиганда на олигомер OriS связывание Pt-bis-Nt и Pt*-bis-Nt существенно различается: Pt-bis-Nt взаимодействует с олигомером OriS преимущественно в виде параллельной шпильки, в то время как Pt*-bis-Nt связывается в форме антипараллельного димера. Ранее мы показали, что для связывания Pt-bis-Nt в форме параллельной шпильки самым сильным связывающим местом является сайт с последовательностью 5'-ТАТАТ-3', который присутствует в А+Т – кластере в OriS. Потеря антивирусной активности для Pt*-bis-Nt может быть связано с меньшим сродством к OriS Pt*-bis-Nt по сравнению с Pt-bis-Nt, а также может быть вызвана конформационными различиями комплексов, образуемых бис-нетропсинами с OriS. Исследована ДНК-связывающая и антивирусная активность Pt-бис-дистамицина, содержащего цис-диаминоплатиновую группу, присоединенную к дистамицин-подобному фрагменту через один глициновый остаток (Pt-bis-Dst). Показано, что Pt-bis-Dst связывается с высоким сродством к А+Т-кластеру в OriS и обладает высокой антивирусной активностью.

**РАЗРАБОТКА МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ВАРИАБЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА У
ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ****An elaboration of mathematical model of variation potential generation in
higher plants****Сухов В.С., Акинчиц Е.К., Воденев В.А.**

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского,
603950, Нижний Новгород, пр-т Гагарина, 23.

Тел.: +7(831)465-61-06; факс: +7(831)462-30-85; e-mail: vssuh@mail.ru

Вариабельный потенциал (ВП) является распространяющейся электрической реакцией, возникающей в действие повреждающих факторов у высших растений. Механизмы ВП остаются в настоящее время дискуссионными. Генерацию ВП связывают с обратной инактивацией H^+ -АТФазы, однако есть данные, свидетельствующие в пользу активации ионных каналов в ходе развития электрического ответа. Можно предположить, что начальным этапом генерации ВП является вход ионов кальция в клетку, что требует, однако, дальнейшего анализа. Для объяснения механизмов передачи ВП используют преимущественно гидравлическую гипотезу, связывающую распространение сигнала с прохождением гидравлической волны. Однако, в наших предыдущих работах показано, что распространение ВП может быть хорошо описано на основе уравнения одномерной диффузии, и выявлена высокая скорость распространения химической метки по растению. Это служит аргументом в пользу химической гипотезы, в соответствии с которой ВП является местным электрическим ответом на распространение неизвестного раневого вещества. Целью настоящей работы стала разработка математической модели ВП и анализ его механизмов.

В качестве основы модели была использована ранее разработанная нами модель электрогенеза растительной клетки. Используя решение уравнения одномерной диффузии, были имитированы изменения концентрации раневого вещества на разных расстояниях от места повреждения. Принимали, что описанное в модели раневого вещества способно активировать специальный тип кальциевых каналов, вызывая, тем самым, электрический ответ растительной клетки.

Анализ полученной модели показал, что она хорошо описывает генерацию электрических ответов, соответствующих по своим параметрам ВП у растений. При этом увеличение расстояние от зоны образования раневого вещества приводила к сложной динамике изменений формы ответа и снижению амплитуды медленной волны деполяризации, что хорошо соответствует данным экспериментов. Имитация ингибиторного анализа показала, что снижение активности протонной АТФазы и блокирование хлорных каналов вызывает существенно снижение амплитуды ВП и уменьшение числа пиков у него.

В целом, полученные результаты являются теоретическим подтверждением в пользу химической гипотезы распространения ВП и участия входа ионов кальция в качестве начального этапа такого ответа.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (12-04-00837-а).

**ИЗМЕНЕНИЕ ФОСФОЛИПИДНОГО СОСТАВА ЭРИТРОЦИТОВ ГОЛУБЯ ПРИ
ДЕЙСТВИИ ОКСИДА АЗОТА И ФЛАВОНОИДОВ****Change phospholipid composition of erythrocytes pigeon in the action of nitric
oxide and flavonoids****Сюсин И.В., Девяткин А.А., Ревин В.В.**

ФГБОУ ВПО "МГУ им. Н.П. Огарёва",
430005, р. Мордовия, г. Саранск, ул. Большевикская, д. 68.
Тел.: +7 (8342) 32-45-54; факс: +7 (8342) 32-45-54; e-mail: biotech@moris.ru

Программируемая гибель клеток, представляет собой управляемый процесс самоуничтожения клеток. Он направлен на освобождение от старых или наработанных в избытке клеток, а так же от клеток с нарушением дифференцировки и повреждении генетического вещества. Липиды являются структурными компонентами клеточных мембран и важнейшими биологическими эффекторами, регуляторами и медиаторами, участвующими практически во всех физиологических процессах, происходящих в организме, в биохимических реакциях, протекающих в клетках животных и человека. К физиологическим факторам, способным запускать в клетках программу клеточной гибели, относится оксид азота, вызывая изменения фосфолипидов мембран [1]. Это влияет на функционирование каналов ионной проницаемости, липидзависимых ферментов, встроенных в мембраны клеток. Изменение состава фосфолипидов влечет за собой изменение физических свойств мембраны, в наибольшей степени – микровязкости.

Целью нашей работы было исследование влияния оксида азота и флавоноидов на фосфолипидный состав мембраны эритроцитов крови голубя.

Объектом исследования служили флавоноиды, выделенные из черной смородины (*Ribes nigrum*), и эритроциты крови голубя (*Columba livia*). Источником оксида азота служил нитропурсид натрия (НПН).

По истечении 24 часов инкубации крови в присутствии НПН 10 ммоль/л наблюдалось изменение количества фосфолипидов. Действие оксида азота вызывало уменьшение доли фосфотидилэтаноламина на 40%, фосфотидилсерина + фосфатидилинозитола на 38% по сравнению с контролем; и увеличение доли на 25%, сфингомиелина на 21%, а лизофосфатидилхолина на 22% по сравнению с контролем.

При одновременном добавлении в кровь НПН и флавоноидов, выделенных из черной смородины, содержание фосфотидилэтаноламина увеличилось на 22%. Так же повысилась содержание фосфотидилсерина + фосфатидилинозитола на 35% относительно проб с источником оксида азота. А фракции фосфотидилхолина уменьшались на 36%, сфингомиелина на 18,2%, а лизофосфатидилхолина на 40% относительно проб с источником оксида азота.

Тем самым, флавоноиды оказывают ярко выраженное антиоксидантное действие, препятствуют изменениям состава фосфолипидов мембран, вызванные окислительным стрессом.

1. Брюне Б. Апоптотическая гибель клеток и оксид азота: механизмы активации и антагонистические сигнальные пути. / Биохимия. 1998. Т. 63, № 7. С. 966 – 975.

КОНКУРЕНТНЫЙ ТРАНСПОРТ ИОНОВ НАТРИЯ И ПРОТОНОВ Na,K-АТФАЗОЙ**Competitive transport of sodium ions and protons by Na,K-ATPase****Ташкин В. Ю., Соколов В. С.**ИФХЭ РАН, Москва, 119991, Ленинский проспект, д. 31, корп. 5
Тел.: 955-45-85, факс: 952-55-82, e-mail: vse_tash@mail.ru

Na,K-АТФаза переносит три иона натрия из клетки и два иона калия – в клетку за счет гидролиза одной молекулы АТФ. Она относится к семейству АТФаз Р-типа, многие представители которого способны осуществлять обменный транспорт ионов металлов на протоны за счет сопряжения связывания ионов металлов в активном центре белка с депротонированием находящихся вблизи него аминокислот. Возможно, аналогичный процесс происходит и в Na,K-АТФазе, благодаря чему обмен двух из трех ионов натрия между раствором и центром связывания в физиологических условиях не сопровождается переносом заряда, но становится электрогенным в условиях низкой концентрации Na^+ или высоких рН. Исследованию конкурентного обмена ионов натрия на протоны в цитоплазматическом канале доступа Na,K-АТФазы посвящена данная работа. Измерения проводились методом адмиттанса на бислоистой липидной мембране с адсорбированными на ней мембранными фрагментами с Na,K-АТФазой. Ранее мы исследовали изменения емкости и проводимости, вызванные быстрым освобождением АТФ из Saged-АТФ, и показали, что они зависят от рН. В настоящей работе электрические сигналы вызывались быстрым увеличением концентрации протонов в среде при фотолизе saged- H^+ вспышкой УФ света. Скачок рН приводил к изменению емкости мембраны, причем оно наблюдалось как на мембранах с Na,K-АТФазой, так и в отсутствие белка. Для выделения сигналов, вызванных функционированием Na,K-АТФ-азы, использовалась зависимость этих сигналов от концентрации ионов натрия, которая наблюдалась в присутствии белка. При добавке ионов натрия в исходно безнатриевую среду приращения емкости, в зависимости от рН, как увеличивались, так и уменьшались. При от 7.2 до 7.4 эффект натрия возрастал, при рН от 7.4 до 8 спадал, а при рН 7.6 – проходил через 0. Приращения емкости зависели от частоты, причем невысокая характерная частота падения емкости может свидетельствовать о наличии потенциального барьера для протонов между раствором и цитоплазматическим центром связывания Na,K-АТФазы. Приращения емкости при высоких рН немонотонно зависели от концентрации добавляемых ионов натрия, причем при концентрации натрия 1-4 мМ при всех рН достигалось плато. Полученные результаты объясняются простейшей моделью конкуренции ионов натрия и протонов за места связывания, согласно которой рН перехода изменения емкости через 0 соответствует рК одного из сайтов связывания. Из анализа полученных данных следует, что рК диссоциации сайта связывания составляет около 7.6.

ФОТОФОСФОРИЛИРОВАНИЕ АДФ ДО АТФ НА ПИГМЕНТ-СИЛИКАТНЫХ МАТРИЦАХ**Photophosphorylation of ADP to ATP on pigment-silicate matrix****Телегина Т.А., Колесников М.П., Буглак А.А., Вечтомова Ю.Л., Крицкий М.С.**

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский проспект, 33. стр. 2;
Тел: +7(495)9522547; факс: +7(495)9542732; e-mail: telegina@inbi.ras.ru

В организмах существуют энергия фотонов конвертируется в энергию макроэргических связей аденозинтрифосфата (АТФ) с помощью пигментов фотосинтетического аппарата, а также бактериородопсина. Нами разработана модельная система, в которой энергия фотонов преобразуется в энергию макроэргических связей АТФ с помощью хромопротеиноидов, т.е. конъюгатов, аминокислотных полимеров (протеиноидов) с пигментами, образующихся при термоконденсации смеси аминокислот. Спектры эмиссии и возбуждения флуоресценции выявили наличие в хромопротеиноидах – продуктах термоконденсации глутаминовой кислоты, лизина и глицина, флавинов (преобладающий пигмент) и птеридинов. Замена в исходной смеси предшественников глицина на аланин приводила к преимущественному образованию не флавинов, а птеридинов. Длинноволновый максимум в спектре действия фотофосфорилирования с участием флавин-содержащих хромопротеиноидов располагался при 450 нм, а для птеридин-содержащих – при 350 нм.

Пигмент-содержащие протеиноиды сенсibilизировали образование АТФ из АДФ только в составе микросфер, сформированных в комплексе с коллоидными силикатными частицами. В качестве донора электрона система использовала ЭДТА, а акцептором служил O₂ или H₂O₂. Протеиноиды, конъюгированные с флавинами, были более эффективны в качестве фотосенсibilизаторов, чем конъюгаты с птеридинами (выход АТФ – 20% и 9% соответственно). Более высокая активность флавинов, чем птеридинов в реакции фотофосфорилирования, которая включает транспорт электрона, коррелировала с различием базовых фотохимических свойств молекул (разница уровней энергии между T1 и -S₀, сродство к электрону T1 и потенциал ионизации T1) для птеридин- и изоаллоксазин содержащих структур. Величины, полученные с помощью квантово-химических расчетов, позволили сравнить способность пигментов к транспорту электрона от донора (ЭДТА) к акцептору (O₂). В возбужденном состоянии флавины проявляют большее сродство к электрону по сравнению с птеридинами (-4,14 eV и -3,56 eV, соответственно). Это различие коррелирует с более высокой активностью флавинов в процессе фотофосфорилирования.

Изученная модель фотофосфорилирования рассматривается как функциональный прототип биологического фотофосфорилирования. Мы полагаем, что присутствие на примитивной Земле фотоактивируемых супрамолекулярных матриц могло способствовать развитию процессов синтеза АТФ в добиологической эволюции.

Поддержано Программой Президиума РАН № 28 и грантом РФФИ № 11-04-01007-а.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРВИЧНЫХ СОБЫТИЙ В ФОТОЦИКЛЕ
БАКТЕРИОРОДОПСИНЕ МЕТОДОМ ЭМИССИОННОЙ ИК-ФУРЬЕ СПЕКТРОСКОПИИ****Studies of the primary events in bacteriorhodopsin's photocycle by FTIR- emission spectroscopy****Терпугов Е. Л.¹, Терпугова С. Е.², Савранский В. В.², Дегтярева О. В.¹.**

1- Институт биофизики клетки РАН РАН,
142290, Московская область, Пущино, ул. Институтская,3
Тел.: +7(4967)739393; факс: +7(4967)33-05-09; e-mail: el_terpugov@rambler.ru;
2- ЦЕНИ Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН,
119991, Москва, ул Вавилова 38

Бактериородопсин (БР), интегральный белок пурпурных мембран *Halobacterium salinarum* функционирует как светозависимая протонная помпа [1-3]. Ретиналь, связанный в центре белка поглощает свет и изомеризуется из all-trans в 13-cis- конформацию. Серия конформационных изменений и перенос протона с последующим восстановлением структуры в all-trans конфигурацию сопровождается запасанием энергии в виде электрохимического потенциала. Механизм, посредством которого БР активируется вслед за поглощением кванта видимого света до сих пор остается все еще неизвестным. В частности, неизвестно когда и как первичные структурные и электронные изменения ретиналя запускают конформационные перестройки белка, которые впоследствии приводят к векторному переносу протона. Согласно основной гипотезе изменения белка происходят вследствие быстрой изомеризации ретиналя вокруг двойной С=C связи и изменения в опсине, вызванные перераспределением заряда в ретинале и его изомеризация запускаются независимо друг от друга, а их сопряжение осуществляется на более поздних стадиях фотоцикла. В то же время взаимодействия между отдельными колебательными модами ретиналя и опсина, в особенности на первичных стадиях фотоцикла из-за отсутствия соответствующей техники практически не изучены.

Ранее первичные процессы в бактериородопсине изучались в основном с использованием «pump-probe» техники с пико- и фемтосекундным временным разрешением, которые не дают прямой информации о структуре БР. Впервые информация о структуре колебательно-возбужденного ретиналя была получена методом КАРС с фемто- и пикосекундным временным разрешением [4]. Однако Раман спектроскопия, в том числе и КАРС не позволяют проводить наблюдение за изменениями в структуре белковой матрицы БР и не дететируют ретиналь-белковое взаимодействие.

Наше сообщение посвящено использованию разрабатываемого нами метода эмиссионной ИК-Фурье спектроскопии в изучении фотофизических процессов в БР. Демонстрируется возможность метода в определении структуры фотовозбужденного ретиналя и его взаимодействии с белковым окружением, а также в наблюдении каналов распространения колебательной энергии на первичных стадиях фотоцикла БР.

1. Oesterhelt D. and Stoekenius W., Nature, 1971, 233, 149
2. Lozier R H, Bogomolni R. A., Stoekenius W., Biophys.J., 1975, 15, 955
3. Mathies R. A., Lin S. W., Ames J. B., Pollard W.T., Annu. Rev. Biophys. Chem., 1991, 20, 591
4. Atkinson G.H., Ujj L., Zhou Y., J.Phys.Chem.A., 200, 104, 4130

**ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСА МИНИ-ФЕРМЕНТА,
МОДЕЛИРУЮЩЕГО КАТАЛИТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ЦИТОХРОМА P450 (CYP74), С
СУБСТРАТОМ****Study of the complex of mini-enzyme modeling cytochrome P450 (CYP74) catalytic
centre with substrate****Топоркова Я.Ю., Горина С.С., Мухтарова Л.Ш., Ермакова Е.А., Гоголев Ю.В.,
Гречкин А.Н.**

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН,
420111 Казань, ул. Лобачевского 2/31
Тел.: +7(843)231-90-35, факс: +7(843)292-73-47, yanchens@yandex.ru

В ходе онтогенеза растений и формировании у них ответа на стрессовые факторы важная роль принадлежит ферментам липоксигеназной сигнальной системы. Ключевыми ферментами данной системы являются цитохромы P450 семейства CYP74, а именно – алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ) и дивинилэфирсинтазы (ДЭС). Относительно механизмов катализа, определяющих специфичность действия ферментов этого семейства, единого мнения у исследователей не существует. К настоящему времени методом рентгеноструктурного анализа расшифрованы третичные структуры только двух алленоксидсинтаз. Недостаточное исследование фермент-субстратных комплексов для ферментов CYP74 не позволяет проводить высокоточное моделирование взаимодействия субстрата и активного центра. Получение рентгеноструктурных моделей данных ферментов крайне затруднено, в том числе и в связи со значимыми размерами и сложностью получения кристаллических форм. Решением данной проблемы стало создание методами генетической инженерии мини-фермента, моделирующего каталитический центр большого белка, с последующим анализом его структуры в комплексе с субстратом методом ЯМР высокого разрешения. Мы получили мини-фермент (25 кДа) на основе аминокислотной последовательности алленоксидсинтазы LeAOS3 (CYP74C3) томата (56 кДа). Мини-фермент сохранил способность удерживать в своем составе гем, а также катализировать превращения гидроперекисей жирных кислот – природных субстратов ферментов CYP74. Однако механизм реакции был изменен: аналогичные продукты были получены в реакциях, катализируемых мутантными формами ферментов CYP74. Методом докинга было показано, что субстрат может образовывать энергетически выгодные комплексы с мини-ферментом, с энергией взаимодействия от -3 до -12 ккал/моль. При этом субстрат локализуется как в области активного центра, так и вне его, а наиболее энергетически выгодные комплексы были обнаружены в активном центре фермента. Анализ различных вкладов в полную энергию взаимодействия показывает, что электростатическое взаимодействие белка с субстратом слабое, и наибольший вклад в энергию взаимодействия вносят энергия Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, водородных связей и энергия сольватации.

Работа поддержана грантами РФФИ 11-04-01601-а, 12-04-97087-р_поволжье_а, ГК 16.740.11.0197, МК-1439.2011.4, НШ-825.2012.4 и программой фундаментальных исследований "Молекулярная клеточная биология".

**ТЕОРИЯ И КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ БИНАРНЫХ СМЕСЕЙ ЖЕСТКИХ/
ПОЛУЖЕСТКИХ БИОПОЛИМЕРОВ С ИЗОТРОПНЫМИ МОЛЕКУЛАМИ****Theory and computer simulation of binary mixtures of rigid/semi-flexible
biopolymers and isotropic molecules****Тупицына А.И. ¹, Неелов И.М. ², Даринский А.А. ²**

1 – Институт проблем машиноведения РАН, 199178, Санкт-Петербург, Большой 61

2 – Институт высокомолекулярных соединений РАН,

199004, Санкт-Петербург, Большой 31

Тел.: +7(812)328-56-01; факс: +7(812)328-68-69; e-mail: i.neelov@mail.ru

Теория Парсонса-Ли (ПЛ) для разделения фаз в бинарных смесях жестких (полужестких) полимерных (биополимерных) молекул из анизотропных мономеров и изотропных сферических молекул была обобщена на случай непрерывных потенциалов взаимодействия. Взаимодействия между частицами обоих типов молекул были описаны на основе модели, состоящей из жесткого ядра и мягкой оболочки.

Для смесей жестких полимеров со сферами была построена теория и проведено моделирование методом молекулярной динамики (МД) систем с разной концентрацией полимера. Было показано, что результаты проведенного МД моделирования лучше описываются нашей обобщенной теоретической моделью ПЛ для «мягких» частиц, чем исходной теорией ПЛ для твердых частиц того же размера. Более детальный анализ результатов моделирования для смесей сфероцилиндров и сфер показал, что сферические частицы разрушают нематические образования, связанные с дальним порядком, в то время как локальные домены, состоящие из сфероцилиндров, становятся более плотными и более упорядоченными при увеличении доли сфер в смеси.

Теоретическое изучение и МД моделирование перехода порядок-беспорядок в смеси полужестких полимеров со сферическими молекулами было проведено на основе модели полимерной цепи, состоящей из свободно-сочлененных сфероцилиндров и сферических частиц. Эта система была описана как двухфазная: фаза полимерного клубка (включающего сферы) и фаза, состоящая из чистых сферических частиц. Мы рассмотрели полимерную фазу в виде смеси свободных сфероцилиндров (без учета связей в цепь) и сфер, находящихся внутри полимерного клубка. В такой модели переход порядок-беспорядок в цепи определяется параметрами бинарной смеси свободных сфероцилиндров и сфер. Закономерности и параметры фазовых переходов в соответствующих свободных бинарных смесях частиц были получены из прямого МД моделирования. Свободная энергия Гельмгольца для клубка рассчитывалась с помощью теории ПЛ. При этом параметры сосуществования фаз определялись из уравнений фазового равновесия. Кроме моделирования методом МД свободных систем, описанных ранее, мы провели МД моделирование смесей, включающих полимерные цепи разной длины. Было показано, что переход определяется силами истощения между анизотропными мономерами цепей и изотропными сферами. Работа выполнена при поддержке РФФИ 10-04-01156-а и ОХМНЗ РАН.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИФфуЗИИ ИОНОВ В СТОХАСТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ЛАНЖЕВЕНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРИБЛИЖЕНИЯ ДИЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ТРЕНИЯ**Model of ion diffusion based on stochastic integration of Langevin equation at dielectric friction approximation****Турченков Д.А.¹, Бороновский С.Е.², Нарциссов Я.Р.³**

1 – Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»,
115409, г. Москва, Каширское ш., 31;

² – НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии,
115404, г. Москва, ул. 6-я Радиальная, д. 24, стр. 14.
Тел./факс: +7(495) 327-49-87; e-mail: icmph@yandex.ru

Среди существующих методов МД наибольший практический интерес представляет динамика Ланжевена, позволяющая обойти ресурсоемкие расчеты взаимодействия исследуемого вещества с молекулами растворителя, что делает данный подход основным при изучении вопросов динамики белков в различных растворах, образования белок-белковых комплексов и позволяет рассматривать биологическую систему на макроуровне. В данной работе рассматривается возможность применения динамики Ланжевена для моделирования диффузии ионов как в воде, так и в водных растворах различных электролитов. Для решения поставленной задачи был использован разработанный автором программный пакет PCS (Patch Clamp Simulation), осуществляющий моделирование биологических систем с использованием методов броуновской динамики, возможностью интерактивной визуализации и поддержкой аппаратного ускорения. Для описания движения броуновской частицы использовалось точное решение уравнения Ланжевена [1], в котором внешние силы, действующие на частицу, учитывались через суммарный потенциал, состоящий из кулоновского и парного потенциала Леннард-Джонса взаимодействия. Учет дополнительных ион-дипольных и диполь-дипольных взаимодействий приводит к изменению микровязкости раствора вблизи броуновской частицы, диэлектрической проницаемости среды и плотности растворителя. Это обстоятельство позволяет говорить о дополнительной (помимо гидродинамической) [2] диссипации энергии в силу диэлектрического трения. В данной работе рассматривается приближения отсутствия сольватации. Используя данную методику, для части сильных электролитов были проведены расчеты коэффициентов диффузии и самодиффузии ионов при различных концентрациях электролитов. Отметим, что для больших концентраций удалось выявить отклонение от эмпирического уравнения Онзагера, что соответствует экспериментальным данным [3,4]. Таким образом, на основе разработанного программного модуля PCS была успешно решена задача моделирования процесса диффузии различных ионов в водном растворе с учетом дополнительных диэлектрических поправок к коэффициенту трения. Полученные результаты представляют собой основу для дальнейших исследований в области диффузии ионов, пассивного транспорта и ионной проводимости каналов.

1. Д. Турченков and М. Турченков, *Ки&М* 4, в печати (2012).
2. S. Koneshan, R. M. Lynden-Bell, and J. C. Rasaiah, *J. Am. Chem. Soc.* 120, 12041 (1998).
3. J. H. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* 75, 1769 (1953).
4. E. C. Zhong and H. L. Friedman, *J. Phys. Chem.* 92, 1685 (1988).

**МЕТОД ВЫЧИСЛЕНИЯ КОЭФФИЦИЕНТА ТРЕНИЯ БРОУНОВСКИХ ЧАСТИЦ
НА ОСНОВЕ АВТОКОРРЕЛЯЦИОННОЙ ФУНКЦИИ СКОРОСТИ ИЛИ СИЛЫ
ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ БИОМЕМБРАН МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ**

**A new method of calculation of friction coefficient in Langevin equation
using velocity or force autocorrelation function in molecular dynamic simulations of
different membrane phenomena**

Турченков Д.А¹

1 – Научно-исследовательский центр “БиоСим”,
г. Москва, Каширское ш., дом 55, корпус 3
Тел./факс: +7(495) 344-69-43; e-mail: biosim.rg@gmail.com

Использование методов броуновской динамики для задач биологического моделирования параметризуется выбором усредненного действия растворителя на частицу. В классической модели Ланжевена таким параметром раствора является коэффициент трения γ , вид которого зависит от используемого приближения. Так, для непрерывной вязкой жидкости и больших размеров частиц используется приближение Стокса, учет диэлектрической природы растворителя дает теория Адельмана, Онзагера [1], в газах при малых числах Кнудсена следует вводить поправки Каннингема [2], и т.д. В данной работе предложен новый метод численного определения коэффициента трения из молекулярно-динамических расчетов системы ионов в водном растворе, не зависящий от использования приближений вышеуказанного характера. Взаимодействие моделируется суммой парных потенциалов Кулона и Леннарда-Джонса. Растворитель моделируется методом SPC/E. Величина γ определяется через автокорреляционную функцию скорости (VAC) или силы (FAC) [3]. Расчеты проводились с использованием авторского программного пакета PCS, созданного для моделирования биомембран и поддерживающего параллельные вычисления на графических процессорах (технология CUDA).

1. J.-H. Chen and S. A. Adelman, The Journal of Chemical Physics 72, 2819 (1980).
2. E. Cunningham, Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences 83, 357 (1910).
3. H. Uchida and M. Matsuoka, Fluid Phase Equilibria 219, 49 (2004).

**ИЗМЕНЕНИЯ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ
БЕЛКА ПРИ ДЕФОРМАЦИИ ФИБРИНОВЫХ СГУСТКОВ****Protein secondary structure changes in a fibrin clot upon deformation****Файзуллин Д.А.¹, Зуев Ю.Ф.¹, Weisel J. W.², Litvinov R.I.²**

1 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111, Казань, ул. Лобачевского 2/31;

² – Department of Cell and Developmental Biology, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA

Тел.: +7(843)231-90-38; факс: +7(843) 292-73-47; e-mail: dfaizullin@mail.ru

Фибрин – белковый полимер, образующийся из фибриногена плазмы крови под действием фермента тромбина. Фибрин состоит из разветвленных волокон, которые образуют основу кровяного сгустка или тромба. Сеть фибрина претерпевает растягивающие и сжимающие деформации под действием тока крови, колебания стенок сосудов и при смещении краев раны. Вариабельность механических свойств фибрина определяет течение тромботических осложнений и эффективность противотромботической терапии. Кроме того, механические свойства фибрина важны при его использовании для создания искусственных органов и тканей, средств адресной доставки лекарств и тканевого клея. Управление механическими свойствами фибрина на молекулярном уровне может иметь важные практические следствия, однако сложная динамичная архитектура молекул фибрина и образуемых ими волокон затрудняет структурное обоснование его механических свойств.

В данной работе методом инфракрасной спектроскопии неполного внутреннего отражения изучены изменения вторичной структуры фибрина при механической деформации гидратированных фибриновых гелей, полученных свертыванием плазмы донорской крови путем ее рекальцификации с последующей отмывкой от водорастворимых белков.

Содержание упорядоченных типов вторичной структуры в нативном фибрине, по результатам разложения ИК-спектров, составило 30-32% альфа-спиралей и 36-38% бета-структур. Согласно кристаллографическим данным для фибриногена, альфа-спираль почти целиком сосредоточена в суперспиральных доменах, образованных тремя полипептидными цепями. При относительно небольших деформациях (растяжении 100% и менее) вторичная структура фибрина меняется незначительно и изменение размеров сгустка обусловлено преимущественно изменением ориентации и выпрямлением фибриновых волокон. Деформация геля растяжением или сдавливанием приводит к уменьшению спиральности и росту содержания вытянутой бета-структуры при относительно слабом изменении структур других типов. Уменьшение спиральности при трехкратном растяжении сгустков составляет порядка 15%. Увеличение доли бета-структур сопровождается появлением спектральных признаков межмолекулярных (межцепочечных) агрегатов. Полученные результаты впервые показывают, что растяжение или сжатие фибриновых сгустков сопровождается изменениями вторичной структуры по типу альфа-бета перехода, которые являются частью механического развертывания белка и представляют собой важный механизм деформации белкового полимера.

**ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ ЛИПОСОМ В ПРИСУТСТВИИ АНТИОКСИДАНТА
ИХФАН ПО РЕЗУЛЬТАТАМ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ И ЭПР
СПЕКТРОСКОПИИ**

**Changing the structure of liposomes in the presence of antioxidant ichphan on the
results of small-angle X-ray scattering and EPR spectroscopy**

**Фаткуллина Л.Д., Кривандин А.В., Шаталова О.В., Голощاپов А.Н.,
Бурлакова Е.Б.**

ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН;
119334, Москва, ул. Косыгина, 4;
Тел.: +7(495)9397181; Факс: +7(499)1374101; E-mail: bcp-lfat@mail.ru

Одним из перспективных направлений современной химии биоантиоксидантов является синтез «гибридных» соединений, молекулы которых содержат фрагменты, обеспечивающие этим соединениям помимо антиоксидантной активности ряд других специфических функций. В ИБХФ РАН синтезированы средства терапии нового поколения – гибридные антиоксиданты ихфаны, которые являются производными фенозана [β -4-окси-(3,5- дитретбутил-4-оксифенил) калий пропионат] и включают в себя кроме антиоксидантной части остаток холина, обеспечивающий антихолинэстеразную активность, а также жирнокислотный фрагмент, влияющий на вязкостные свойства мембран и способствующий проникновению через гематоэнцефалический барьер. Благодаря такому сочетанию свойств, ИХФАНЫ являются перспективными соединениями для разработки на их основе новых эффективных лекарственных средств для лечения болезни Альцгеймера. Одним из необходимых условий понимания молекулярных механизмов биологического действия ИХФАНов является изучение их возможности встраиваться в липидные мембраны и влиять на их структурно-функциональные характеристики. Методом малоугольного рентгеновского рассеяния исследована структура многослойных липосом, полученных из растворов в хлороформе яичного фосфатидилхолина и синтетического антиоксиданта ИХФАНа при содержании антиоксиданта 0, 2, 4, 5, 10, 15 и 20% от массы липидов. Показано, что в присутствии ИХФАНа происходит уменьшение толщины липидных мембран и периода их укладки в липосомах. Наибольшей величины этот эффект достигает при содержании ИХФАНа в дисперсии около 5% от массы липидов. При более высоком содержании антиоксиданта наблюдается ухудшение упорядоченности мембран в липосомах, что, вероятно, вызвано микрофазной сегрегацией препарата в мембранном мультислое. Таким образом, наши исследования показали способность ИХФАНа встраиваться в липидные модельные мембраны и изменять их структуру. При этом по данным ЭПР спиновых зондов существенного изменения микровязкости липидных мембран не происходит. Способность ИХФАНа встраиваться в липидные мембраны и модифицировать их структуру является важным фактором биологического действия этого нового «гибридного» антиоксиданта. Использованная в работе методика получения липосом с ИХФАНом может найти применение при разработке новых лекарственных препаратов на основе таких липосом.

**ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРИ
ОБРАЗОВАНИИ БЕЛОК - БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ И
БРОУНОВСКОЙ ДИНАМИКИ.**

**The study of the mechanisms of intermolecular interactions in the formation of
protein – protein complexes by molecular and Brownian dynamics.**

Федоров В. А., Коваленко И. Б., Абатурова А. М., Хрущев С. С., Ризниченко Г. Ю.

Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Россия,
119991, Москва, Ленинские горы 1, стр. 12.

Телефон: +7(495)939-02-89; Факс: +7(495)939-11-15; e-mail: xbgth@yandex.ru.

Большинство биологических функций связано с функционированием белковых молекул и их комплексов. Понять механизмы белок-белковых взаимодействий, основываясь на их пространственной структуре, помогают молекулярные компьютерные модели. В работе исследуется термодинамика и кинетика процессов формирования межмолекулярных белок – белковых комплексов белков пластоцианина и цитохрома f. Пластоцианин – это небольшой водорастворимый медьсодержащий белок, образование комплекса пластоцианина с цитохромом f (субъединицей цитохромного bf комплекса) является важным элементом цепи фотосинтетического электронного транспорта в мембране тилакоида хлоропласта. Одна из целей работы – вычисление константы скорости образования комплекса белков пластоцианина и цитохрома f. Оценка характерных времен образования и распада комплекса пластоцианина с цитохромом f по данным метода спектроскопии в остановленном потоке составляет 10-5 – 10-4 с. Так как расчет траекторий молекулярной динамикой на временных интервалах свыше 10-8 – 10-7 с затруднен, нами последовательно используются методы броуновской и молекулярной динамики. На первом этапе методом броуновской динамики моделируется диффузия молекул белка в растворе до образования предварительного комплекса, затем с помощью метода молекулярной динамики исследуется превращение предварительного комплекса в финальный, в котором возможен транспорт электронов.

Используется подход полноатомной молекулярной динамики. Поскольку в реальных условиях исследуемые белки находятся в растворе и активно взаимодействуют с молекулами растворителя, численный эксперимент проведен с учетом молекул растворителя в явном виде. Для вычислений использован пакет компьютерных программ Gromacs. Для моделирования использовалось силовое поле OPLS, специально разработанное для моделирования молекулярной динамики биологических макромолекул в конденсированных средах. Указанные подходы позволяют корректно описать конформационные изменения белков в процессе образования межмолекулярных комплексов и оценить термодинамические характеристики этого процесса.

ИЗУЧЕНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ ПО КИНЕТИКЕ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРИ ДОБАВКАХ ТЕРТ-БУТИЛГИДРОПЕРОКСИДА

Study of oxidative stress regulators in liver mitochondria from the membrane potential kinetics in the course of tert-butylhydroperoxide additions

Федотчева Н.И.^{1,3}, Мохова Е.Н.^{2,3}

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290 Пущино,

²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ,

Москва, ³НИИ Митохондриологии МГУ.

e-mail: nfedotcheva@mail.ru

При изучении антиоксидантов и роли митохондрий в повреждении и гибели клеток под действием окислительного стресса в ряде работ вместо H₂O₂ используют терт-бутилгидропероксид (tBHP), если митохондрии обладают высокой каталазной активностью. Механизм активации окислительного стресса известен лишь в общих чертах, он в значительной степени зависит от условий экспериментов. Z. Drahotа и коллеги опубликовали убедительные данные в пользу того, что добавление tBHP гораздо сильнее и при меньших концентрациях нарушает функционирование первого комплекса дыхательной цепи, чем остальных комплексов [1].

В настоящей работе был разработан метод быстрой оценки чувствительности выделенных митохондрий к индукторам окислительного стресса. Трансмембранную разность электрических потенциалов на внутренней мембране митохондрий (ММП) оценивали с помощью ТФФ+- селективного электрода с компьютерной обработкой. Митохондрии инкубировали в гипотонической сахарозной среде, субстрат – пируват. Между пробами ТФФ+- селективный электрод промывали 50% спиртом. Повреждающее действие tBHP оценивали по числу добавок tBHP, после которых tBHP индуцировал кратковременный спад ММП с возвращением к исходному уровню. При слабых эффектах повреждение оценивали по необратимой части спада ММП.

Во всех опытах низкие концентрации FeSO₄ усиливали повреждающее действие tBHP. Внесение 2 мкМ FeSO₄ приводило к тому, что уже после второй добавки tBHP ММП не возвращался к исходному уровню. Оказалось, что повреждение митохондрий под действием FeSO₄ значительно возрастало под действием ионов Ca²⁺, начиная с 2 мкМ CaCl₂. Циклоспорин А полностью предотвращал описанные выше эффекты и значительно увеличивал число добавок tBHP в контрольных пробах. При использовании непараметрического критерия – правила знаков [2] описанные эффекты имели уровень значимости ниже 0,01.

Следовательно, в условиях наших экспериментов повреждающий эффект tBHP обусловлен открытием неспецифической Ca²⁺-зависимой циклоспорин А-чувствительной поры. Этот метод позволил также представить наглядные примеры как антиоксидантного, так и изученного нами ранее прооксидантного эффекта аскорбата, добавленного в присутствии FeSO₄ [3]. В пробах без FeSO₄ наблюдали обычно описываемое антиоксидантное действие, либо эффект аскорбата отсутствовал.

1. Drahotа Z. et al. / *Physiol Res*. 2009. V. 58. P. 685-692.

2. Sigel S. / *Nonparametric statistics in science and behavior*. 1956. N.Y.

3. Брайловская И. В. и др. / *Биохимия*. 2001 V.66 P.909-912.

ВЛИЯНИЕ ГИБЕРНАЦИИ И ИСКУССТВЕННОГО ГИПОБИОЗА НА АКТИВНОСТЬ ОРНИТИНДЕКАРБОКСИЛАЗЫ МЫШЦ. THE INFLUENCE OF HIBERNATION AND ARTIFICIAL HYPOBIOSIS ON THE ORNITHINE DECARBOXYLASE ACTIVITY IN MUSCLES.

Фиалковская Л.А., Аксенова Г.Е., Захарова Н.М., Коломийцева И.К.

Федеративное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук (ИБК РАН),
142290, Моск. обл., г. Пущино, ул. Институтская, 3.
Тел.: +7(4697)73-93-26; e-mail: fialkovskaya_l@rambler.ru

Полиамины играют важную роль в пролиферации и функциях клеток. Активность орнитиндекарбоксилазы (ОДК, КФ 4.1.1.17) – лимитирующего фермента синтеза полиаминов – служит маркером активации клеток. При адаптации млекопитающих к низким температурам окружающей среды в состояниях природного и искусственного гипобиоза основным источником тепла в процессе возвращения к активному состоянию служат скелетные мышцы. Сердце при этом подвергается чрезвычайным нагрузкам. Изучение влияния природного и искусственного гипобиоза на активность ОДК скелетных мышц и мышцы сердца представляет большой интерес. Искусственный гипобиоз у крыс Wistar вызывали методом «закрытого сосуда»; сусликов *S. undulatus* брали в опыт в летний период и в сезон зимней спячки. Зимние суслики были разделены на две группы: спящие, в середине баута при температуре тела от 1,0 до 6,0 °С, и зимние межбаутные активные, через 12-24 ч после пробуждения. Радиоизотопным методом исследовали активность ОДК в миокарде и в четырехглавой мышце бедра. У летних сусликов активность ОДК в сердечной мышце превышала активность ОДК в других паренхиматозных органах и была в 3 раза выше, чем в печени и в слизистой оболочке кишечника, в 6 раз выше, чем в почках и в костном мозге и в 15 раз выше, чем в селезенке. В четырехглавой мышце бедра сусликов активность ОДК была в 2 раза выше, чем в сердечной мышце. Состояние гибернации сусликов *S. undulatus* не вызывало изменений активности ОДК в скелетных и сердечной мышцах, в отличие от всех остальных исследованных органов и тканей, где наблюдали сезонное или функциональное (в ходе баута гибернации) снижение активности ОДК. Известно, что голодание вызывает снижение активности ОДК в мышцах млекопитающих, в то же время отсутствие экзогенного питания при гибернации не приводило к снижению активности ОДК в мышцах сусликов. В сердце крысы активность ОДК в норме была примерно равна ее активности в почках и слизистой оболочке кишечника. Состояние искусственного гипобиоза снижало активность ОДК сердца, слизистой оболочки и других тканей, тогда как активность ОДК почки росла более чем в 2 раза. Активность ОДК четырехглавой мышцы бедра у крыс в норме была так же низка, как в печени и селезенке, но не падала при гипобиозе. Активность ОДК скелетной мышцы крысы в 10 раз ниже активности ОДК скелетной мышцы суслика и не менялась при гипобиозе. Активность ОДК сердечной мышцы крысы в контроле практически не отличается от активности ОДК сердца суслика, но в отличие от последней снижается в состоянии гипобиоза. Таким образом, выявлено различие во влиянии природного и искусственного гипобиоза на активность ОДК сердечной мышцы. Высокая активность ОДК скелетных мышц суслика может быть обусловлена как видовым различием, так и фенотипической адаптацией.

Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-00993-а, 2009-2011 гг.

РЕГУЛЯЦИЯ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ КОЛЛАГЕНОВ: РОЛЬ ЛОКАЛЬНЫХ И МАСШТАБНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ АМИНОКИСЛОТ И ГИДРАТАЦИИ ПЕПТИДНЫХ ГРУПП

Regulation of collagen thermostability: the role of local and nonlocal characteristics of amino acid sequences and hydration of peptide groups

И.В. Филатов¹, Е.И. Тиктопуло², Ю.В. Мильчевский¹, В.А. Намиот³, М.А. Рубин¹, В.Г. Туманян¹, Н.Г. Есипова¹

¹ – ФГБУ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32; ² – ФГБУ Институт белка РАН, почтовый адрес: 142290, Московская обл., г. Пушкино ул. Институтская, 4; ³ – Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Институт ядерной физики, 119992, Москва, Воробьевы горы, 1

В данной работе предлагаются результаты детального анализа термодинамических параметров перехода в коллагенах на примере коллагена типа I из разных источников. Анализ показал, что с изменением процентного содержания иминокислот меняется не только температура, энтропия и энтальпия переходов, но и число кооперативных единиц. Это означает, что адаптации включает также масштабные изменения характеристик последовательностей аминокислот в коллагенах, которые приводят к изменению размеров кооперативных областей, т.е. в пространстве нативной структуры возникает существенная неоднородность распределения энергии основных стабилизирующих взаимодействий. Такого рода масштабные изменения требуют существенных нелокальных изменений в структурных характеристиках макромолекул.

В нашей работе демонстрируется, что основным источником этой неоднородности является распределение межпептидных водородных связей по пространству нативной структуры фибриллярной макромолекулы, которая меняется с изменением числа иминокислот, вызывая также существенные для стабильности изменения гидратации остова полипептидной цепи коллагена. Методами анализа Фурье-спектров в ИК-области показано, что ширина полосы Амид А увеличивается с увеличением числа кооперативных единиц, проявляемого при калориметрических экспериментах. Фундаментальный факт роста числа кооперативных единиц с увеличением числа иминокислот позволяет утверждать, что масштабность структур, определяющих размеры кооперативных единиц в фибриллярных макромолекулах коллагенов порядка 150 Å, т.е. порядка 15 трипептидных единиц вдоль оси макромолекулы, а следовательно, не может быть исчерпана моделями гомополитрипептидов. В работе показано также, что механизм влияния иминокислот на термодинамические характеристики коллагенов связан со сложным ходом процесса денатурации, при котором механизмы гидратации-дегидратации существенно меняются при замене иминокислот на любую аминокислоту. Таким образом, было установлено, что тонкая регуляция термостабильности коллагенов при изменении масштабных характеристик последовательности осуществляется как за счет изменения числа кооперативных участков в еще нативной структуре (возникновение неоднородностей в энергии межпептидных сеток Н-связей), так и за счет нарушения кооперативной гидратации в постденатурационной левой спирали типа полипролин II в местах включения в нее иминокислот. Показано, что кооперативный характер гидратации одиночной полипептидной цепи в конформации полипролин II определяется последовательностью и симметрией расположения иминокислот.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программ Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Фундаментальные науки – медицине» и гранта РФФИ № 12-04-90051-Бел_a.

СТРУКТУРНО-ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ХИМЕРНЫХ БЕЛКОВ

Structural-thermodynamic studies of chimerical proteins

Филимонов В.В.

Институт белка РАН, 142290, г. Пущино Московской области, Россия
Тел.: +7(495) 514-02-18; факс: +7(495) 514-02-18; e-mail: vladimir@vega.protres.ru

Для уточнения структурно-энергетических корреляций, лежащих в основе алгоритмов моделирования структуры белков и взаимодействия между ними, необходимо продолжать термодинамические исследования подходящих моделей, параллельно расшифровывая их трехмерные структуры. Почти идеальной основой для создания таких моделей являются хорошо изученные "минимальные" глобулярные белки, такие как SH3 домены, состоящие всего из шестидесяти аминокислот. В течение ряда лет были созданы и изучены два вида химерных белков. Одни из них имели вставку длиной восемь аминокислот, удлиняющую одну из природных β -шпилек так, что вставка выступала за пределы глобулы в виде «носа» (химеры типа «Бержерак»). В других, десятичленный пептид, являющийся лигандом домена, присоединялся к концам белка или его кругового пермутанта через линкеры разной длины. Использование химерных белков обоих типов предоставляет ряд важных преимуществ для экспериментальных исследований, как термодинамических так и структурных. С помощью этих моделей была исследована термодинамика образования квази-изолированных β -шпилек в зависимости от их первичной структуры, а также энергетика образования комплексов пептидных лигандов с SH3 доменами. В результате определения пространственных структур химерных белков методами рентгеноструктурного анализа и ЯМР была дана структурная интерпретация полученной термодинамической информации.

ИЗУЧЕНИЕ КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ГЕМОГЛОБИНА У БОЛЬНЫХ СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПРИ ПОМОЩИ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Oxygen binding study by hemoglobin using Raman spectroscopy for vascular diseases

Фирстова Н.С., Брагин В.А., Ревина Э.С., Кочеткова Н.В., Ревин В.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», Республика Мордовия, г. Саранск, Россия, 430005, Большевикская, 68
Тел.: +7(342)32-45-54; факс: +7(342)32-45-54; e-mail: braginya@mail.ru

Гемопорфирин гемоглобина обладает довольно интенсивным комбинационным рассеянием света, так как в его состав входят гетероциклы с сопряженными связями. Спектр гемоглобина представляет собой совокупность полос, вызванных колебаниями связей в гемопорфирине. При ряде заболеваний изменяется структура и свойства гемоглобина в эритроцитах. Одним из малоизученных вопросов остается исследование структуры эритроцитов, конформации и свойств гемоглобина при развитии дисциркуляторной энцефалопатии. При прогнозировании сосудистых заболеваний ценную информацию можно получить анализируя структурные изменения гемопорфирина гемоглобина эритроцитов [1]. Материалом исследования служила кровь практически здоровых людей (контрольная группа – 10 человек) и кровь больных дисциркуляторной энцефалопатией до лечения, во время лечения и после лечения (19 человек). Исследование выполнено на рамановском спектрометре *in via Basis* фирмы Renishaw с короткофокусным высокосветосильным монохроматором (фокусное расстояние не более 250 мм). Для возбуждения рамановских спектров использовался лазер (длина волны излучения 532 нм, мощность излучения 100 мВт, объектив 50х). Регистратор данных – CCD детектор (1024x256 пикселей с пельтье-охлаждением до – 70°C) с решеткой 1800 штр/мм. Оцифрованные спектры обработаны в программе WIRE 3.3. Произведена коррекция базовой линии, сглаживание спектров. В данной работе для анализа конформации и O₂-связывающих свойств гемоглобина эритроцитов человека использовали следующие полосы спектров комбинационного рассеяния (положение максимумов): 1355 и 1375 см⁻¹, данные полосы связаны с симметричными колебаниями пиррольных колец в молекулах дезоксигемоглобина и гемоглобина, связанного с лигандами, соответственно. Полосы 1548-1552, и 1580-1588 см⁻¹ связаны с колебаниями метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина в которых гемопорфирин растянут и деформирован (1548-1552 см⁻¹) и где гемопорфирин имеет более компактную недеформированную конформацию (1580-1588 см⁻¹). В первом случае кислород хуже связывается и мало удерживается на гемопорфирине, во втором – лучше. Анализ отношения интенсивностей полос спектров комбинационного рассеяния показал, что дисциркуляторная энцефалопатия сопровождается снижением способности гемоглобина связывать кислород на 58% по отношению к контролю, причем данная динамика сохраняется у всех больных, вне зависимости от лечения. Сродство гемоглобина к кислороду снижается на 65% относительно контрольной группы. Следует также отметить, что существенных различий между группами больных: до лечения, во время лечения и после лечения не выявлено, а выраженные изменения проявляются только по отношению к контролю. Таким образом, можно сделать вывод о том, что дисциркуляторная энцефалопатия сопровождается изменениями структурно-физиологических свойств гемоглобина, проявляющиеся в изменении его конформации и O₂-связывающей способности.

**О ПРИМЕНИМОСТИ МАТЕМАТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ ТИПА ВАН-ДЕР-ПОЛЯ
К ОПИСАНИЮ РАБОТЫ ВОЗБУДИМЫХ БИОМЕМБРАН****About applicability of mathematical models of type of Van-der-Pol to the
description of work of excitable biomembranes****Фомин Л.Б.**

Специализированная кардиохирургическая клиническая больница
Нижний Новгород, 603950, ул. Ванеева, 209
Тел.: 8(831)4177790, ddeejj@yandex.ru

Наряду с использованием канонических дифференциальных уравнений Ходжкина-Хаксли четвертого порядка (и их модификаций), уравнений Зимана третьего порядка для описания и анализа работы возбудимых биомембран (ВБМ) используются уравнения типа Ван-дер-Поля (ВДП) второго порядка (Фитц-Хью, 1961). Системы типа ВДП применяются для удобства анализа движения переменных (в частности, токов и напряжений в ВБМ) и дают хорошее сходство по форме, амплитуде, скважности с реально измеренными параметрами импульсов в ВБМ. Однако, например, в основополагающей работе Фитц-Хью не указаны временные интервалы в поведении переменных при генерации автоколебаний, а частотные характеристики соответствующей модели типа ВДП не рассматривались. В связи с этим, представляется важным рассмотрение диапазона частот колебаний в системе ВДП в автоколебательном режиме для оценки адекватности модели типа ВДП к реальным движениям переменных в ВБМ.

Для такого анализа систем ВДП удобно перейти к схеме замещения типа генератора на туннельном диоде (ГТД), поскольку движения токов и напряжений полностью описывается аналогичными уравнениями. Частота релаксационных (при адекватной форме импульсов) автоколебаний колебаний зависит от соотношения потерь (R - сопротивление потерь мембранного перехода МП), подкачки (E - мембранная э.д.с.) и величины отрицательного сопротивления на падающем участке вольт-амперной характеристики (ВАХ) туннельного диода, или, иначе, от угла между нагрузочной прямой и касательной к падающему участку ВАХ в точке пересечения.

Рассматривалась зависимость периода колебаний (в параметрическом пространстве устойчивости), например, от R , где имеется верхний порог насыщения T_0 , что соответствует $\sim 0,1$ мсек, или ~ 10 кгц. Это согласуется с данными из теоретической радиотехники: частота в данном ГТД не может быть ниже собственной частоты LC-контура ($\omega_0 = 1/(2\pi(LC)0,5)$), который входит в схему ГТД.. В нашем случае (ВБМ), при $L \sim 10^{-6}$ Н (индуктивность МП), $C \sim 10^{-6}$ Ф (емкость МП), $R \sim 1$ Ом (сопротивление потерь МП), $E \sim 0,1$ В (э.д.с. МП) $\omega_0 \sim 105$ гц.

Таким образом, при работе ГТД (с реальными биофизическими значениями параметров) в пространстве устойчивых релаксационных колебаний частота не может быть ниже ~ 10 кгц, что соответствует ЧСС $\sim 6 \cdot 10^5$ уд/мин. Это значит, что моделирование работы ВБМ с помощью уравнений ВДП не корректно, так как в реальных ВБМ частоты на три порядка ниже (если считать, что частота электрических автоколебаний в ВБМ задает частоту кардиомиоцита и сердечных сокращений в целом), например рекордные ЧСС (1300 уд/мин) встречаются у колибри и землеройки. Поэтому такой способ моделирования, на наш взгляд, неприменим к описанию формирования сердечного пульса (ЧСС).

**КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ПАЛИНДРОМНОГО ДЕКАМЕРА ДНК
С ТИАКАЛИКС[4]АРЕНОМ ПО ДАННЫМ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ И
МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА**

**Complexation of palindromic DNA decamer with thiacalix[4]arene. NMR-
spectroscopy and molecular docking**

**Хайрутдинов Б.И.¹, Ермакова Е.А.¹, Гоголев Ю.В.¹, Стойков И.И.², Мостовая О.А.²,
Зуев Ю.Ф.¹**

¹ – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт
биохимии и биофизики КазНЦ РАН;

² – Казанский (Приволжский) федеральный университет

Тел.: +7(843)231-90-36; факс: +7(843) 292-73-47; e-mail: yufzuev@mail.ru

В качестве альтернативы вирусным векторам актуальной задачей для генной терапии и решения ряда молекулярно-биологических задач является поиск новых синтетических переносчиков генов. Синтетические агенты способствуют компактизации ДНК, защищают ее от деградации нуклеазами и являются посредником при проникновении в клетку. Недавно было показано, что для переноса генетического материала могут использоваться молекулярные комплексы на основе каликс[4]аренов и ДНК [1].

Целью работы являлось изучение структуры комплекса палиндромного декамера ДНК D(GCGTTAACGC)2 с олигоаммонийным производным п-трет-бутилтиакаликс[4]арена. Показано, что молекула олигонуклеотида ДНК в растворе находится в равновесии между двухцепочечной спиралью (доминирующая структура в растворе) и одноцепочечной формой (минорная структура), свернутой в «шпильку». Проведено полное отнесение спектральных линий для двухцепочечной молекулы ДНК и частичное отнесение для минорной одноцепочечной компоненты. Показано, что происходит образование молекулярного комплекса при смешивании раствора тиакаликс[4]арена с раствором палиндромного декамера ДНК. Выполнено частичное отнесение сигналов в спектрах ЯМР для этого комплекса.

Методами молекулярного докинга рассчитаны возможные варианты образования комплекса двухцепочечной спирали ДНК с тиакаликс[4]ареном. Из полученных вариантов отобраны те, который наилучшим образом согласуется с экспериментальными данными, полученными на основе спектров ЯМР.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 12-03-01085-а).

**ФУНКЦИОНАЛЬНО ЗНАЧИМОЕ ПЛАВЛЕНИЕ/ОТВЕРДЕВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ
МЕМБРАНЫ: ИЗВЕСТНЫЕ И ОЖИДАЕМЫЕ СВОЙСТВА ФАЗОВОГО ПЕРЕХОДА**

**Functionally significant melting/solidification of a biological membrane: known and
expected properties of the phase transition**

Харакоз Д.П.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290 Пущино, Институтская 3.
E-mail: kharakoz@iteb.ru

В докладе рассматриваются следующие вопросы:

1. Фазовый переход плавления/отвердевания липидных цепей зачем-то нужен клетке.
2. Обосновывается концепция фазово-переходной молекулярной машины и рассматривается ее возможное значение для механизма синаптической передачи. Формулируется фазово-переходная модель синаптического экзоцитоза.
3. Сведения о кинетике фазового перехода отвердевания цепей в модельных липидных мембранах, получаемые из сочетания экспериментальных данных и компьютерного моделирования, хорошо согласуются с известными данными по кинетике синаптической передачи.
4. Следствия фазово-переходной модели дают ответ на ряд физиологических загадок. Одна из наиболее интригующих среди них – это главная загадка сомнологии – в чем состоит восстановительная функция сна и почему она несовместима с состоянием бодрствования.
5. Фазовый переход с необходимыми свойствами возможен только в ограниченных участках мембраны, в мембранных доменах. Молекулярный состав домена должен отвечать условию физико-химического компаунда, то есть, это должна быть такая смесь компонентов, которая в отношении фазового перехода ведет себя как однокомпонентная система.
6. В клетке должен существовать механизм восстановления чистоты физико-химического компаунда. На роль такого механизма претендует "перекристаллизация" из расплава. Рассмотрены условия, при которых этот механизм может осуществляться.
7. Для объяснения особенностей физиологии клетки необходимо предположить, что, во-первых, фазовый переход в мембране происходит несимметрично – в одном из двух монослоев и, во-вторых, "перекристаллизация" сопровождается поперечным транспортом вещества (флип-флоп диффузия).

**РОЛЬ КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА В ВЫЖИВАНИИ ЗАРОДЫШЕЙ ПОСЛЕ
ОСМОТИЧЕСКОГО ШОКА И МИКРОИНЪЕКЦИИ****The role of trophoblast cells in embryo survival after osmotic stress and
microinjection****Храмцова Е.А., Межевикина Л.М.**

Институт биофизики клетки РАН,
142290, Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 3
Тел: +7(4967)73-94-50; факс: +7(4967)33-05-09; e-mail: hramelan@gmail.com

Предимплантационное развитие зародышей млекопитающих завершается стадией бластоцисты, на которой формируется полость, заполненная жидкостью – бластоцель. Увеличение объема бластоцели необходимо для выхода зародыша из блестящей оболочки, имплантации и наступления беременности.

Слой клеток трофобласта (ТБ) принимает активное участие в формировании полости бластоцели -кавитации. Трофобласт выделяется из внешнего слоя клеток, который за счет поляризации мембран создает и активно поддерживает градиент ионов Na⁺ и K⁺ за счет Na/K-АТФазы на базолатеральной мембране, благодаря чему закачивается вода в межклеточное пространство[1,2]. Осмотический шок влияет на развитие зародышей *in vitro*, при этом зародыши на стадии компактной морулы останавливаются в развитии и не могут формировать полость[3] Также зародыши чувствительны к таким повреждающим факторам как микроинъекция. Скорость восстановления объема бластоцист после микроинъекции позволяет оценивать активность клеток ТБ. Задачей исследования было выявить роль клеток ТБ зародышей в условиях осмотического шока и после микроинъекции. На основании активности ТБ разработать критерии оценки выживаемости зародышей на стадии бластоцисты и предсказания имплантационного потенциала.

Компактные морулы и бластоцисты мыши на 30 минут помещали в гиперосмотические условия (614 мОсм), после чего их переносили в среду культивирования (260 мОсм), и оценивали скорость восстановления объема. Выживаемость бластоцист *in vitro* оценивали по способности формировать первичные колонии через 72 ч культивирования. Развитие компактных морул оценивали по способности формировать полость бластоцели и выходу из оболочки через 72 ч, что аналогично имплантации.

Было показано, что компактные морулы медленнее восстанавливали прежний объем, чем бластоцисты. Только лишь 38% компактных морул формировали бластоцисты, остальные зародыши полностью останавливались в развитии. Развитие бластоцист *in vitro* зависело от степени развития слоя ТБ. Поздние бластоцисты восстанавливали прежний объем уже через 2 часа после микроинъекции и осмотического шока и формировали больший процент первичных колоний.

Таким образом, функциональность клеток ТБ позволяет предсказать выживаемость зародышей и способность имплантироваться после различных манипуляций. Для повышения уровня имплантации важно оценить активность клеток трофобласта.

Работа выполнена при поддержке гранта президента РФ ведущих научных школ № НШ-3202.2010.4 «Рецепция сигналов химической и физической природы»

1. Kidder GM.. Can J Physiol Pharmacol./ 2002, v.80(2), p.110-115.
2. Watson AJ, Front Biosci./ 2001, v.6, p. D708-730.
3. Xie Y, Zhong W, et al.. Mol Hum Reprod./ 2007, v.13(7) p.473-481.

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В АКТИН-МИОЗИНОВЫХ ПОПЕРЕЧНЫХ МОСТИКАХ ПРИ РАСТЯЖЕНИИ И УКОРОЧЕНИИ СОКРАЩАЮЩЕЙСЯ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ**А.К. Цатурян, Н.А. Кубасова, С.Ю. Бершицкий, М.А. Ферензи, Т. Нараян, М. Фернадес**НИИ механики МГУ, Москва; ИИФ УрО РАН, Екатеринбург;
Имперский колледж, Лондон; ESRF, Гренобль, Франция

Структурные характеристики миозиновых головок, присоединенных к актину в полностью активированных мышечных волокнах кролика, были охарактеризованы с помощью малоугловой рентгеновской дифракции (станция ID02, синхротронного источника ESRF, Гренобль, Франция). Пучки из 2-3 волокон активировали насыщающей концентрацией Ca^{2+} при 0-2°C, нагревали до температуры 31-34°C, близкой к физиологической, а, когда достигалось плато изометрического сокращения при повышенной температуре, – растягивали с постоянной скоростью 1.-1.2 длины/с или позволяли укорачиваться под нагрузкой около $P_0/3$ или $2P_0/3$, где P_0 – изометрическое напряжение. Две дифракционных диаграммы с экспозицией 10-30 мс, снятые во время каждого прогона экспериментального протокола в ходе изометрического сокращения и в конце периода растяжения или укорочения сравнивали между собой. Динамическую жесткость волокон измеряли с помощью быстрого ступенчатого растяжения в контрольных экспериментах. Для интерпретации экспериментальных данных использовали разработанные нами методы прямого моделирования дифракционной диаграммы мышцы. Растяжение волокон вызывало снижение интенсивностей меридионального рефлекса M3, миозиновых (M1 и M2) и актиновых (A1, A2) внемеридиональных слоевых линий. Динамическая жесткость волокон при этом возрастала примерно на 30%. Эти данные показывают, что растяжение приводит к «расстёгиванию» прочной актин-миозиновой связи и способствует образованию большего числа слабых, точнее, нестерео-специфически связанных актин-миозиновых комплексов, что может объяснить как повышение динамической жесткости, так и чрезвычайно низкую АТФазную активность мышцы, подвергнутой растяжению. Эти свойства могут иметь значение в обеспечении эффективного поглощения кинетической энергии мышцами в фазе приземления при беге и прыжках. Укорочение приводит к снижению жесткости, интенсивности M3 и актин-миозиновой слоевой линии с периодом около 10.3 нм. Изменения интенсивностей актиновых слоевых линий были весьма незначительными при укорочении под нагрузкой, превышающей полумаксимальную. Однако все они заметно снижались, когда нагрузка была менее $0.4P_0$. Данные показывают, что три различных процесса: стерео-специфическое «застёгивание» головок на актине, поворот «рычага», т.е. домена легких цепей миозина относительно каталитического домена головки и изменение скорости отсоединения прочно связанных с актино головок по разному зависят от напряженно-деформированного состояния головки.

Работа была поддержана грантами РФФИ, РАН и Королевского общества Великобритании, а также EMBL.

НИКОТИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ И ИХ ЛИГАНДЫ: ОТ ПРОТЕОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ДО КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ СТРУКТУР**Nicotinic receptors and their ligands: from proteomic studies to crystal structures****Цетлин В.И.**

Институт биоорганической химии им.
академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН,
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая 16/10
Тел.: +7(495) 335-57-33; факс: +7(495) 335-57-33; e-mail: vits@mx.ibch.ru

Белковые α -нейротоксины из ядов змей (α -бунгаротоксин, α -кобротоксин и другие) 4 десятилетия назад позволили получить в индивидуальном виде никотиновый ацетилхолиновый рецептор (НАХР) из ската *Torpedo*, а в прошлом десятилетии – ацетилхолин-связывающий белок (АХБ) из улитки *L.stagnalis*, структурную модель лиганд-связывающих доменов всех типов (мышечных и нейрональных) НАХР. α -Конотоксины (пептидные нейротоксины из моллюсков *Conus*) также являются антагонистами НАХР, прекрасно различающимися отдельные подтипы. Нами проводятся протеомные исследования змеиных ядов для получения новых пептидов и белков, а также компьютерное моделирование токсин-рецепторных комплексов и конструирование/синтез новых пептидов, что расширяет набор инструментов исследования НАХР и других родственных рецепторов. В сотрудничестве с голландскими исследователями впервые была установлена кристаллическая структура комплекса α -конотоксина с АХБ [1]. Анализ в рамках этой структуры фотоидуцированных шивок [Bra12]- α -конотоксина G1 с НАХР *Torpedo* привел к выводу о возможности двух ориентаций лиганда в связывающем центре рецептора [2], что затем было подтверждено в совместной работе рентгеноструктурным анализом комплексов АХБ с d-тубокурарином и стрихнином [3]. В яде кобры нами недавно обнаружен минорный компонент – димерный α -кобротоксин, в котором две молекулы α -кобротоксина соединены двумя межмолекулярными S-S-связями. α -Кобратоксин блокирует мышечные и $\alpha 7$ нейрональный НАХР, а у димера добавилась способность ингибировать $\alpha 3\beta 2$ НАХР; рентгеноструктурный анализ выявил необычный тип структуры и позволил установить положение межмолекулярных дисульфидов [4]. Предполагалось, что трехпетельную укладку, свойственную α -кобротоксину и другим токсинам змей, имеет и эндогенный белок *Lynx1*, особенностью которого является наличие GPI –якоря, с помощью которого он прикреплен к мембране вблизи НАХР и модулирует их функцию. Однако в индивидуальном виде *Lynx1* не был получен. В нашем институте в *E.coli* осуществлена экспрессия *Lynx1*, лишённого GPI-якоря (водорастворимый домен, *ws-lynx1*), установлена его ЯМР –структура и методами радиолигандного анализа и электрофизиологии впервые получена информация о механизме действия: взаимодействие с классическим участком связывания агонистов и конкурентных агонистов на НАХР *Torpedo*, но вне его на нейрональных НАХР [5].

1. Celie P.H., Kasheverov I.E. и др. / Nat. Struct. Mol. Biol., 2005. T.12. C. 582-588.
2. Kasheverov I., Chiara D. и др. / FEBS J., 2006. T. 273. C. 1373-1388.
3. Brams M., Pandya A, Kuzmin D. и др. / PLoS Biol., 2011 Mar; 9(3):e1001034.
4. Osipov A.V, Rucktooa P. и др. / J. Bio. Chem., 2012.T.287. C.6725-6734.
5. Lyukmanova E.N., Shenkarev Z. O. и др./J. Biol. Chem., 2011. T. 286. C.10618-10627.

ПРОНИЦАЕМОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕВЫХ БАРЬЕРОВ ДЛЯ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ

Permeability of biological tissue barrier for the gold nanoparticles

Цыганова Н.А.¹, Савенкова М.В.¹, Терентюк Г.С.^{1,2}

¹ – ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», 432000, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, д. 42;

² – ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского», Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 410012, Саратов, ГСП, ул. Большая Казачья, 112.
Тел.: (8422) 32-73-22; e-mail: bio@ulsu.ru

Целью исследования явилось изучение проницаемости трансдермального и плацентарного барьеров *in vivo* для золотых наночастиц разного размера. Материалом исследования послужили беременные самки белых крыс, которым в хвостовую вену на II стадии становления гемохориальной плаценты вводили 1,5 мл суспензии ЗНЧ диаметрами 5 и 30 нм в концентрации 50 мкг/л двукратно через сутки. Интактной группе животных вводили физиологический раствор по аналогичной схеме. Для изучения проницаемости эпидермиса для ЗНЧ на эпилированную кожу спины белых крыс местно наносили гель, содержащий наноболочки (диаметр 160 нм). Для усиления степени проникновения золотых наночастиц в кожу были использованы частичная лазерная абляция и ультразвуковое воздействие (ультрафонофорез). В качестве контроля была взята интактная кожа с нанесенной гелевой основой без наночастиц. Для визуализации зон накопления ЗНЧ в тканевых структурах органов проводили гистохимическое окрашивание срезов азотнокислым серебром, а также применяли оптическую конгерентную томографию (ОКТ). ЗНЧ преимущественно накапливаются в клетках ретикуло-эндотелиальной системы – ЗНЧ диаметрами 5, 30 нм с помощью гистохимической методики визуализируются в дендритных и интерстициальных макрофагах селезенки, звездчатых макрофагах печени. Транспорт агрегатов ЗНЧ в клетки РЭС, которые характеризуются выраженными макрофагальными свойствами, осуществляется за счет неспецифического фагоцитоза. Гемато-плацентарный барьер оказывается проницаемым для ЗНЧ диаметром 5 и 30 нм – золото с помощью гистохимической методики выявляется в печени и селезенке плодов после введении раствора ЗНЧ. Преимущественное значение при проникновении ЗНЧ через цитоструктуры гематоплацентарного барьера имеют клатрин- и кавеолин-зависимые разновидности эндоцитоза. В эксперименте *in vivo* исследована доставка золотых наноболочек в слои кожи крыс. По данным ОКТ и гистохимического анализа простое нанесение геля с наночастицами неэффективно для доставки наноболочек в кожу за счет пассивной диффузии. Показано, что лазерная абляция кожи перед нанесением геля и последующая обработка участков с гелем ультразвуком позволяет преодолеть роговой слой и доставить золотые наноболочки в дерму и гиподерму.

**ВЗАМОДЕЙСТВИЕ МАЛЫХ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА С БЕЛКОМ-МИШЕНЬЮ
В УСЛОВИЯХ КРАУДИНГА****Interaction of small heat shock proteins with protein-target under crowding
conditions**

***Чеботарева Н.А.¹, Роман С.Г.¹, Еронина Т.Б.¹, Макеева В.Ф.¹, Клейменов С.Ю.¹,
Муранов К.О.², Полянский Н.Б.², Гусев Н.Б.³, Курганов Б.И.¹***

1 – Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН; 119071, Москва, Ленинский пр. 33;

2 – Институт биохимической физики им. Н.М. Емануэля РАН,
119334, Москва, ул. Косыгина 4;

3 – Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,
119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

Тел.: +7(495) 952 2547; Факс: +7(495) 954 2732; e-mail: chebotareva@inbi.ras.ru

Главной функцией малых белков теплового шока (sHsp), одного из классов молекулярных шаперонов, является предотвращение необратимой агрегации белков. В основе шаперонной активности sHsp лежит их взаимодействие с развернутыми формами белков-субстратов, образующихся в условиях стресса. Ожидается, что в клетке краудинг усиливает белок-белковые взаимодействия, в том числе и агрегацию белков. Влияние краудинга на шаперонную активность α -кристаллина, представителя семейства sHsp, изучено на тест-системе, основанной на агрегации УФ-облученной мышечной гликогенфосфорилазы b (Phb). Эта тест-система позволяет исследовать влияние разных агентов непосредственно на стадию агрегации белка. Методом динамического лазерного светорассеяния (ДЛС) на примере предложенной тест-системы экспериментально продемонстрировано стимулирующее действие краудинга на стадии агрегации белков. При изучении агрегации УФ-облученной Phb при 37°C в присутствии краудинг-агентов (ПЭГ 20000, Фикол 70000 и триметиламин-N-оксид) методом ДЛС показано уменьшение антиагрегационной активности α -кристаллина в условиях краудинга. Методом скоростной седиментации показано образование комплексов при 30 и 37°C между диссоциированными формами sHsp и белковым субстратом. На основании данных аналитического ультрацентрифугирования, гель-фильтрации (SEC) и электрофореза в ПААГ предложена схема взаимодействия УФ-облученной Phb и α -кристаллина. Предполагается, что образуются комплексы двух типов между шапероном и белком-субстратом: 1) комплексы, образованные диссоциированными формами sHsp и денатурированным белком, которые относительно устойчивы в условиях краудинга; 2) высокомолекулярные комплексы между α -кристаллином и денатурированной Phb. Комплексы второго типа характеризуются более низкой скоростью агрегации по сравнению с УФ-облученной Phb, однако, краудинг стимулирует агрегацию этих комплексов, что приводит к уменьшению шаперонной активности α -кристаллина.

Методами скоростной седиментации и ДЛС изучено взаимодействие нативной киназы фосфорилазы (PhK) и sHsps (Hsp27 дикого типа и его 3D мутанта) в условиях краудинга при 20°C. Краудинг стимулирует образование крупных ассоциатов как PhK, так и Hsp27. Однако взаимодействие Hsp27 and PhK в условиях краудинга приводит к диссоциации больших гомо-олигомеров каждого из белков и образованию комплексов Hsp27-PhK относительно небольшого размера.

Работа поддержана грантами РФФИ (11-04-01271-а, 11-04-00932-а) и Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

МЕХАНИЗМЫ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ**Mechanisms of redox regulation of cellular processes****Черенкевич С.Н., Мартинович Г.Г.**

Белорусский государственный университет, 220030, Минск, пр. Независимости, 4,
Республика Беларусь
Тел.: +375-17-209-54-40; факс: +375-17-209-54-45; e-mail: Cherenkevich@bsu.by

В рамках современных представлений редокс-регуляция клеточных процессов рассматривается как один из фундаментальных механизмов регуляции функциональной активности клеток [1]. Показано, что эффект действия активных форм кислорода (АФК) в живых системах зависит от типа и концентрации присутствующих в среде антиоксидантов. АФК и антиоксиданты следует рассматривать как группу функционально зависимых соединений, для описания которых предлагается использовать термин «редокс-активные молекулы» [2]. Однако механизмы регуляторного действия редокс-активных молекул до сих пор не установлены, так как объяснение механизмов действия этих соединений в рамках представлений о природе биохимической специфичности лиганда сталкивается с большими трудностями.

В представленной работе внутриклеточные белковые нанопереключатели рассматриваются в качестве сенсоров интегральных изменений редокс-состояния клетки, для количественного описания которых использованы теоретически введенные нами и экспериментально обоснованные физико-химические параметры – эффективный редокс-потенциал (Еэфф) и редокс-буферная емкость (r). Показано, что новые параметры могут быть применены не только для описания редокс-процессов, но и для характеристики функционального состояния клеток и тканей в целом. С использованием разработанных нами методов измерения Еэфф и r показано, что величины указанных параметров существенно различаются в клетках в норме и при патологиях.

Вследствие различий в величинах параметров редокс-состояния в определенных типах клеток редокс-активные молекулы могут активировать разные типы белков. Таким образом, набор молекул, определяющих внутриклеточное редокс-состояние, можно рассматривать как своего рода преобразователь («трансдюсер»), регулирующий передачу сигналов на внутриклеточные эффекторы. Сенсорные системы внутри клеток чувствительны к изменениям параметров внутриклеточного редокс-состояния и с помощью белков-посредников формируют функциональный клеточный ответ. Окислители и восстановители следует рассматривать как новый тип вторичных мессенджеров (редокс-мессенджеры) – мессенджеров, переносящих электроны. В рамках развиваемых нами представлений заключено, что функционирование редокс-мессенджерных систем представляет собой новый способ трансдукции, записи и считывания информации в клетках.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке БРФФИ (грант №Б11-027).

1. Janssen-Heininger Y.M. et al. / Free Rad. Biol. Med., 2008. V. 45. P. 1-17.

2. Мартинович Г.Г., Черенкевич С.Н. и др. / Биофизика. 2011. Т. 56, С. 465-474.

**ПОДГОТОВКА СПЕЦИАЛИСТОВ БИОФИЗИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ В БЕЛОРУССКОМ
ГОСУДАРСТВЕННОМ УНИВЕРСИТЕТЕ****Biophysics specialist training in Belarusian State University**

**Черенкевич С.Н., Булай П.М., Герасимова Л.К., Коваленко Е.И., Крот В.И.,
Кулагова Т.А., Мартинович Г.Г., Хмельницкий А.И., Волоотовский И.Д.**

Белорусский государственный университет,
220030, Минск, пр. Независимости, 4, Республика Беларусь
Тел. +375-17-209-54-40; факс: +375-17-209-54-45; e-mail: Cherenkevich@bsu.by

В настоящее время подготовка специалистов-биофизиков в Беларуси осуществляется только на кафедре биофизики физического факультета БГУ. На протяжении десятилетия создана необходимая инфраструктура технологии биофизического образования, обеспечивающая высокий уровень подготовки выпускаемых специалистов, позволяющий им успешно заниматься научно-исследовательской работой, обучаться в магистратуре и аспирантуре, как в нашей республике, так и в других странах.

Подготовка специалистов биофизического профиля основывается на фундаментальной физико-математической базе. Все лекционные математические и физические курсы сопровождаются практическими занятиями. Важнейшим элементом подготовки специалистов является выполнение лабораторных физических практикумов. Серьезное внимание уделяется изучению основ программирования и математического моделирования.

В рамках специализированной подготовки по биофизике студенты изучают специальные курсы по физике растворов, биохимии, молекулярной биофизике, биофизике клетки и сложных систем, физике мембранных систем, радиационной биофизике и фотобиологии, биоэнергетике и метаболизму, физико-химическим методам исследования биосистем, спектроскопии сложных молекул, нанобиотехнологии, клеточной информатике, геномной инженерии, биопреобразователям и бионаноматериалам, компьютерному эксперименту в биофизике, протеомике, физике человека, фотобиоинженерии и др. Проводятся специальные семинары и выполняются лабораторные практикумы: «Физико-химические методы в биофизике», «Электронно-колебательная спектроскопия и люминесценция сложных органических молекул», «Спектрально-физические методы исследования биообъектов», «Современные экспериментальные методы в биофизике», «Дозиметрия, радиометрия и действие ионизирующей радиации на биологические объекты».

Выполнение курсовых, дипломных работ и прохождение производственной практики осуществляется в рамках научных направлений кафедры биофизики и лабораторий научно-исследовательских институтов НАН РБ (физики, биофизики и клеточной инженерии, биоорганической химии, экспериментальной ботаники, физико-органической химии и др.).

ДОМЕННАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА HSM3 ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE****Saccharomyces cerevisiae* Hsm3 protein domain structure**

**Черненко А.Ю., Фёдоров Д.В., Ковальцова С.В., Фёдорова И.В., Евстюхина Т.А.,
Грачёва Л.М., Пешехонов В.Т., Королёв В.Г.**

Национальный Исследовательский Центр «Курчатовский Институт», Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Петербургский Институт Ядерной Физики им. Б.П. Константинова», 188300, Ленинградская область, г.Гатчина, Орлова роща.
тел.: +7-(813)-713-17-11, факс: +7-(813)-713-23-03, e-mail: an-cher@mail.ru

Мутанты *hsm3* (от англ. high spontaneous mutagenesis) были выделены по признаку повышения частоты спонтанных мутаций устойчивости к канаванину. Нами показано, что ген HSM3 принимает участие в контроле адаптивного мутагенеза и участвует в пути пострепликативной и гомологичной рекомбинационной репарации, где вносит вклад в стабилизацию основных репарационных интермедиатов – D-петель – фиксируя их совместно с белками Mph1 и Shu1 [1, 2, 3]. Также показано, что белок Hsm3 взаимодействует с субъединицами протеасомного комплекса (Rpt1, Rpt3-Rpt5) [4] и белками ядерного гистон-ацетилтрансферазного комплекса HAT-B/Nub4 (Hat1, Hat2 и Hif1), ацетилирующего ядерные гистоны H3 и H4.

Анализ различных мутантных аллелей гена HSM3 (*hsm3-1* – делеция 7 нуклеотидов на С-конце; *hsm3::URA* – частичное разрушение гена вставкой плазмиды pFL34 / отсутствие 56 аминокислот на С-конце; *hsm3Δ* – полное удаление рамки гена вставкой кананициновой кассеты; *hsm3Δ*[HSM3] – вставка плазмидной копии гена под индуцибельным галактозным промотором для сверхэкспрессии белка) позволил выявить, что мутации в С-концевом домене оказывают влияние только на мутагенез, причем как спонтанный, так и УФ-индуцированный [1, 2, 3]. При этом не наблюдалось изменения *t05*-фенотипа, что говорит об отсутствии влияния на сборку протеасомного комплекса. Анализ N-конца Hsm3p показал 80% гомологию с N-концевым доменом белка Msh6, что предполагает участие белка Hsm3 в системе мисматч-репарации [1].

Чиповым методом было показано соосаждение белка Hsm3p с белками, входящими в ядерный гистон-ацетилтрансферазный комплекс HAT-B/Nub4. Установлено, что в стрессовых условиях (при обработке штаммов гидроксимочесвиной (ГМ) и/или с последующим облучением УФ) мутанты *hsm3Δ* и *hat1Δ* ведут себя одинаково, оказывая влияние на работу рибонуклеотидредуктазы (RNR), контролирующей пул дезоксирибонуклеотидов, необходимых для эффективного прохождения процесса репарации: Hsm3p способен частично компенсировать потерю Hat1p за счет своей многофункциональности (мультидоменной структуры) при нахождении клетки в стрессовых условиях (ГМ+УФ), направляя ее по пути мутагенеза.

Работа поддержана грантами РФФИ: 10-03-01203-а, 12-04-01467-а.

1. А.Ю. Черненко, С.В. Иванова и др. Генетика, 2010, том 46, №6, с.742-749.
2. А.Ю. Черненко, Л.М. Грачёва и др. Генетика, 2012, том 48, №2, с.160-167.
3. А.Ю. Черненко, Д.В. Фёдоров и др. Генетика, 2012, том 48, №3, с. 333-339.
4. K.Takaji et.al., JBC, 2012, Press, on-line.

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ В -ЭНДОРФИНА У РАННИХ ЭМБРИОНОВ МЫШИ *IN VITRO***Intracellular signaling of β -endorphin on early mouse embryos *in vitro*****Чернов А.С.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,

142290, Пушкино, ул. Институтская, 3

Тел.: +7(4967)73-94-91; факс: +7(4967) 33-05-53; e-mail: c.h.e.r.n.o.v@rambler.ru

β -Эндорфин – опиоидный нейропептид, регулирует основные функции организма, активно участвуя во взаимосвязи нервной, иммунной и эндокринной систем. Ван Ден Бергом и соавт. было установлено, что молекула β -эндорфина содержит два различных участка связывания: один из которых отвечает за взаимодействие с опиоидными, а другой с неопиоидными (не чувствительными к блоктору опиоидных рецепторов налоксоном) рецепторами. В настоящее время неопиоидные рецепторы β -эндорфина остаются малоизученными и данные о них разрозненны. Ранее нами было показано, что гормон не оказывал влияния на развитие 2-клеточных эмбрионов, но увеличивал жизнеспособность 4- и 8-клеточных эмбрионов мыши *in vitro*. В присутствии β -эндорфина (0,1 мкМ) увеличивалось количество сформировавшихся бластоцист и уменьшалось количество аномально развитых. С помощью флуоресцентной микроскопии было показано, что добавление β -эндорфина приводило к выходу Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Однако механизм этого воздействия до настоящего времени установлен не был. В связи с выше сказанным, целью данной работы было изучить возможные механизмы передачи внутриклеточного сигнала β -эндорфином у ранних эмбрионов мыши *in vitro*. Используя налоксон (1 мкМ), нами было установлено, что стимулирующее действие гормона на развитие ранних эмбрионов осуществляется через неопиоидные рецепторы β -эндорфина. Для определения возможного пути передачи внутриклеточного сигнала β -эндорфином у ранних эмбрионов, нами было исследовано его влияние на изменение уровня внутриклеточного Ca^{2+} , с использованием флуоресцентного зонда (Fluo-3 AM). Также было проведено исследование с применением специфических блокаторов активности фосфолипазы C и аденилатциклазы для выявления их роли в процессе передачи сигнала гормоном. Было показано, что β -эндорфин инициирует медленный (35-40 мин) выход ионов Ca^{2+} в цитоплазму из внутриклеточных депо у 4- и 8-клеточных эмбрионов мыши. В то время как у 2-клеточных гормон приводил к быстрому (в течение 2 мин) высвобождению Ca^{2+} , однако при совместном добавлении β -эндорфин и налоксона наблюдали только медленный выход Ca^{2+} . С помощью блокатора активности фосфолипазы C и аденилатциклазы было установлено, что на 2-клеточные эмбрионы мыши β -эндорфин воздействует как через опиоидные, так и неопиоидные рецепторы. В то время как на 4- и 8-клеточные эмбрионы воздействие осуществляется только через неопиоидные рецепторы, причем в передаче сигнала участвует аденилатциклазная сигнальная система. Таким образом, нами было установлено, что на 2-клеточных эмбрионах мыши локализируются два типа рецепторов β -эндорфина: опиоидные и неопиоидные; на 4- и 8-клеточных – только неопиоидные рецепторы гормона. Действие нейропептида через опиоидные рецепторы на 2-клеточные эмбрионы осуществляется по инозитолфосфатному пути, через неопиоидные рецепторы – с участием аденилатциклазной системы. В обоих случаях происходит изменение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . Кроме того, на 2-клеточных эмбрионах обнаружено взаимодействие этих рецепторов на уровне системы передачи сигнала, так называемое «crosstalk» взаимодействие.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МЕМБРАНЫ ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ В ОСЕННИЙ И ЗИМНИЙ ПЕРИОДЫ**Structural and functional features of nuclear erythrocytes membrane in autumn and winter****Чернявских С.Д., Недопёкина С.В., Нгуен Тхи Тьук, То Тхи Бик Тхуи**

Белгородский государственный НИУ «БелГУ», 308015, Белгородская область, г. Белгород, ул. Победы, д. 85

Тел.: +79038865148, e-mail: Chernyavskikh@bsu.edu.ru

В опытах *in vitro* в осенний и зимний периоды изучали структурно-функциональные особенности мембраны ядерных эритроцитов у представителей надкласса Рыбы и классов Земноводные и Птицы. В работе использовали периферическую кровь, взятую у наркотизированных эфиром сазана (*Syrprinus carpio*) (30 особей), лягушки озёрной (*Rana ridibunda*) (30 особей) и курицы домашней (*Gallus domesticus*) (11 особей). У Рыбы кровь брали из хвостовой вены, у Земноводных – из сердца, у Птицы – путем венепункции. В качестве антикоагулянта использовали гепарин в количестве 10 ед./мл. Кровь центрифугировали 4 мин при 400 g, отбирали суспензию эритроцитов. Изучали относительную микровязкость мембраны эритроцитов в зонах белок-липидных контактов и липидном бислое, а также полярность липидного бислоя и зон белок-липидных контактов методом латеральной диффузии гидрофобного зонда пирена [1]. Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$). В результате проведенных исследований установлено, что у сазана в зимний период текучесть липидного бислоя мембраны эритроцитов F α /F m (334), а также значения параметров F372/F393(334) и F372/F393(286), характеризующих полярность липидного слоя и зоны аннулярных липидов, практически не изменились по сравнению с осенним периодом. Текучесть зон белок-липидных контактов F α /F m (286) оказалась выше на 43% зимой по сравнению с осенью.

У лягушки в зимний период повысились показатели текучести липидного бислоя мембраны эритроцитов F α /F m (334) и зон белок-липидных контактов F α /F m (286) на 52 и 20%, значения параметров F372/F393(334) и F372/F393(286) на 36 и 6% по сравнению с осенним сезоном. Это свидетельствует об уменьшении полярности липидного слоя и зон белок-липидных контактов эритроцитарной мембраны амфибий зимой. У курицы показатели F α /F m (334) и F α /F m (286) в зимний период были ниже по сравнению с осенним периодом на 16 и 20% соответственно. Значения параметров F372/F393(334) и F372/F393(286) зимой также уменьшились по сравнению с осенью, что свидетельствует об увеличении полярности липидного бислоя и зон белок-липидных контактов мембран эритроцитов курицы в зимний сезон.

Таким образом, в зимний период по сравнению с осенним у рыбы и лягушки наблюдается снижение микровязкости, а также полярности зон белок-липидных контактов и липидного бислоя, у курицы – повышение. Известно, что текучесть липидного бислоя у холоднокровных животных, в отличие от теплокровных, имеет принципиальное значение [2]. Полученные изменения динамических свойств мембраны косвенно свидетельствуют о более высокой реактивности красных клеток крови пойкилотермных, по сравнению с гомойотермными, в зимний период.

1. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М., Наука, 1980. – 320 с.

2. Камкин А.Г., Сиселева И.С. Физиология и молекулярная биология мембран клеток. М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 592 с.

**СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СУПЕРКОМПАКТНОГО ХРОМАТИНА СПЕРМИЕВ:
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНК С ЛИНКЕРНЫМИ ГИСТОНАМИ****Structural properties of sperm super condensed chromatin: interaction of DNA with
linker histones****Чихиржина Е.В.¹, Костылева Е.И.¹, Старкова Т.Ю.^{1,2}, Поляничко А.М.^{1,2}**

¹Институт цитологии Российской академии наук,
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр. 4,
Тел.: +7(812)2973740.; факс: +7(812)2970341; e-mail: chikhir@gmail.com; ²Физический
факультет Санкт-Петербургского государственного университета,
198504, Санкт-Петербург, ул. Ульяновская, д. 1,
Тел.: +7(812)4284410; факс: +7(812)4287240; e-mail: a.polyanichko@pobox.spbu.ru

Сперматогенез сопровождается различными физическими и биохимическими изменениями в ядре. Прежде всего, происходит изменение белкового окружения ДНК. В частности гистоны H1 замещаются на спермий-специфические варианты. Спермий-специфические белки характеризуются более длинной полипептидной цепью и увеличенным содержанием аргинина в сравнении с соматическим гистонем. Эти особенности влияют на взаимодействие гистона с ДНК, а, следовательно, и на степень ее компактизации. В работе методами УФ спектроскопии, кругового дихроизма (КД) и температурного плавления были исследованы структурные характеристики комплексов ДНК с гистонами H1, выделенными из спермиев морских беспозвоночных: морского ежа, морской звезды и двусторчатого моллюска. Сравнение спектров комплексов ДНК с гистонами H1 спермиев животных, относящихся к разным филогенетическим группам, показало, что H1 спермиев моллюска компактизует ДНК в той же степени как соматический гистон. Ранее нами было показано, что С-концевые участки этого гистона имеют более выраженную левоспиральную конформацию по сравнению с H1 спермиев морской звезды и морского ежа. Обнаруженные нами дополнительные а-спиральные участки в С-концевом фрагменте H1 спермиев иглокожих облегчают белок-белковые взаимодействия и стимулируют кооперативное взаимодействие гистона с ДНК. Получены термодинамические характеристики ДНК при взаимодействии с H1. Установлено, что в большей степени стабилизирует ДНК гистон H1 спермиев моллюска, а в меньшей – соматический белок. Мы полагаем, что устойчивая левоспиральная конформация этого белка приводит к более компактному его расположению вокруг участка связывания с ДНК, формируя более стабильные структуры, чем остальные гистоны. Гистоны H1 спермиев иглокожих занимает промежуточное положение как по температуре плавления, так и по соотношению свободных и связанных с белком участков ДНК. Мы предполагаем, что нет единого механизма образования суперкомпактного хроматина спермиев, а сам механизм компактизации ДНК в ядре зависит в первую очередь от особенностей структурной организации белков.

Работа проводилась при финансовой поддержке РФФИ (10-04-00092, 12-08-01134), Администрации Санкт-Петербурга, ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЯДЕРНЫХ БЕЛКОВ СИРТУИНОВ 2 И 6 В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА
ПРИ НОРМАЛЬНОМ И УСКОРЕННОМ СТАРЕНИИ**

**Study of Nuclear Proteins Sirtuin 2 and 6 of Human Fibroblasts
in Normal and Accelerated Ageing**

Чихиржин О.В., Плескач Н.М., Спивак И.М., Михельсон В.М.

Институт цитологии Российской академии наук,
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр. 4
Тел.: +7(812) 2971213; факс: +7(812)2970341; e-mail: chikhirzhinkjz@gmail.com

Одним из путей изучения механизмов старения человека является исследование клеток больных прогериями. Фенотипически больные прогериями, или синдромами ускоренного старения, проявляют в качестве симптомов явные признаки одряхления тканей и клеток уже в молодом возрасте. В большинстве случаев прогерии начинают развиваться с самого рождения. Несмотря на то, что впервые эти болезни стали изучаться еще в XIX веке, до сих пор нет четкого представления о молекулярных основах и процессах при таких редких и серьезных заболеваниях. На генетическом уровне к настоящему моменту уже считается доказанным участие белковых продуктов генов, мутированных при прогериях, в естественных механизмах одряхления. Но несмотря на то, что эти молекулы охарактеризованы и выявлены их партнеры, на уровне эпигенетической регуляции все же остаются вопросы.

Сиртуины относятся к группе гистоновых деацетилаз III класса. Известно, что молекулы сиртуинов меняют характер экспрессии и функциональное состояние с увеличением возраста клетки. В этой связи особенно важными являются ядерный Sirt6p и цитоплазматический Sirt2p, в том числе их поведение в клетках молодых и пожилых доноров. Показано их косвенное или же иногда прямое участие в процессах жизнедеятельности клетки в возрастной динамике. Целью настоящей работы являлось определить возрастную динамику содержания некоторых сиртуинов в фибробластах кожи человека при нормальном и ускоренном старении. С помощью метода электрофоретического разделения тотального клеточного белка с последующим твердофазным иммуноферментным анализом и метода иммунофлуоресцентной окраски фиксированных клеток было показано увеличение содержания белка NP1p в клетках больных атаксией-телеангиэктазией (синдромом Луи-Бар, сопровождаемым видимыми признаками преждевременного старения) по сравнению с клетками здоровых доноров приблизительно в 2 раза. Также показано отсутствие ядерного Sirt6p в фибробластах кожи больных синдромом Луи-Бар. Содержание Sirt2p в цитоплазме у больных увеличено, причем в разной степени при разных формах заболеваний.

МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕТОДОМ МОНТЕ-КАРЛО СМЕСЕЙ ЖЕСТКИХ БИОПОЛИМЕРОВ И ИЗОТРОПНЫХ МОЛЕКУЛ НА ПЛОСКОЙ ПОВЕРХНОСТИ**Monte-Carlo simulation of mixtures of rigid biopolymers and isotropic molecules on flat surface****Шадрин И.Ф.¹, Неелов И.М.²**1 – Орловский государственный технический университет,
302020, Орел, Наугорское шоссе, 292 – Институт высокомолекулярных соединений РАН,
199004, Санкт-Петербург, Большой пр. 31

Тел.: +7(812)328-56-01; факс: +7(812)328-68-69; e-mail: i.neelov@mail.ru

Моделирование трехмерных систем, состоящих из твердых анизотропных частиц или жесткоцепных полимеров и их бинарных смесей с изотропными сферическими частицами было осуществлено во многих работах, в течение последних 15-20 лет. В то же время для двумерных систем, состоящих из анизотропных частиц имеются результаты математического моделирования только для однокомпонентных систем. В частности, методом Монте-Карло (МК) было проведено моделирование различных моделей таких частиц (иглы, жесткие эллипсы и диско-прямоугольники (2d аналоги сфероцилиндров)). Результаты этого моделирования подтверждает теоретические предсказания об отсутствии дальнего ориентационного порядка в двумерных системах, но в то же время демонстрируют наличие алгебраически убывающего квази-дальнего порядка [1]. Мы провели МС моделирования бинарных смесей жестких анизотропных и изотропных частиц на плоской поверхности при различных плотностях и относительных концентрациях. В качестве модели жестких анизотропных частиц мы использовали жесткие дископрямоугольники с различным аксиальным соотношением. Диаметры отдельных изотропных частиц (дисков), диаметры концевых дисков и ширина прямоугольников в анизотропных дископрямоугольниках были во всех случаях одинаковы, а аксиальное отношение дископрямоугольников менялось за счет длины входящих в их состав прямоугольников. В настоящей работе мы сосредоточили свое внимание на применении формализма двумерных (вдоль и поперек направления длинной оси анизотропной частицы) ориентационных и трансляционных корреляционных функций для изучения локального порядка в таких смесях. Мы показали, что увеличение концентрации дископрямоугольников при достаточной суммарной плотности смеси приводит к увеличению как величины локальной ориентационной и трансляционной упорядоченности, так и увеличению соответствующих длин корреляции. Применение двумерных корреляционных функций позволяют более наглядно продемонстрировать наличие пространственной анизотропии корреляций обоих типов в изученных системах.

Работа выполнена при поддержке РФФИ 10-04-01156-а и ОХМНЗ РАН.

1. S. Varga et al, J.Chem.Phys., 131, 184901, 2009.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ АМИЛОИДОПОДОБНЫХ ФИБРИЛЛ

Molecular modeling of amyloid-like fibrils

Шайтан А.К., Халатур П.Г., Хохлов А.Р.

МГУ имени М.В. Ломоносова
alex@molsim.org

Изучение структуры и морфологии амилоидных и амилоидоподобных фибрилл имеет важное значение для решения задач в области медицины, био- и нанотехнологии. Установление структуры и свойств амилоидоподобных фибрилл исключительно экспериментальными методами является затруднительным. Настоящий доклад посвящен изложению комбинированного теоретико-экспериментального подхода к изучению структуры, морфологии и свойств амилоидоподобных фибрилл. Обсуждается применение подхода к конкретным задачам в области биотехнологии и нанотехнологии [1-3].

[1] A. K. Shaytan, E.-K. Schillinger, E. Mena-Osteritz, S. Schmid, P. G. Khalatur, P. Bäuerle, A. R. Khokhlov. Self-organizing bioinspired oligothiophene-oligopeptide hybrids. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2011, 2, pp 525–544, DOI: 10.3762/bjnano.2.57

[2] Alexey K. Shaytan, Eva-Kathrin Schillinger, Pavel G. Khalatur, Elena Mena-Osteritz, Jens Hentschel, Hans G. Börner, Peter Bauerle, and Alexei R. Khokhlov, Self-Assembling Nanofibers from Thiophene–Peptide Diblock Oligomers: A Combined Experimental and Computer Simulations Study // *ACSNano*, 2011, 5(9), pp 6894–6909 DOI: 10.1021/nn2011943

[3] Shaytan A. K., Khokhlov A. R., Khalatur P. G. Large-scale atomistic simulation of a nanosized fibril formed by thiophene-peptide “molecular chimeras” // *Soft Matter*, 2010, 6, pp 1453—1461, DOI: 10.1039/b918562c

**АГЕГАЦИОННАЯ И СЛИВАЮЩАЯ СПОСОБНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ КАК
МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СТАБИЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ИХ МЕМБРАН****Aggregation and fusion ability of erythrocytes as methods for assessing of
membrane stability****Шереметьев Ю.А., Поповичева А.Н., Левин Г.Я.**

ФГБУ Нижегородский научно-исследовательский институт
травматологии и ортопедии «Минздравсоцразвития», 603155, Нижний Новгород,
Верхневолжская наб. 18/1

Тел.: +8 (831)436-21-80; Факс: +8(831)432-21-58; e-mail: ya.sher@rambler.ru

Разработаны новые методы оценки стабильного состояния мембран эритроцитов. В основе этих методов положены новые подходы. Первый метод основан на регистрации агрегационной способности эритроцитов на лазерном агрегометре. Агрегация индуцировалась ионами лантана при конечных концентрациях равных 20, 40, 80, 160 и 320 мкМ. Изучена агрегационная способность эритроцитов, истощенных по АТФ, хранящихся при 40 °С и комнатной температуре в течение 24 ч. Агрегация нормальных эритроцитов на лазерном агрегометре регистрируется, начиная с концентрации лантана, равной 80 мкМ. Показаны различия в агрегационной способности нормальных эритроцитов и эритроцитов, хранящихся в течение 24 ч при комнатной температуре и истощенных по АТФ. Измененные эритроциты начинают агрегировать при низкой концентрации лантана, равной 20 мкМ. При 40-160 мкМ лантана происходит статистически значимое увеличение агрегационной способности измененных эритроцитов. Второй метод основан на изучении сливающей способности эритроцитов. Чем меньше стабильность мембран эритроцитов тем выше индекс слияния эритроцитов, индуцированного лантаном. Сливающую способность изучали при конечных концентрациях лантана, равных 12,5, 25, 50, 100 и 200 мкМ. Агрегаты эритроцитов инкубировали при 37 °С в течение 60 мин. Слияние эритроцитов оценивали с помощью светового микроскопа. Выяснено, что измененные эритроциты имеют более высокий индекс слияния чем нормальные клетки. Предлагается использовать разработанные методы для оценки стабильного состояния мембран эритроцитов в эксперименте и клинической практике.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ La^{3+} И Gd^{3+} ДЛЯ ОЦЕНКИ АПОПТОЗА ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Application of La^{3+} and Gd^{3+} for assessing of human erythrocyte apoptosis

Шереметьев Ю.А., Поповичева А.Н., Рогозин М.М., Левин Г.Я.

ФГБУ Нижегородский научно-исследовательский институт
травматологии и ортопедии «Минздравсоцразвития»,
603155, Нижний Новгород, Верхневолжская наб. 18/1
Тел.: +8 (831)436-21-80; Факс: +8(831)432-21-58; e-mail: ya.sher@rambler.ru

Одним из ранних признаков апоптоза эритроцитов является экспонирование на поверхности мембран отрицательно заряженного фосфолипида – фосфатидилсерина, который, как известно, может регулировать поверхностный заряд и локализацию белков мембраны. Поздним признаком апоптоза эритроцитов является образование микровезикул, несущих на своей поверхности большое количество фосфатидилсерина. Известно, что лантаниды (La^{3+} и Gd^{3+}) обладают чрезвычайно высоким сродством к фосфатидилсерину. В настоящей работе нами предложены новые методы оценки апоптоза эритроцитов. Принцип методов основан на избирательном взаимодействии лантанидов с отрицательно заряженным фосфатидилсерином. Первый метод – оценка присутствия фосфатидилсерина на поверхности апоптотных эритроцитов. Апоптотные эритроциты получали после инкубации суспензии эритроцитов при 37 °С с цинком и сахарозой в течение 24 ч. После этого эритроциты фиксировали глутаровым альдегидом. Фиксация эритроцитов глутаровым альдегидом необходима для того, чтобы лантаниды взаимодействовали только с внешней поверхностью эритроцитов. Фиксированные нормальные и апоптотные эритроциты помещали на предметное стекло, обработанное лантаном или гадолинием, перемешивали, и с помощью световой микроскопии наблюдали за процессом агрегации эритроцитов. Показано, что La^{3+} и Gd^{3+} индуцируют агрегацию апоптотных эритроцитов. Нормальные эритроциты не агрегировали. Второй метод оценки апоптоза – выделение из инкубационной среды микровезикул с помощью лантанидов. Добавление лантанидов в инкубационную среду, свободную от апоптотных эритроцитов, приводит к агрегации микровезикул и последующему выпадению их в осадок. Количественную оценку микровезикул проводили путем определения концентрации общего белка в осадке.

О МЕХАНИЗМЕ АГРЕГАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ**On the mechanism of red blood cell aggregation****Щереметьев Ю.А., Левин Г.Я.**

ФГБУ «Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Минздравсоцразвития России,
603155, Нижний Новгород, Верхневолжская наб. 18/1
Тел.: +8 (831)436-21-80; Факс: +8(831)432-21-58; e-mail: ya.sher@rambler.ru

Известно, что процесс агрегации эритроцитов определяется двумя типами биофизических и физико-химических факторов: свойствами плазмы крови и свойствами самих эритроцитов (главным образом, компонентами мембран). Проведенными нами исследованиями показано, что обработка эритроцитов лизофосфатидной кислотой индуцирует образование эхиноцитов. Агрегация таких эритроцитов резко снижена в аутоплазме. Снижается и агрегация эхиноцитов, индуцированная фибриногеном. Известно, что лизофосфатидная кислота вызывает образование положительной кривизны мембран, определяющей форму эритроцитов, а фосфатидная кислота – образование отрицательной кривизны. При этом лизофосфатидная кислота обладает эхиноцитогенным действием, а фосфатидная кислота – стоматоцитогенным действием. Недавно показано, что фосфатидная кислота усиливает агрегационную способность эритроцитов [1]. Исходя из полученных данных и анализа современной литературы, нами выдвинута рабочая гипотеза механизма агрегации эритроцитов, основанная на изменении спонтанной кривизны мембраны эритроцитов. Согласно этой гипотезе, изменение в спонтанной кривизне мембран эритроцитов будет приводить или к усилению, или к снижению их агрегационной способности в аутоплазме и под влиянием фибриногена. Поэтому вещества, вызывающие образование положительной кривизны мембраны, будут подавлять агрегацию эритроцитов, а вещества, вызывающие образование отрицательной кривизны мембраны, будут усиливать агрегационную способность эритроцитов. Предполагается также, что изменение спонтанной кривизны мембраны приводит к изменению ее связывающей способности к таким белкам плазмы крови, как фибриноген. Таким образом, повышение биологически активных веществ в крови, изменяющих спонтанную кривизну мембран, таких как лизофосфатидная кислота или фосфатидная кислота, будет разнонаправленно изменять агрегационную способность эритроцитов.

**АНАЛИЗ УЧАСТИЯ ПРОТОНОВ В ФОРМИРОВАНИИ ВЫЗВАННОГО
ЭЛЕКТРИЧЕСКИМИ СИГНАЛАМИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ОТВЕТА
ВЫСШЕГО РАСТЕНИЯ****Proton participation in inducing of photosynthetic response caused by electrical
signals in higher plants****Шерстнева О.Н., Сурова Л.М., Сухов В.С.**

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского,
603950, Нижний Новгород, пр-т Гагарина, 23.
Тел.: +7(831)465-61-06; факс: +7(831)462-30-85; e-mail: sherstneva-oksana@yandex.ru

В результате генерации и распространения электрических сигналов развиваются функциональные ответы, конечным результатом которых является повышение устойчивости растения к действию неблагоприятных факторов. В то же время, остаётся неизвестным механизм преобразования электрических сигналов в функциональный ответ и, в частности, пути индукции ответа фотосинтеза. В качестве одной из гипотез рассматривается участие в этом процессе протонной сигнальной системы, которая, однако, остаётся слабо подтверждённый экспериментально.

Эксперименты проводились на двух-трёхнедельных проростках тыквы. Варибельный потенциал индуцировался ожогом открытым пламенем, распространение сигнала регистрировалось с использованием стандартной установки для экстраклеточного отведения. Получение суспензии изолированных хлоропластов проводилось по стандартной методике выделения. Для исследования параметров фотосинтеза использовались газоанализатор и РАМ-флуориметр.

При прохождении варибельного потенциала в исследуемый лист наблюдалось быстрое снижение ассимиляции CO₂, рост нефотохимического тушения и слабые изменения квантовых выходов фотосистем I и II. Для анализа участия протонов в формировании фотосинтетического ответа на модельной системе изолированных хлоропластов было проведено две серии опытов. В первой серии опытов было показано, что нефотохимическое тушение существенно зависело от pH среды выделения, в то время как квантовые выходы фотосистем слабо менялись в физиологическом диапазоне pH. Вторая серия опытов показала, что быстрое закисление среды выделения от 7,2 до 6,5 вызывало резкий рост нефотохимического тушения и обратимое повышение квантового выхода фотосистемы II, что хорошо согласуется с данными предыдущего этапа работы и подтверждают роль протонов в формировании фотосинтетического ответа.

Таким образом, результаты выполненных на изолированных хлоропластах экспериментов являются аргументом в пользу участия входа протонов в процессе трансформации ЭС в фотосинтетический ответ. Можно предположить, что это происходит при входе протонов в строму и через неё в люмен. Закисление стромы индуцирует кратковременную активацию фотосинтеза и может, по-видимому, вызывать ингибирование ферментов цикла Кальвина. Наконец, снижение pH люмена усиливает нефотохимическое тушение. Итогом результатом описанных процессов является обратимая инактивация фотосинтеза.

Работа поддержана грантами Президента Российской Федерации (МК-1869.2012.4) и РФФИ (11-04-97071-р_поволжье_a).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА Cl^-/H^+ -АНТИПОРТЕРА В МЕМБРАНАХ КЛЕТОК КОРНЯ ГАЛОФИТА *SUAEDA ALTISSIMA* (L.)PALL.**Identification and characterization of Cl^-/H^+ -antiporter in root cell membranes of the halophyte *Suaeda altissima* (L.)Pall.****Шувалов А.В., Орлова Ю.В., Халилова Л.А., Мясоедов Н.А., Балнокин Ю.В.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, Москва, ул. Ботаническая 35
Тел.: (499)2318334, факс: (499)9778018, e-mail: laursen1243@mail.ru

Функции Cl^-/H^+ -антипортеров и их физиологическая роль у растений исследованы намного хуже, чем у бактерий и животных. Настоящая работа посвящена идентификации и исследованию некоторых свойств Cl^-/H^+ -антипортера в мембранной фракции, обогащенной везикулами аппарата Гольджи из клеток корня галофита *Suaeda altissima*. Идентифицировали Cl^-/H^+ -обмен путем регистрации ΔpCl^- -зависимого переноса H^+ через мембрану, используя два метода. С помощью одного из них ΔpCl^- -зависимый транспорт H^+ наблюдали по изменению дифференциальной абсорбции индикатора ΔpH акридинового оранжевого. Использование этого красителя для определения защелачивания требует предварительной генерации ΔpH с более кислыми значениями pH внутри везикул, чем в среде. ΔpH такой направленности генерировали путем внесения Na^+/H^+ -обменника моненсина в суспензию нагруженных ионами Na^+ везикул. Последующее добавление Cl^- к суспензии везикул приводило к диссипации образовавшегося ΔpH , скорость диссипации зависела от мембранной проницаемости сопутствующего катиона. Другой метод был основан на регистрации ΔpCl^- -зависимого защелачивания везикулярного люмена по возрастанию интенсивности флуоресценции pH -индикатора пиранина, предварительно загруженного в везикулы. Этот метод позволяет количественно определять изменения pH внутри везикул. Электрогенный характер Cl^-/H^+ -обмена был показан с помощью индикатора трансмембранного электрического потенциала ($\Delta\psi$) сафранина О. Внесение Cl^- в среду приводило к генерации отрицательного $\Delta\psi$, величина которого зависела от сопутствующего катиона. Такой потенциал может быть движущей силой переноса H^+ из среды внутрь везикул. Однако при внесении Cl^- с разными катионами во всех случаях наблюдалось защелачивание люмена. Полученный результат говорит о том, что наблюдавшееся ΔpCl^- -зависимое защелачивание люмена осуществляется Cl^-/H^+ -антипортером. Этот вывод подтверждается чувствительностью Cl^-/H^+ -обмена к ингибитору анионных транспортеров DIDS ($IC_{50}=7$ мкМ). Cl^-/H^+ -обмен обнаружил pH -зависимость с оптимумом pH 7,5, что близко pH цитоплазмы. Разделение мембран в непрерывном градиенте плотности йодисанола и определение активностей ферментов-маркеров мембранных фракций показал приуроченность Cl^-/H^+ -обмена к аппарату Гольджи. Предполагается что эндосомы образующиеся из аппарата Гольджи и локализованный в них Cl^-/H^+ -антипортер вовлечены в загрузку тонопласта ионами Cl^- , что должно иметь важное значение в хлоридном гомеостатировании цитоплазмы при засолении.

**МОЛЕКУЛЯРНОЕ УЗНАВАНИЕ МЕЖДУ БЕЛКАМИ В P450-ЗАВИСИМЫХ
МОНООКСИГЕНАЗНЫХ СИСТЕМАХ**

**Molecular recognition between proteins in the P450-dependent
monoxygenase systems**

**Яблоков Е.О.¹, Гнеденко О.В.¹, Мольнар А.А.¹, Иванов А.С.¹, Усанов С.А.²,
Арчаков А.И.¹**

1 – ФГБУ «ИБМХ» РАНН, 119121, Москва, Погодинская ул., д. 10
2 – ИБХ НАН Беларуси, 220141, Минск, ул. Акад. В.Ф.Купревича, 5, корп. 2
Тел.: +7(499)246-71-15; e-mail: alexei.ivanov@ibmc.msk.ru

P450-зависимая монооксигеназная система (P450-системы) обнаружена практически во всех видах живых организмов (исключение – вирусы), что говорит о древности этой системы. Она играет важную роль в метаболизме различных ксенобиотиков, лекарств и эндогенном синтезе стероидных гормонов, холестерина и других стероидов. В тоже время до настоящего времени нет однозначного и полного понимания молекулярного механизма транспорта электронов и катализа в P450-системах. Это обстоятельство обуславливает важность фундаментальных исследований молекулярных взаимодействий между белками-партнёрами в этих системах.

Ранее в нескольких работах было показано, что белки-партнёры из разных организмов могут взаимодействовать *in vitro* с образованием химерных комплексов, это говорит о консервативности контактных областей, отвечающих за молекулярное узнавание в P450-системах. Однако систематическое детальное изучение данного явления не выполнялось, из-за крайне ограниченного числа доступных для исследования образцов белков-партнёров P450-систем различных организмов. В настоящее время благодаря методу гетерологической экспрессии может быть получен достаточный по количеству и разнообразию набор таких белков.

Для исследования межмолекулярных взаимодействий мы использовали оптический биосенсор Bioscore 3000 (GE Healthcare), работающий на эффекте поверхностного плазмонного резонанса. На настоящий момент нами исследовано перекрестное взаимодействие белков P450-систем млекопитающих *Rattus norvegicus* и *Homo sapiens*: цитохромов P450 (CYP51A1, CYP3A4, CYP3A5), цитохром P450 редуктаз и цитохромов b5. Препараты рекомбинантных белков были получены в ИБХ НАН Беларуси. Было показано, что при перекрестном взаимодействии цитохромов P450 с партнерами P450-систем образуются химерные комплексы с КД порядка 10⁻⁶ М, что говорит об эволюционной консервативности участков белков, отвечающих за межмолекулярные взаимодействия компонентов P450-систем.

Работа поддержана РФФИ (грант 11-04-01107-а) и Министерством образования и науки РФ (ГК №16.552.11.7001).

**О МЕХАНИЗМЕ ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ В СИСТЕМЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО
ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИЙ В РЕЖИМЕ РАБОТЫ СУПЕРКОМПЛЕКСА****The specificity of the energy transport in oxidative phosphorylation system in
mitochondria in the regime of supercomplex functioning****Л.С. Ягужинский, Л.В. Ерошенко, В.С. Моисеева, К.А. Мотовилов**НИИ Физико-химической биологии МГУ им А.Н. Белозерского,
119991, Москва, Ленинские горы д.1, стр.40.

Тел.: +7(495)930-60-87; e-mail: yag@genebee.msu.su

С 1961 года обсуждаются две модели преобразования энергии реакций окисления в митохондриях. Модель П. Митчелла [1] предполагает, что мультиферментная система фосфорилирования может функционировать в диссоциированной форме, в то время как модель Р. Вильямса [2] рассматривает образование суперкомплекса – дыхательная цепь-АТФ-синтаза. Возможность существования окислительного фосфорилирования в обоих различных функциональных состояниях была показана в нашей лаборатории [3]. Модель Р. Вильямса постулирует существование специального, связанного с мембраной, пула кислот Бренстеда, который обладает избытком свободной энергии. Этот пул входит в систему сохранения и передачи энергии в митохондриях. В наших недавних исследованиях было продемонстрировано формирование этого пула с внешней стороны внутренней мембраны митохондрий в условиях функционирования протонных помп с помощью непрямых методов – рН зонда [4] и функционального теста [5]. Мы заключили, что пул кислот Бренстеда, предположенный Р. Вильямсом, локализован на внешней стороне внутренней митохондриальной мембраны. В настоящей работе мы показали прямым методом формирование пула Уильяма на внешней поверхности митопластов, а также на поверхности митохондрий в условиях синтеза АТФ и в условиях низкоамплитудного набухания, когда образуется плотный контакт между внутренней и внешней мембранами (внешняя мембрана "прозрачна" для ионов водорода). Связывание H^+ на поверхности мембраны митопластов и митохондрий было зарегистрировано с помощью измерения ζ -потенциала, значение которого коррелирует с поверхностным зарядом. ζ -потенциал измерялся с помощью системы Malvern Zetsizer, которая сочетает в себе импульсный электрофорез и регистрацию скорости частицы с помощью эффекта Доплера. После включения протонных помп положительный заряд (H^+) был найден и на митопластах и на внешней поверхности митохондрий. Много лет назад на модельной системе мы показали возможность использования градиента кислот Бренстеда на границе октан-вода в качестве источника энергии для синтеза АТФ [6]. Таким образом, связанные с мембраной кислоты Бренстеда, а не свободные протоны, играют роль энергоносителя для синтеза АТФ в условиях образования суперкомплекса.

1. Mitchel P (1961) Nature 191: 144–148 (London)
2. Williams RJ (1961) J. Theor. Biol. 1: 1–17
3. Krasinskaya IP (1984) FEBS Letters 167(1):176–180
4. Solodovnikova IM (2004) Biofizika 49: 47–56
5. Yurkov VI (2005) Biokhimiya 70: 195–199 (Moscow)
6. Yaguzhinsky LS (1976) Nature 259: 494–495

**КВАНТОВЫЕ БИЕНИЯ ПРИ РАЗДЕЛЕНИИ ЗАРЯДОВ В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ
*RHODOBACTER SPHAEROIDES*****Quantum beats at charge separation in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*****Яковлев А.Г.¹, Шкуропатов А.Я.², Шувалов В.А.^{1,2}**¹ – НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В.

Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские Горы, корп. А

² – Институт фундаментальных проблем биологии РАН,

142290, Пущино Моск. обл., Институтская ул., д. 2.

Тел.: +7(495)939-53-63; факс: +7(495)939-31-81; e-mail: yakov@genebee.msu.su

С помощью фемтосекундной дифференциальной спектроскопии поглощения исследованы когерентные эффекты, возникающие при разделении зарядов в сухих пленках феофитинмодифицированных реакционных центров (РЦ) пурпурной бактерии *Rba. sphaeroides*. В этих РЦ первичное разделение зарядов происходит между димером бактериохлорофилла Р и мономерным бактериохлорофиллом ВА. При узкополосном фемтосекундном возбуждении в полосу поглощения Р при 870 нм обнаружены слабые осцилляции с периодом 1.5 пс в кинетиках вынужденного излучения Р* и поглощения ВА-. Найдено, что эти осцилляции имеют одинаковые фазы на коротковолновом (905 нм) и длинноволновом (940 нм) склонах полосы вынужденного излучения Р*. Также найдено, что фаза осцилляций поглощения ВА- при 1020 нм противоположна фазе осцилляций вынужденного излучения Р* при 905 и 940 нм. Полученные данные указывают на отсутствие колебательного волнового пакета в возбужденном и основном состояниях Р. Тогда одним из наиболее вероятных механизмов, приводящем к появлению данных осцилляций, являются квантовые биения между колебательными уровнями, принадлежащими состояниям Р*В и Р+ВА-. Показано, что наибольший вклад в осцилляции дают биения уровней низкочастотной колебательной моды при 23 см⁻¹. Эта мода может принадлежать белковому окружению Р и ВА в РЦ *Rba. sphaeroides*. Оценка энергии резонансного взаимодействия уровней данной моды, сделанная на основе данных эксперимента, составляет 6 см⁻¹, что близко к нижней границе диапазона оценок 6 – 25 см⁻¹, полученных различными методами в ряде работ. Другим механизмом, ответственным за появление осцилляций при разделении зарядов, может быть модуляция скорости разделения зарядов при конформационной перестройке окружения Р и ВА. Эта перестройка возникает в ответ на появление разделенных зарядов и может иметь периодический характер. Например, это может быть реориентация ОН – группы тирозина М210, расположенного вблизи Р и ВА. Для того, чтобы сделать более определенный выбор в пользу того или иного механизма, необходимы дальнейшие исследования в РЦ других типов, например в нативных РЦ *Rba. sphaeroides*. В этих РЦ в первичном разделении зарядов участвуют три состояния Р*ВН, Р+ВА-Н и РВАН-. Квантовые биения в такой системе должны иметь вполне определенные частотные и фазовые характеристики, отличные от таковых для случая некогерентной модуляции термодинамических параметров системы. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 11-04-00312).

КИНКИ ДНК И ВНЕШНЕЕ ПЕРИОДИЧЕСКОЕ ПОЛЕ

DNA kinks and external periodic field

Якушев Л.В.¹, Закирьянов Ф.К.²

1 – Институт биофизики клетки РАН, Пущино, 142290, Московская обл., Пущино, ул. Институтская, 3;

2 – Башкирский государственный университет, 450074, Уфа, ул. Заки Валиди, 32
Тел.: +7(496)773-92-52; факс: +7(496)7373-05-09; E-mail: yakushev@icb.psn.ru

В работе представлены результаты исследований движения нелинейных конформационных возмущений (кинков) в однородных полинуклеотидных цепях ДНК под действием внешнего периодического поля.

Для моделирования динамики кинков в одной из двух полинуклеотидных цепей ДНК использовалось модифицированное уравнение синус-Гордона

$$l\ddot{z} - K'a^2jz + V\sin j = -\gamma\dot{z} + F_0 \cos y(t)$$

где $j(z,t)$ – угловые отклонения оснований, l – момент инерции оснований, K' – коэффициент жесткости сахаро-фосфатной цепи, V – энергия, необходимая для того, чтобы повернуть основание на угол $\pi/2$, a – расстояние между парами оснований, γ – коэффициент диссипации, F_0 – амплитуда внешнего воздействия, dy/dt – частота внешнего воздействия.

Рассматривались три случая периодического воздействия: с постоянной частотой $\psi(t) = \omega t$, с линейно растущей частотой $\psi(t) = \omega t + \alpha t^2/2$ и с линейно убывающей частотой $\psi(t) = \omega t - \alpha t^2/2$, где ω – постоянная составляющая частоты внешнего поля, а α – коэффициент, характеризующий скорость убывания (или возрастания) частоты внешнего поля.

Анализ фазовых траекторий движения кинков показал, что

1) в случае внешнего воздействия с постоянной частотой кинки стремятся к предельному циклу; в данном случае энергия, вводимая в систему внешним воздействием, в точности компенсируется энергией, рассеиваемой в системе за счёт диссипации [1];

2) в случае внешнего поля с возрастающей частотой – к стационарному состоянию, отвечающему особой точке типа устойчивый фокус [2];

3) в случае внешнего поля с убывающей частотой кинки переходят из одного стационарного состояния (неустойчивый фокус) в другое (устойчивый фокус) [2].

Полученные результаты свидетельствуют о возможности управления движением кинков путем изменения частоты внешнего воздействия. Таким образом, можно ожидать, что продолжение исследований в этом направлении не только прольют дополнительный свет на наши знания о динамических механизмах функционирования молекулы, но и дадут возможность найти пути управления этими механизмами.

1. Шаповалов А.В., Краснобаева Л.А. Солитоны уравнения синус-Гордона. Томск: ТГУ, 2009. – 192 с.

2. Якушев Л.В., Кашапова Г.Р., Закирьянов Ф.К. / Биофизика, 2012. Т.57. С.21–26.

DNA REACTIVITY WITH FORMALDEHYDE AND THE DOUBLE HELIX'S BREATHING MODES

**Maxim D. Frank-Kamenetskii^{1,2}, Tanggis Bohnuud¹, Dmitri Beglov², Chi Ho Ngan²,
Brandon Zerbe², David R. Hall², Sandor Vajda^{1,2,3}, and Dima Kozakov²**

¹ Graduate program in Bioinformatics

² Department of Biomedical Engineering and

³ Department of Chemistry, Boston University, Boston, Massachusetts 02215, USA

Formaldehyde has long been recognized as a hazardous environmental agent highly reactive with DNA. DNA reaction with formaldehyde was a subject of extensive biophysical studies by Doty, von Hippel, McGhee, Lazurkin, Trifonov, Frank-Kamenetskii and others. These studies, together with parallel studies of DNA hydrogen exchange, yielded the concept of the DNA double helix's breathings, or base pair' transient openings. These studies were later considerably extended using NMR by Gueron, Leroy and others, which resulted in quantitative description of the DNA base pair's openings.

A fresh interest in DNA reactivity to formaldehyde has been stimulated by realization that, due to the activity of histone demethylation enzymes within the cell nucleus, formaldehyde is produced endogenously, in direct vicinity of genomic DNA. Should it lead to extensive DNA damage? We address this question with the aid of a computational mapping method, analogous to X-ray and NMR techniques for observing weakly specific interactions of small organic compounds with a macromolecule in order to establish important functional sites. We concentrate on the leading reaction of formaldehyde with free bases: hydroxymethylation of cytosine amino groups. Our results show that in B-DNA cytosine amino groups are totally inaccessible for the formaldehyde attack. Then we explore the effect of recently discovered transient flipping of Watson-Crick (WC) pairs into Hoogsteen (HG) pairs ("Hoogsteen breathing"). Our results show that the HG base pair formation dramatically affects the accessibility for formaldehyde of cytosine amino nitrogens within WC base pairs adjacent to HG base pairs. The extensive literature on DNA interaction with formaldehyde is analyzed in light of the new findings. The obtained data emphasize the significance of DNA HG breathing, in addition to base pair's transient openings.

EXCITONS IN PHOTOSYNTHESIS. ARE THEY INDEED RELEVANT AT FUNCTIONAL TEMPERATURES?***Freiberg A.*^{1,2}**

1 – Institute of Physics, University of Tartu, Riia 142, 51014 Tartu, Estonia;

2 – Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu, Riia 23, 51010 Tartu, Estonia

Тел.: +372-56453175; e-mail: arvi.freiberg@ut.ee

Optical spectra of biological systems are generally studied either near the low-temperature limit, which is advantageous in terms of gaining resolution, or at physiological temperatures. For better understanding functioning such systems, it is required to develop methods and models that are consistently applicable at both limiting cases. In a broader vista, these models help to bridge the gap between quantum physics and biology. Here, we report about temperature dependencies of absorption, fluorescence, and fluorescence anisotropy spectra of various antenna complexes from purple photosynthetic bacteria over a broad temperature range from the boiling point of liquid helium to ambient temperatures. Experimental data and their theoretical analysis provide clear evidence of survival of collective excitons at functional photosynthetic temperatures.

**ТИОРЕДОКСИН И АКТИВНОСТЬ ГИСТОН АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ
И ДЕАЦЕТИЛАЗЫ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ НА НАЧАЛЬНЫХ СТАДИЯХ
ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА**

Thioredoxin and histone acetyltransferase and deacetylase activities in tissue culture on the initial stages of osmotic stress

Jadko S. I.

Institute of Botany, NAS of Ukraine, Tereschenkivska St. 2, Kiev, 01601, Ukraine.
Tel.: 2723236; e-mail: sjadko@hotmail.com

Histone acetyltransferases (HAT) and histone deacetylases (HAD) have important role in posttranslational modification of nuclear histones and in regulation of gene expression during stress response. However, it is unclear how the enzymes can be regulated in cell stress. We suppose that one of the ways of such regulation can be realized by thioredoxins (Trx). The purpose of the research was study of the role of Trx in regulation of HAT and HAD activities in tissue culture on the initial stages of hyper-osmotic stress.

12-14 days old tissue culture of *Arabidopsis thaliana* was studied. Osmotic stress was produced by 25% solution of polyethylene glycol-6000 (PEG). After 3 hours content of H₂O₂ and HAT and HAD activities were determined. Aurothiomalate (ATM) for inhibition of Trx reductase and TR activities was used to study of the TR-dependent regulation of HAT and HAD. Protein concentration was determined according to Bradford. All experiments were repeated by 3-4 times. Experimental data were statistically treated.

Early increasing of TR, HAT and HAD activities in the tissue culture took place under PEG. But under ATM+PEG an amplitude of stress increasing of the TR activity was in 1,7-2 times lower with follow-up decreasing in HAT and HAD activities too.

Thus, in *A. thaliana* tissue culture on the initial stages of osmotic stress take place early TR-dependent increasing of HAT and HAD activities and this mechanism is under discussion.

IMPACT OF SOME NANOPARTICLES ON MEMBRANE POTENTIAL OF WATER PLANT CELLS**Khalilov R.I.¹, Ahmadov I.S.¹, Ramazanov M. A.¹, Andrzej Sienkiewicz²**

¹ – Baku State University, Department of Chemical Physics of Nanomaterials, Azerbaijan, AZ1148, Z.Khalilov str.23,Baku

² – Institute of Materials, School of Engineering, EPFL, Lausanne, Switzerland
Tel.:(+99450) 3213211,Fax:(+99412)5963408, E-mail: hrovshan@hotmail.com.

A number of scientific reports highlight the impact of nanomaterials on human/animal cells/organs, very few studies have been performed to assess phytotoxicity of nanomaterials. The steady growth of nanotechnology-enhanced products raises concerns regarding the interaction of nanoparticles with biological systems. One of protocols for experimental determination of cytotoxicity of nanoparticles is to eliminating the relations of nanoparticles with plasmatic membrane. These protocols may be structural examinations, dysfunctions of membrane ion channels, the rate of metabolize. The present study examines cellular interaction of nanoparticles for thier phytotoxicity through membrane damage For this purpose, the goal of our studies is to attempt to obtain information on the changes of the transport function of the plasma membrane of cells due to interactions with nanoparticles. We consider in this experiments different possible mechanisms (hypotheses) for the interactions of nanoparticles with plasmatic membrane, and all could contribute to toxicity: a) nanoparticles cannot penetrate the plasma membrane but cause surface physical disruption; b) nanoparticles diffuse through the plasma membrane and during their transport affect changes in the functions of active and passive ion membrane channels

The study was performed on photosynthesizing cells of leaves of the higher water plants Canadian waterweed *Elodea canadensis* Rich. In experiments were used three types of zirconia nanoparticles with a particle size of 21 nm ,42 nm and 100 nm, Aluminium nanopowder a size of 40 nm and 100 nm, Al+Ni nanopowder a size of 100 nm and Fe2O3 nanoparticles with a size of 8 nm. The results presented here are the first to our knowledge to identify the functionally changes of two types of ion transport regulating components of the plasma membrane induced by nanoparticles in plant cells. A change of membrane potential was detected when leaves of the elodea were exposed to nanoparticles. It is established that only ZrO2 nanoparticles with size of 21 nm and Al+Ni nanoparticles leads to depolarization of MP. The nature involved in nanoparticles induced plasma membrane depolarization in *Elodea* cells are similar to the ones at the origin of plasma membrane depolarization induced by other physical and chemical factors in plant cells. We submit data by showing that the typical membrane depolarization triggered by nanoparticles might be mediated by the reduction of the H⁺-ATPase or redox system activity in addition to the activation of K⁺ channels in *Elodea* cells. Adhering to the idea of parallel existence of the H⁺-ATPase and redox-active types of H⁺-pump on the plant cell plasma membrane of the plant cell, we suggest that nanoparticles may act the redox-active types of H⁺-pump, because there was data about decreasing the ferricyanide depolarization potential.

**AAA+ PROTEINS AS ATP-DEPENDENT MOLECULAR MACHINES: THE CASE OF
MAGNESIUM CHELATASE****AAA+ белки как АТФ-зависимые молекулярные машины:
структура и динамика магниевой хелатазы****Lundqvist J., Elmlund H., Emanuelsson C., Hansson M., Lindahl M. and Al-
Karadaghi S.**Department of Biochemistry & Structural Biology, Centre for Molecular Protein Science,
Lund University, P.O. Box 124, 221 00 Lund, Sweden.

Metallated tetrapyrroles like heme (Fe (II)), chlorophyll (Mg(II)) and cobalamin (Co(II), vitamin B12) serve as prosthetic groups in organisms (1). A class of enzymes called chelatases catalyses metal ion insertion into these groups. The enzymatic metallation reactions are divided into ATP-dependent such as those catalysed by Mg-chelatase and aerobic cobalt chelatase, and ATP-independent, catalysed by ferrochelatase and anaerobic cobalt chelatase.

The insertion of Mg²⁺ into protoporphyrin IX is the first step unique to chlorophyll/bacteriochlorophyll biosynthesis. The reaction is catalysed in a 2-step ATP-dependent manner by magnesium chelatase, an enzyme, which is built up by three subunits: Bchl, BchD and BchH. In the presence of ATP Mg-chelatase forms a large functional oligomer, which belongs to the chaperone-like AAA+ family of ATPases. Using X-ray crystallography and single-particle cryo-electron microscopy we have studied the three-dimensional structure of the separate components as well as the complex between subunits BchD and Bchl of *Rhodobacter capsulatus* Mg-chelatase in the presence of ADP, the nonhydrolyzable ATP analog AMPPNP, and ATP (2-4). The complex is built up by two interacting rings of subunits Bchl and BchD arranged as 3 dimers around a three-fold symmetry axis. The structures revealed substantial conformational dynamics of the complex in the presence of ATP and ADP, and suggested that the C-terminal domains of the BchD subunits play a central role in transmitting conformational changes from the ATP-hydrolysing Bchl subunit to the BchD subunit. Based on these data a dynamic model for the function of magnesium chelase Al-Karadaghi, S., Franco, R., Hansson, M., Shelnutt, J.A., Isaya, G. and Ferreira, G.C. (2006). Chelatases: distort to select? *TIBS* 31, 135-142.

1. Sirijovski, N. Lundqvist, J., Rosenbäck, M., Al-Karadaghi, S., Willows, R.D. & Hansson, M. (2008). A 3D substrate-binding model of the chlorophyll biosynthesis enzyme magnesium chelatase. *J. Biol. Chem.* 283, 11652-11660.

2. Lundqvist, J., Elmlund, H., Peterson Wulff, R., Berglund, L., Elmlund, D., Emanuelsson, C., Hebert, H., Willows, R.D., Hansson, M., Lindahl, M. and Al-Karadaghi, S. (2010). ATP-induced conformational dynamics in the AAA+ motor unit of magnesium chelatase. *Structure* 18, 354-365.

3. Qian P, Marklew CJ, Viney J, Davison PA, Brindley AA, Soderberg C, Al-Karadaghi S, Bullough PA, Grossmann JG, Hunter CN (2012). Structure of the cyanobacterial Magnesium Chelatase H subunit determined by single particle reconstruction and small-angle X-ray scattering. *J Biol Chem* 287, 4946-4956.

THE STRUCTURE AND OLIGOMERIZATION OF FRATAXIN: A MECHANISM FOR THE DELIVERY AND DETOXIFICATION OF IRON IN MITOCHONDRIA**Структура и олигомеризация фратаксина: механизмы доставки и обезвреживания железа в митохондриях**

Söderberg¹, C., Rajan¹, S., Shkumatov², A., Gakh³, O., Svergun², D., Isaya³, G., Al-Karadaghi¹, S.

1- Dept. of Biochemistry and Structural Biology, Lund University, Sweden; **2-** DESY, EMBL Station, Hamburg, Germany. **3-** Dept of Biochemistry & Molecular Biology, Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, USA; *e-mail: salam.al-karadaghi@biochemistry.lu.se*

Frataxin a mitochondrial protein, which has been linked to the neurodegenerative disease Friedreich's ataxia, performs key functions in iron storage, delivery and detoxification in mitochondria. Using X-ray crystallography, single-particle electron microscopy and small-angle X-ray scattering (SAXS), we studied the structures of the iron-free and iron-loaded frataxin trimers and 24-mers as well as the process of metal-dependent assembly of larger oligomers of the protein. These studies provided the basis for understanding the mechanisms of metal-induced frataxin assembly into oligomeric particles and its function in iron storage and detoxification. They also provide an insight into the interplay between frataxin and other proteins, to which iron is delivered.

The structures show that the trimer is the basic building block of larger oligomers. It also exhibits structural details consistent with frataxin's function. The structural details of the models of frataxin reveal striking similarities to the evolutionary unrelated ferritin superfamily of iron storage proteins.

1. Karlberg, T., Schagerlöf, U., Gakh, O., Park, S., Ryde, U., Lindahl, M., Leath, K., Garman, E., Isaya, G. & Al-Karadaghi, S. (2006). *Structure* 14, 1535-15646.

2. Schagerlöf, U., Emlund, H., Gakh, O., Nordlund, G., Hebert, H., Lindahl, M., Isaya, G. and Al-Karadaghi, S. (2008). *Biochemistry* 47, 4948-4954.

3. Söderberg C.A.G., Shkumatov A.V., Rajan S., Gakh O., Svergun D.I., Isaya G. and Al-Karadaghi S. (2011). *J. Mol. Biol.* 414, 783-797.

4. Söderberg, CAG, Rajan, S, Shkumatov, AV, Gakh, O, Schaefer, S., Ahlgren, E-C, Svergun, DI, Isaya, G and Al-Karadaghi, S. (2012). *J Biol Chem*, Submitted.

**МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ АГРЕГАТОВ ЛИЗОЦИМА НА
ЛИПИДНЫЙ БИСЛОЙ****Lipid bilayer-modifying effects of aggregated lysozyme****Trusova V.M.**

V.N. Karazin Kharkov National University, 4 Svobody Sq., 61022, Kharkov, Ukraine
Tel.: +38 (057) 343-82-44; e-mail: vtrusova@yandex.ru

A number of so-called conformational diseases including neurological disorders (Parkinson's, Alzheimer's and Huntington's diseases), type II diabetes, spongiform encephalopathies, systemic amyloidosis, etc., are associated with the deposition in tissue of highly ordered aggregates of specific proteins. These aggregates are composed largely of misfolded proteins polymerized into amyloid fibrils sharing a core cross- β -sheet structure, in which polypeptide chains are oriented in such a way that β -strands run perpendicularly to the long axis of the fibril, while β -sheets propagate in its direction. Despite extensive research efforts, the mechanisms of fibrillogenesis remain obscure. Accumulating evidence lends support to the idea that membrane disruption induced by protein oligomers represents the main pathway of amyloid toxicity. In view of the key role of membrane destabilization in determining the cytotoxicity of protein aggregates, elucidation of molecular-level details of oligomer-membrane interactions seems to be of utmost importance. In the present study fluorescence spectroscopy technique was utilized to explore the impact of pre-fibrillar lysozyme (Lz) on the properties of phosphatidylcholine/cardiolipin (PC/CL) lipid membranes. Four membrane probes, viz. pyrene, 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH), 4-dimethylaminochalcone (DMC) and 4-p-(dimethylaminostyryl)-1-dodecylpyridinium (DSP-12), differing in their transverse bilayer location and sensitivity to the changes in membrane properties, were recruited to ascertain membrane-modifying ability of aggregated Lz. Analysis of spectral responses of pyrene and DPH revealed the reduction of membrane free volume upon incorporation of Lz self-assemblies. In addition, utilization of DMC and DSP-12 residing in the polar region of the lipid bilayer showed that protein aggregates induce the dehydration of membrane surface. All these effects were found to be independent on CL content highlighting the predominant role of hydrophobic interactions in controlling the binding of Lz oligomers to the lipid bilayer. Furthermore, comparison of the effects of Lz monomers, oligomers and fibrils showed that soluble oligomeric intermediates exert the most destructive influence on membrane properties. Although translation of *in vitro* results presented here into *in vivo* processes is not straightforward, our findings may be of importance in light of the ongoing debate on the mechanisms of amyloid toxicity.

**ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ
ЛИЗОЦИМА И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ С МЕМБРАНАМИ****Fluorimetric detection of lysozyme amyloid fibrils and their membrane interactions****Vus K.O.¹, Kastorna A.P.¹, Kirilova E.M.², Kirilov G.K.², Kalnina I.²**

1 – Department of Biological and Medical Physics, V.N. Karazin Kharkiv National University,
4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine

2 – Department of Chemistry and Geography, Daugavpils University, 13 Vienibas,
Daugavpils, LV5401, Latvia. *E-mail: katenka.vus@mail.ru*

Fluorescence spectroscopy is one of the most informative tools for studying biological processes occurring at the molecular level due to its inherent sensitivity, good spatial and temporal resolution. Particularly, this technique is often applied for investigation of protein folding and misfolding processes. During last decades this problem has been in focus of numerous researches because a wide range of human diseases are associated with the accumulation of insoluble protein aggregates (amyloid fibrils) in various tissues and organs. For the development of effective therapeutic agents it is of great importance to gain insights in amyloid structure and toxicity. The aims of this report were follows: i) to characterize 13 novel aminobenzanthrone dye (BD) complexation with amyloid lysozyme; ii) to ascertain structural modification of model lipid membranes under the influence of fibrillar aggregates.

At the first step of our study the sensitivity of BD to fibrillar lysozyme was evaluated by analyzing dye binding isotherms in terms of Langmuir adsorption model. This allowed us to calculate association constants (K_a), quantum yields (Q) and other additional quantities of the protein-bound dyes. It appeared that BD affinity for protein aggregates ($K_a \sim 105\text{-}107\text{ M}^{-1}$) was much stronger than affinity of classical amyloid marker Thioflavin T ($K_a \sim 104\text{ M}^{-1}$). Besides, the majority of novel dyes had lower sensitivity to monomeric protein and Q value 10 times exceeding that of Thioflavin T. Finally, dyes AM2, AM1 and A8 turned out to be the most prospective tools for amyloid detection due to extremely high Q (ca. 0.5 – 0.7). These results indicate the possibility of aminobenzanthrone dyes application for amyloid detection.

At the second step of this work modifying effect of amyloid lysozyme on the model lipid membranes composed of phosphatidylcholine was examined using fluorescent probe Laurdan. This probe is sensitive to the alterations in molecular organization and polarity of lipid bilayer. The changes in emission spectrum of Laurdan were characterized by the generalized polarization (GP). It was found that lysozyme fibrils induce the rise of GP value (by 76 %) indicating the decrease of the membrane hydration and increase of lipid packing density.

This work was supported by the Fundamental Research State Fund (project number F.41.4/014).

**ИССЛЕДОВАНИЕ ХЕЛАТОВ ЕВРОПИЯ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ МЕТОДОМ ТУШЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ**

Fluorescence quenching study of europium chelates as potential anticancer drugs

Yudintsev A.V.¹, Trusova V.M.¹, Murtazaeva L.A.¹, Kutsenko O.K.¹, Deligeorgiev T.²

1 – Department of Biological and Medical Physics, V.N. Karazin Kharkov National University, 4 Svobody Sq., Kharkov 61077, Ukraine;

2 – Department of Applied Organic Chemistry, Faculty of Chemistry and Pharmacy, University of Sofia, Sofia 1164, Bulgaria
E-mail: ayudintsev@yahoo.com

During the past decades lanthanide complexes attract ever growing interest due to their favorable photophysical properties, such as exceptionally long lifetime, large Stokes' shifts, and line-like emission. These unique spectral characteristics resulted in the intensive utilization of lanthanide chelates in a wide variety of scientific and technological areas. Recently medical applications of lanthanide complexes were expanded by introducing the newly synthesized europium compounds (EC) as novel anticancer drugs. However, clinical application of these drugs in the free form may not provide complete benefit to the patient unless supported by the adequate drug delivery system. These limitations are connected with high toxicity, metabolic instability and low therapeutic index of the antineoplastic compounds. Therefore, it seems of importance to evaluate the possibility for development of the effective delivery systems for EC, capable of not only acting as delivery vehicle, but also altering the biodistribution of the drugs and increasing their therapeutic potential. Among available micro- and nanosized drug carriers, liposomes represent the most promising systems due to their versatility, biocompatibility, biodegradability and lack of immunogenicity. The present study was undertaken to evaluate the membrane-associating properties of a series of novel antitumor agents, Eu(III) coordination complexes (EC), using the methodological approach based on the dependence of quenching efficacy of membrane-bound probe on the quencher partitioning into lipid bilayer. To derive EC partition and permeation coefficients, these compounds were recruited as collisional quenchers for the hydrophobic membrane probe pyrene. Analysis of EC-induced decrease in pyrene fluorescence intensity in terms of partition and solubility-diffusion models allowed us to evaluate the partition and permeation coefficients of the examined compounds into the lipid vesicles prepared from zwitterionic lipid phosphatidylcholine (PC) and its mixtures with cholesterol (Chol) and anionic lipid cardiolipin (CL). The drug-lipid interactions were found to have the complex nature determined by both EC structure and lipid bilayer composition. High values of the obtained partition and permeation coefficients create the background for the development of EC liposomal formulations.

This work was supported in part by Fundamental Research State Fund (project number F.41.4/014).

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

А					
Абаева А.А.	I 7	Алова А.В.	I 19	Ахвердиева Г.А.	I 29
Абатурова А.М.	I 297	Амерханов З.Г.	I 20, I 145	Ахмедов Н.А.	I 30, I 126
Аббаслы Р.М.	I 30, I 126	Ананьева Ю.Е.	III	Ахмедова Р.Ш.	IV 63, IV 64
Аббасов Х.Ф.	III 153	11, III 201		Ахмедова С.Р.	I 30
Абдрахимов Ф.А.	III 14, III	Анашкина А.А.	I 21	Ахметшин М.О.	II 33
103, III 220		Андреев А.А.	II 60, IV 10	Аюпов Р.Х.	IV 17
Абдуллаев Х.Д.	I 153	Андреев В.П.	III 12		
Абдуллаева Э.А.	III 149	Андреев С.Г.	III 233	Б	
Абдуллин А.	II 7	Андреева Л.А.	I 22	Бабаев А.А.	III 193
Абдулнасыров Э.Г.	I 160	Андреева Ю.В.	III 13	Бабушкина Т.А.	III 18
Абдурахманов Р.Г.	I 90	Андрянов В.В.	II 13, II 24	Баврина А.П.	II
Аболтин П.В.	II 8	Андропова В.Л.	I 85, I	16, III 165	
Абрамов Е.Г.	IV 7	285, III 19		Багиров Т.О.	IV 63, IV 64
Абрамов М.Е.	III 169	Анисимов А.В.	I 23, I	Багирова Э.Д.	III 63
Аветисян А.В.	II 9	268, III 14, III 15, III 103, III 220,		Баграев Н.Т.	I 31
Авилова Е.А.	IV 42	IV 11, IV 88		Баграташвили В.Н.	I 154
Авсиевич Т.И.	I 8	Аносов А.А.	I 216	Багров Д.В.	IV 33
Автономов Д.М.	III 39	Антал Т.К. I 192		Баева Е.С. I 32	
Агаева Г.А.	I 9, I 10	Антипов С.С.	I 240	Бажич В.Б. I 167	
Агаева Л.Н.	I 75	Антоненко Ю.Н.	I 253, I	Бажулина Н.П.	I 85, III 19
Агаева У.Т. I 11		269, I 276, IV 12		Базиян Б.Х.	IV 100
Агапов И.И.	I 253	Антонец В.А.	II 14, II	Байдер Л.М.	III 20
Агладзе К.И.	I 124, II 52	121, IV 13		Байжуманов А.А.	I 131
Агрба П.Д.	III 7, III 115	Антонец М.А.	IV 13	Байрамов А.А.	II
Адакеева С.И.	I 95	Антонов В.Г.	I 169, I 202	143, III 231	
Адашевская Л.В.	III 166	Антонов В.Ф.	I 24, I 216,	Байрамова С.А.	III 50
Адельянов А.М.	I 12	I 224, I 245		Бакшаева Е.А.	III 7, III 115
Акатов В.С.	III 121	Антропова И.Г.	III 118	Балабаев Н.К.	I 33,
Акберова Н.И.	IV 17	Артикаева Г.Ф.	III 216	I 74, I 177	
Аквасальенте Л.	III 214	Арефьев А.Б.	IV 14	Балабанова Л.А.	IV 56
Акимкин Т.М.	III 8, III 224	Аржаник В.К.	I 25	Балаев Н.В.	I 148, I 237
Акимов Н.Б.	IV 8	Ариповский А.В.	III 51	Балакин В.Е.	III 216
Акимов С.А.	I 36	Артамонов Д.Н.	III 169	Балалаева И.В.	III 21, III
Акинчиц Е.К.	I 13, I 286	Артеева Н.В.	I 173	59, III 79, III 110, III 119, III 140, III	
Аксенова Г.Е.	I 299	Артемова Н.В.	I 26, I 272	147, IV 34	
Албантова А.А.	I 203	Артемьев М.В.	III 98	Баландина А.Н.	II 41, III 17,
Алексеев А.А.	II 10, IV 65	Артюхов В.Г.	I 32, I 35, I	III 56, III 218	
Алексеева О.М.	I 14, I 203	180, I 208, IV 15, IV 96		Балахнина И.А.	III 22
Алексеев Л.Л.	III 9	Артюшенко С.В.	I 27	Балашенко Н.А.	IV 46
Алексейчук И.В.	II 11	Архипова В.С.	I 85, III 19	Балашов С.П.	III 23
Аленина К.А.	I 15, I 16	Арчаков А.И.	I 130, I 325	Балнокин Ю.В.	I 324
Алесенко А.В.	II 12	Арчакова Л.И.	I 277	Балобанов В.А.	I 34
Алескерова Л.Э.	I 15, I 16	Асадов Ч.Д.	I 83	Баранов И.А.	III 24
Алиев Г.Н. I 197, III 155		Асланиди К.Б.	I 111	Баркин В.В.	III 43, III
Алиев Р.Э. I 17, IV 9		Астафуров В.И.	II 15,	53, III 162	
Алиев Т.К. III 75		III 16, IV 16		Барон А.В. IV 81	
Алиева И.Н.	I 70	Астафурова М.В.	IV 16	Баррет Г. II 7	
Алиева М.Ю.	III	Асташев М.Е.	I 28, I 275	Бартон Х.А.	II 21, II 66
10, III 149		Атауллаханов Ф.И.	I 7, I 25, I	Бартуник Г.	I 274
Алифов А.А.	I 18	64, I 225, II 41, II 139, III 17, III 56,		Барцев С.И.	II 17, 42
Алишева Д.А.	IV 89	III 88, III 142, III 218		Барцева О.Д.	II 17
		Аткарская М.В.	III 233	Басырова А.М.	I 115
		Ахадов Т.А.	II 144		

Батищев О.В.	I 189	Богданов М.В.	I 89	Булыгин Ф.В.	I 171
Батяновский А.В.	I 209	Богданова А.Б.	III 28	Булычев А.А.	I 19, I 53, II
Бахметьева О.И.	I 35	Богданова Л.А.	II	22, III 186	
Бахмутова А.А.	II 18	143, III 231		Бункин А.Ф.	I 235
Баходина С.И.	I 89	Богданова Л.Р.	I 112	Буравлев Е.А.	III 156
Бахчина А.В.	IV 18	Богодвид Т.Х.	II 24	Буравлёв Е.В.	III 242
Башкатов А.Н.	III 52	Богомолова Е.В.	III 33	Бураков А.О.	IV 20
Башкиров П.В.	I 12, I 36,	Божков А.И.	II 101	Бурлакова Е.Б.	I 14, I 104,
I 37, I 269		Болдырихин В.С.	III 227	I 203, I 296, III 42, III 86,	III 233
Башмаков Д.И.	III 206	Болотанова М.К.	II 143, III	Бурмистров М.В.	III 252
Безруких А.Е.	III 25	34, III 231		Бурова Е.Б.	III 36
Безсонов Е.Е.	I 38,2 I 49	Болотина Л.Н.	III 196	Бутанаев А.М.	II 161
Безухова О.В.	III 219	Большацева Ю.В.	II 102	Бутов С.Н. I 202	
Бейлина С.И.	I 195, I	Большакова А.В.	II 79	Бутылин А.А.	II 139
196, II 138		Бондарь А.Т.	II	Бухараева Э.А.	II 29, II
Белашева И.Б.	I 205	25, III 234		108, II 125, II 155	
Белая М.Л.	I 174	Бондарь В.С.	II 37, IV 81	Бухман В.М.	II 89
Белая О.Л.	III 20	Борзииков В.В.	III	Бушук Б.А. I 54	
Беленко А.И.	III 26, III 27	35, III 135		Бушук С.Б. I 54	
Белецкая Е.А.	III 80	Борзова В.А.	I 46	Буянов Л.С.	III 43
Белкин А.В.	III 28	Борисова М.М.	I 118	Быков Н.А.	I 183
Белкина Н.А.	III 28	Борисова М.П.	I 47, IV 29	Быкова О.В.	I 55, I
Беллюстин Н.С.	III 29	Боровиков Ю.С.	I 270	143, III 151	
Белов В.В. III 148		Бородин А.В.	I 48	Быстрицкая Е.П.	IV 58
Белов Д.Р. II 11		Бородкина А.В.	III 36	Быстрова М.Ф.	IV 21
Белова А.С.	III 30	Бороновский С.Е.	I 176, I	Бычкова А.В.	III
Белова Л.П.	I 39	198, I 293, II 26, II 55,	II 80	200, IV 22	
Белова М. II 19		Боряк О.А.	IV 51	Бычкова В.Е.	I 34
Белова Н.А.	III 83, III 97	Бошкова Е.А.	I 49		
Белова С.П.	I 60	Брагин В.А.	I 50, I 302	В	
Белозерская Т.А.	III 31	Браже А.Р. I 171, I 228,	II 27	Вагабова З.С.	I 56
Белолицевский П.В.	II 42	Браже Н.А.	I 228	Вайнштейн Г.Б.	III 13
Белослудцев К.Н.	I 40	Бражников Е.В.	I 51	Валеев Н.В.	II 36
Белослудцева Н.В.	I 40	Брайловская И.В.	I 149	Валиулина А.Ф.	III 54
Белостоцкий А.А.	I 41, I 42	Брандт Н.Н.	I 48, III 22	Валиуллина Ю.А.	I 57
Белостоцкий А.А.	II 20	Брегадзе В.И.	III 87	Валуева Т.А.	I 120
Белоусов В.В.	III 30	Бржевская О.Н.	I 210	Ванг Дж.М.	III 23
Белых Д.В.	III	Брилинская Е.С.	I 31	Ванг К.Дж. I 48	
241, III 242		Брилкина А.А.	III 21, III	Ванин А.Ф.	III 44, III
Белых С.В. II 21		30, III 79		130, III 226, III 227, III 250	
Белявская Н.А.	I 62, III 254	Брусков В.И.	III 37, III 60	Ванюшин Ю.	II 7
Беляева Е.А.	I 43	Буглак А.А.	I 289, II	Вапняр В.В.	III 45
Беляева Н.Е.	II 22	28, III 46		Вартанов А.В.	II
Бенсон Н. II 45		Бугрова А.Е.	III 38, III	71, III 120	
Бережная Е.В.	II 23, II 72	39, III 130		Варшавский М.А.	IV 45
Береза Н.С.	III 113	Бугрова М.Л.	III	Василевич И.Б.	I 241
Березняк Е.Г.	I 44, I 45	82, III 245		Василевский А.А.	IV 53
Березовский В.А.	III 32, IV 19	Будкевич Р.О.	I 52	Василевский Ю.В.	II 40
Бершицкий С.Ю.	I 307	Буко И.В. III 58		Васильев А.Н.	I 138, II 82
Бинюков В.И.	I 203	Букреева Т.В.	III 40	Васильев В.Б.	I 77, I 274,
Бичан О.Д.	III 58	Булай П.М.	I 312, II 46,	III 185, III 214	
Бобров М.Ю.	II 100	II 47, II 118		Васильев В.Д.	I 34
Бобылёв А.Г.	I 238	Булгаков А.А.	IV 57	Васильев М.М.	III 84
Бобылёва Л.Г.	I 238	Булгаков Н.Г.	III.41	Васильев Н.С.	I 119
Богатырёва Н.С.	I 71	Булойчик Ж.И.	IV 75, IV	Васильев С.А.	III
Богданов И.В.	III 113	101, IV 102			

56, III 218				Головко В.А.	I 173
Васильева А.А.	II			Головченко А.Н.	II 24
143, III 231		Гаврилюк Б.К.	IV 25	Голомысова А.Н.	II 38
Васильева-		Гаврилюк В.Б.	IV 25	Голощапов А.Н.	I 14, I
Вашакмадзе Н.С.	II 30	Гаврина А.И.	III 244	203, I 296	
Вахромеева Т.А.	I 15, I 16	Гаджиев З.И.	I 70	Голубев А.В.	IV 27,
Вахрушева О.А.	III 216	Гаджиева Л.С.	I 69	IV 47, IV 84	
Вашанов Г.А.	I 172, I 256	Гайворонский В.В.	IV 26	Голубева Е.А.	I 204
Вашченко О.В.	IV 23	Гайнутдинов Х.Л.	II 24, II 162	Голубева Е.Н.	I 188
Вдовин В.А.	IV 98	Галегов Г.А.	I 85, I	Голубятников Г.Ю.	III 154, III
Ведунова М.В.	II 100, II	285, III 19		183, III 188, III 193	
128, II 160		Галзитская О.В.	I 74,	Гольшев М.А.	IV 28
Веланский П.В.	III 67	I 92, I 282		Гольдт А.С.	IV 29
Велиева Л.И.	I 58	Галиева А.Р.	IV 89	Гомов Е.Е.	III 97
Великанов Г.А.	I 59	Галкина О.В.	II 33	Гончаренко А.О.	III 81
Величковский Б.М.	II 144	Галль Л.Н.	II 34	Горбачева Е.В.	I 68
Венедиктова Н.И.	I 60	Галль Н.Р.	II 34	Горбачева Л.Б.	III 57
Вериго Е.Н.	III 39	Ганиева Р.А.	III 50	Горбачева О.С.	I 60
Верхлютов В.М.	II 144	Гапеев А.Б.	II	Горбенко Г.П.	I 105
Верхоланцева А.Р.	III 28	154, III 51		Гордеев А.Б.	I 76
Веселов А.П.	III	Гарбузинский С.А.	I 71	Гордлеева С.Ю.	I 280, II 63
108, III 232		Гарипова М.И.	IV 99	Гордова А.Ф.	III 186
Веснин С.Г.	IV 24	Гаррье Ж.	III 196	Горелов А.В.	III 202
Вечтомова Ю.Л.	I 289, II	Гасан А.И.	I 73	Горина С.С.	I 291
28, III 46		Гасанов Г.М.	II 35	Горохов В.В.	II 114
Виноградова Н.В.	IV 27	Гасанов Р.А.	III 50	Гороховатский А.Ю.	I 190
Виноградова Ю.В.	III 228	Гахова Э.Н.	II 60	Горудко И.В.	I 77, III 58
Вихлянецв И.М.	I 238	Гахраманов Ф.С.	III 64	Горшкова Е.Н.	I 78, III 194
Вихорев П.Г.	III 47	Гвоздева Е.Л.	I 120	Горюнов А.С.	I
Вихорева Н.Н.	III 47	Гендель Л.Я.	I 72, I 229	252, III 198	
Владимиров Ю.А.	III 184	Генина Э.А.	III 52	Горючко В.В.	I 183
Воденев В.А.	I 13, I 61, I	Герасимова Л.К.	I 312	Горячев С.Н.	IV 65
137, I 257, I 286		Герасимова М.А.	I 8	Горященко А.С.	II 126, III
Водка М.В.	I 62	Гесслер Н.Н.	III 31	55, III 89, III 205	
Войцехович К.О.	I 169	Гизатуллина А.Н.	II 36	Грачева Л.М.	I 313
Волгушева А.А.	I 63	Гиззаткулов Н.М.	II 133	Грачева М.А.	III 56
Волков В.А.	I 25, I 64	Гиниатуллин Р.А.	II	Гребцова Е.А.	I 79
Волков И.Л.	IV 45	131, II 155		Грехова А.К.	III 57
Волкова Э.В.	II 31, II 119	Гительзон И.И.	II 37	Гречкин А.Н.	I 291
Воловик М.Г.	III 48	Гладкова Н.Д.	III 59, III	Грибков А.Л.	I 137
Вологжанникова А.А.	I 65	110, III 119		Грибкова И.В.	III 56
Волотовский И.Д.	I 66, I 312	Гладковская Н.А.	I 44	Григоренко Б.Л.	I 215, II
Волохина И.В.	I 88	Глазкова Н.А.	I 129	126, III 205	
Волченко Г.А.	III 251	Глибицкий Г.М.	I 73	Григорчик Р.	I 236
Волченко С.Г.	III 251	Глибицкий Д.М.	I 73	Григорьева Д.В.	III 58
Воробей А.В.	III 49	Глухов А.С.	I 20	Григорьева Л.В.	I 259
Воробьев В.Н.	I 67	Глухова О.В.	III 53, III	Григорьева О.А.	I 152
Воробьева Н.С.	III 67	135, III 162		Грин М.А.	III 87.
Воронин М.А.	I 121	Глушкова О.В.	III 180	Гриневич А.А.	I 28, II 39
Воронов И.В.	III 93	Глякина А.В.	I 33, I 74	Гринчук Т.М.	III 9
Воронова В.М.	II 32	Гнеденко О.В.	I 130, I 325	Гриссом П.М.	I 64
Воронова Е.Н.	II 31, II 119	Гоголев Ю.В.	I 291, I 304	Гришанова А.Ю.	I 80
Воронцов И.Е.	I 167	Годжаев Н.М.	I 9, I 75	Гришанова Н.П.	I 108
Вульфийус Е.А.	I 68	Голованова Т.И.	III 54	Гришин Е.В.	IV 53
Выдрякова Г.А.	II 37	Головкин М.В.	I 85, I	Гришина Е.В.	I 81, II
		220, III 19		143, III 231	

Грищенко В.М. 135, I 136	I 103, I	Дашинимаев Э.Б. Дашкевич Н.М.	III 159 II 41	Долотов Л.Е. Домаш В.И.	III 52 I 120, III
Грищенко Е.Р.	III 109	Де Филиппис В.	III 214	76, III 77	
Гришук Е.Л.	I 64	Девяткин А.А.	I 287	Доронин Ю.К.	II 68, II 69,
Громова Л.В.	I 82	Девяткова Н.С.	III 43, III 53,	III 116, III 117	
Гроховский С.Л. I 220, I 285, III 19	I 85, I 219,	III 69, III 162		Дрибинский Б.А.	IV 45
Грудинина Н.В.	I 77	Дегерменджи А.Г.	II 42	Дроботова Д.Ю.	III 226
Груздков А.А.	I 82	Дегерменджи Н.Н.	III 70	Дрозд Е.В. I 77	
Грызунов Ю.А.	III 18	Дегтярев Е.Н.	I 210	Дроздов А.В.	III 78
Губарькова Е.В. 110, III 119	III 59, III	Деев С.М. III 21, III 147		Дромашко С.Е.	I 94, I 250,
Гуда О.В. II 156		Демарева В.А.	II 43	III 128, IV 46	
Гудимчук Н.	I 64	Демин О.В.	II 18, II 21,	Дружинин Е.А.	II 16
Гудков С.В. 37, III 60	II 154, III	II 44, II 45, II 66, II 133		Дубасова Л.В.	III 79
Гужова И.В.	I 187	Демин О.О.	II 18, II 21,	Дубинин М.В.	I 95, I 259
Гуковская А.С.	I 226	II 32, II 45, II 66		Дубровский А.В.	IV 31
Гулиева Р.Т.	I 83, III 61	Демин С.А.	III 72	Дувори С. II 21	
Гулий О.И. I 84		Демо В.И. IV 20		Дудкин С.В.	III 106
Гуляев А.А.	I 113, IV 37	Демухамедова С.Д.	I 70	Дуля Е.В. III 134	
Гуляев Ю.В.	IV 98	Демченков Е.Л.	I 52	Дурыманов М.О.	III 80, IV 79
Гумматова С.Т.	I 153	Денисов А.А.	II 46, II	Духович Ф.С.	III 42
Гурвиц Б.Я.	I 272	47, II 118		Духопельников Е.В.	I 44, I 45
Гуревич С.М.	III 42	Дергузов А.В.	III 73	Дыкман Л.В.	I 84
Гурия Г.Т. II 124		Дерюгина А.В.	III 134	Дынник В.В.	I 96,
Гурский Г.В. 285, III 19	I 85, I	Джамалудинова К.	I 90	II 49, II 59	
Гурский Я.Г.	I 85, III 19	Джафаров А. И.	I 83, III 61,	Дьяконова А.Н.	I 97
Гуртовенко А.А.	I 86	III 64, III 65, III 74		Дюкина А.Р.	III 216
Гусев В.А. I 87		Джафарова А.М.	I 197, I	Дюмаев А.К.	III 23
Гусев Н.Б. I 310		200, III 155		Дячук О.А.	III 168
Гусев Ю.С. I 88		Джафарова Д.Р.	III 50		
Гусейнзаде А.С.	III 62	Джафарова С.А.	II 35, III	Е	
Гусейнов Г.Г.	II 89	61, III 74		Евстифеев А.И.	II 36
Гусейнов Т.М.	III 63	Джелядин Т.Р.	IV 90	Евстюхина Т.А.	I 313
Гусейнова А.А.	III 64, III 65	Дивуури Ш.	II 66	Евтеева Н.И.	III 82, III
Гусейнова С.Я.	III 68	Дидковский Н.А.	III 84	245, III 246	
Гуськова Р.А.	I 119, I 178	Дикусар В.В.	II 48	Евтодиенко Ю.В.	I 226
		Дитятев А.Э.	I 280, II 63	Евтушенко Е.Г.	IV 32
		Дмитриев А.А.	I 158	Егорова А.Г.	I 34
		Дмитриев А.В.	I 91,	Егорова А.С.	III 31
		IV 26, IV 30		Егорова К.В.	IV 47, IV 84
		Дмитриев В.А.	IV 30	Езерская А.А.	III 81
		Дмитриева Г.С.	III 195	Елагин В.В.	III 82,
		Добрецов Г.Е.	III	IV 34, IV 85	
		18, III 222		Еланская И.В.	I 278
		Добрецов С.Л.	IV 16	Елисеева И.А.	I 34, I 92
		Добржанская А.В.	I 270	Емельяненко В.И.	I 65
		Добровольский М.В. III 178		Еремеев С.А.	II 50
		Добрынина Н.Г.	III 28	Еременко З.С.	II 156
		Довженко М.А.	I 38, I 249	Еремин А.Л.	II 51
		Довидченко Н.В.	I 92, I 282	Ерлыкина Е.И.	I 265
		Дойникова А.Н.	I 93	Ермаков А.А.	II 53
		Докрунова А.А.	IV 33	Ермаков А.М.	III 83, III 84
		Докукин А.А.	IV 69	Ермаков Ю.А.	I 99, I
		Долгачева Л.П.	I 96, II 49	189, I 218	
		Долгих Д.А.	I 34, I	Ермакова Д.Э.	III 87
		228, III 75		Ермакова Е.А.	I 57, I 98, I
		Долинская Е.В.	III 54		

Д

Д.В.Рисник	III 197				
Дегтярева О.В.	I 290, III 71				
Давлетшина Л.Н.	I 263				
Давлетшина М.Р.	I 66				
Давыденко Д.В.	III 170				
Давыдова Г.А. 154, IV 29	II				
Давыдова Л.А.	I 89, III 67				
Дадашев М.З.	III 68				
Данилов А.А.	II 40				
Дарашкевич Л.О.	I 54				
Дарашкевич О.Н.	I 54				
Даринский А.А.	I 212, I 292				
Даутова Н.Р.	III 15				

182, I 291, I 304		30, III 82, III 159, III 244, III 245, III 246, IV 34, IV 85		Зорин В.П.	III 98, III 99, III 196
Ермакова О.Н.	III 84	Загидуллин В.Э.	I 108	Зорина С.В.	I 183
Ермилова М.Э.	II 148	Загогин А.П.	IV 75, IV 101, IV 102	Зорина Т.Е.	III 98
Ермолаев В.С.	II 16	Зайцев А.В.	I 64, I 109, I 253	Зоров Д.Б.	I 276
Ероина Т.Б.	I 310	Зайцев Б.Д.	I 84	Зотов В.С.	III 109
Ерофеева Е.А.	III 85	Зайцев К.С.	II 55	Зубков А.С.	I 210
Ерохин В.Н.	III 86	Зайцева Г.В.	I 110, I 193	Зубов И.И.	II 57
Ерошенко Л.В.	I 326, II 52	Заичкина С.И.	III 216	Зуев Ю.Ф.	I 57, I 98, I 112, I 121, I 295, I 304
Ершов А.П.	I 123	Зак П.П.	II 129	Зуза В.А.	III 189
Ершов Н.И.	I 167	Закаров А.М.	II 89	Зуза С.Г.	III 189
Ершова А.В.	IV 36	Закирьянов Ф.К.	I 327	Зыкова А.В.	II 129
Есимбекова Е.Н.	II 81, III 25	Закладная А.В.	III 158		
Есипова Н.Г.	I 21, I 209, I 300, III 164, IV 92	Залутски М.Р.	III 210	И	
Ефименко И.А.	I 134, III 57	Замятнин А.А.	IV 35	Ибрагимов Р.И.	I 115, IV 99
Ефимов А.В.	I 49, I 51, I 76, I 100, I 132	Зарицкий А.Р.	I 110, I 193	Ибрагимова Л.Г.	III 113
Ефимов В.Н.	II 162, III 252	Зароченцева И.А.	III 33	Ибрагимова М.Я.	I 116
Ефимова С.С.	I 101	Захаркина Н.Л.	I 154	Иваницкий Г.Р.	II 58,
Ефременко А.В.	III 87, IV 52	Захаров А.В.	II 56	IV 39, IV 40	
Ефременко Е.Н.	I 125	Захаров Г. I 91		Иванков Д.Н.	I 71
Ефремов Ю.М.	IV 33	Захаров С.Д.	III 95	Иванкова Ж.Е.	I 204
Ещенко Н.Д.	II 33	Захаров Ю.Н.	IV 36	Иванов А.В.	III 225
		Захарова Е.Т.	I 274, III 214	Иванов А.С.	I 130, I 325, IV 41, IV 42
Ж		Захарова Л.Я.	I 121	Иванов Б.Н.	I 118
Жадан А.П.	I 65, III 121	Захарова Н.М.	I 20, I 111,	Иванов И.И.	I 119, I 178, I 263, I 264
Жалимов В.К.	II 130	I 262, I 299, II 154		Иванов К.Ю.	III 100, III 171, III 235
Жалялов А.С.	III 88	Захарченко А.В.	I 113, IV 37	Иванов О.А.	I 120, III 76, III 77
Жанг К.Ч.	I 48	Захарченко М.В.	I 113, IV 37	Иванов С.В.	II 59, II 78
Жао И.	I 48	Захарченко Н.Л.	I 57, I 112	Иванова А.В.	III 227
Жармухамедов С.К.	I 278	Заядан Б.К.	IV 65	Иванова А.Е.	I 95, III 31
Жданов Р.И.	I 93, I 102, I 116, III 218	Здобнова Т.А.	III 21, III 147	Иванова В.П.	I 117
Жердева В.В.	III 89	Зейналлы Э.М.	III 63	Иванова Е.П.	I 267
Жерелова О.М.	I 103, I 135, I 136	Зейналова Н.М.	I 153	Иванова И.П.	III 154, III 183, III 188, III 193
Жигачева И.В.	I 104	Земелько В.И.	III 9	Иванова Н.А.	III 57
Жидконожка М.Б.	IV 15	Зенин В.В.	III 9	Иванова-Смоленская И.А.	IV 100
Жижина Г.П.	III 42	Зефиоров А.Л.	II 56, II 105, II 115	Ивановская Н.П.	I 54
Житняковская О.А.	I 105	Зиганшин Р.Х.	II 60	Ивашина Т.В.	III 55
Жорина Л.В.	III 90	Зиннатуллина Э.Т.	III 218	Ивашкина Л.И.	II 53
Журавлев А.И.	I 106, III 91, III 255	Зиновьев С.В.	III 96	Ивлев Е. Д.	III 101
Журавлев Г.И.	III 92	Зинченко А.А.	I 213	Ивличева Н.А.	II 60
Журавлева З.Н.	II 53	Зинченко В.П.	I 96, II 49,	Игнатов О.В.	I 84
Журавская А.Н.	III 93	II 59, II 78		Игнатова А.А.	III 190
Журкин Д.В.	I 107	Зленко Д.В.	IV 38	Игнатъева Н.Ю.	I 154
		Злобина К.Е.	II 124	Игольникова Е.С.	I 200
З		Змиевской Г.Н.	III 90	Идиятуллин Б.З.	I 121
Забрейко С.А.	III 76, III 77	Знобищева А.В.	III 97	Иевлева Е.В.	I 120
Заварыкина Т.М.	III 42	Зобнина В.Г.	IV 51	Измоденова С.В.	I 122, I 161
Завьялова В.В.	II 54, III 94	Зобова А.В.	II 164	Ильина Н.Б.	I 34
Загайнова Е.В.	III 21, III 261, II 101	Золезе Дж.	I 93		
		Золотарева Е.К.	I 62, I 114,		
			I 261, II 101		

Ильина С.Е.	III 113	Канделинская О.Л.	III 109	III 116, III 117, III 143
Ильина Т.М.	I 39	Канев И.Л.	I 33	Кирпичников М.П.
Ильичева И.А.	I 219, I 220	Кануников И.Е.	II 11	I 228, III 23, III 75, IV 53
Ильяш М.Ю.	I 211, I 212	Каплан А.Я.	III 72	Кирьяк Е.Ю.
Иляскин А.В.	I 123	Карабут М.М.	III 59, III 110, III 119	III 118
Имашева Е.С.	III 23	Караваева О.А.	I 84	Киселева Е.Б.
Инюшин В.М.	III 102	Карамазин С.С.	II 41	III 159
Ионенко И.Ф.	III 14, III 15, III 103	Каранов А.М.	II 53	Кисляк С.В.
Исаева М.П.	IV 58	Карасев В.А.	IV 44	I 138
Исакина М.В.	II 61	Каргатов А.М.	I 132	III 21, III 140, IV 34
Исмаилов А.Д.	I 15,	Карговский А.В.	I 48, I 133	Клейменов С.Ю.
I 16, I 125		Карелина Т.А.	II 21, II 66	I 310
Исмаилова Л.И.	I 30, I 126	Кармен Н.Б.	II 89	III 246
Исмаилова Ш.Р.	I 124	Карнаухов А.В.	I 266, II 67	Клешнина М.С.
Истрате Е.Н.	III 144	Карнаухов В.Н.	I 266	III 21
Ичеткина А.А.	III 104	Карнаухова Е.В.	I 266, II 67	Климов В.В.
Июдун В.С.	II 162	Карнаухова Н.А.	I 266	III 139
		Карп В.П.	II 158	Климова Т.П.
		Карпов Д.И.	I 123	III 18
		Карташов С.И.	I 200, III 155	I
		III 94, III 120	II 54, II 71,	Кличханов Н.К.
		Картыжова Л.Е.	III 109	I 56, I 197,
		Касаткин М.Ю.	II	I 270
		134, III 111		Ключ Б.П.
		Касьяненко Н.А.	I 134,	IV 48
		IV 45, IV 91		Князев А.В.
		Касьянов А.С.	I 167	III 144, III 120
		Касян Н.А.	IV 23	Князева Е.Л.
		Катаев А.А.	I 47, I 103,	I 65, III 121
		I 135, I 136		III 23, II 72
		Катаев В.Е.	I 121	Ковалева В.Д.
		Катанов Д.Ш.	I 20	I 117
		Катина Н.С.	I 34	Ковалева З.В.
		Катичева Л.А.	I 13, I 137	IV 96
		Кашеверов И.Е.	I 68	Коваленко Е.И.
		Кашулин П.А.	III 112	I
		Кашеева П.Б.	I 15, I 16	312, III 122
		Квашнина О.П.	I 147	Коваленко И.Б.
		Квитко О.В.	I 94, IV 46	I 97, I 142, I 297
		Кедров А.И.	IV 47	Ковальчук С.В.
		Керимов К.Т.	III 64, III 65	I 313
		Керимова Н.К.	III 64	II
		Киенко В.М.	III 32, IV 19	Ковальчук С.И.
		Ким В.П.	IV 98	I 276
		Ким К.Х.	I 109	IV 57
		Ким Ю.А.	I 165, III 253	III
		Киржанов Д.В.	II 10	Коварский А.Л.
		Кириенко К.В.	II	200, IV 22
		68, III 116		Ковш Е.В.
		Кирилина И.В.	III 113	III 122
		Кирилина Т.В.	III 114	Ковязина И.В.
		Кириллин М.Ю.	III 7, 115	II 73, II 74
		Кирилов Г.К.	I 105	Коган Б.Я.
		Кирилова Е.М.	I 105	III 106
		Киркина А.А.	II 68, II 69,	Кожина Е.А.
				III 248
				Кожокару А.Ф.
				III
				123, III 124
				Козаченко А.И.
				III 42
				Козлов М.В.
				I 140, III 125, III 247
				Козлова Н.М.
				I 271
				Козулева М.А.
				I 118
				Кокшаров Ю.А.
				IV 41,
				IV 97, IV 98
				Колесников М.П.
				I 289
				Колесников С.С.
				I 152, I 254
				IV 21
				Колесникова А.С.
				IV 74
				Колесникова Е.В.
				II 75
				Колобов А.В.

К

Ковалева Т.А.	I 141	Ковальчук А.В.	II
Кабанов А.В.	I 127, I 146	Ковальчук С.И.	I 276
Кабанова Н.В.	III 77	Ковальчук С.Н.	IV 57
Кадина Е.Ю.	II 62	Коварский А.Л.	III
Кадымова Ф.А.	I 17, IV 9	200, IV 22	
Казаков А.С.	I 65	Ковш Е.В.	III 122
Казаков В.В.	IV 13	Ковязина И.В.	II 73, II 74
Казакова Л.И.	IV 43	Коган Б.Я.	III 106
Казанцев В.Б.	I 280, II 63	Кожина Е.А.	III 248
Казаринов К.Д.	III 105	Кожокару А.Ф.	III
Казачкина Н.И.	III	123, III 124	
106, III 158		Козаченко А.И.	III 42
Казимирова Е.И.	II 66	Козлов М.В.	I 140, III 125, III 247
Каламкаргов Г.Р.	II 8, II 64, III 38, III 39, III 130	Козлова Н.М.	I 271
Калацкий Ю.М.	I 281, II 88	Козулева М.А.	I 118
Калачёва Н.В.	III 112	Кокшаров Ю.А.	IV 41,
Калашникова И.В.	III 40	IV 97, IV 98	
Калебина Т.С.	I 38, I 128, I 249	Колесников М.П.	I 289
Калинин В.А.	I 129	Колесников С.С.	I 152, I 254
Калинин В.Н.	I 253	Колесникова А.С.	IV 21
Калиновская О.В.	III 107, III 157, III 171	Колесникова Е.В.	IV 74
Калинцева Я.И.	II 65, IV 36	Колобов А.В.	II 75
Калниния И.	I 105		
Калужский Л.А.	I 130		
Кальвасер И.Б.	IV 13		
Кальясова Е.А.	III 108		
Камалетдинова Т.Р.	I 131		
Каменская Э.В.	III 48		
Каменский В.А.	I 154, III 115, III 183, III 188, IV 34		
Каменский П.А.	I 166		
Камзолова С.Г.	IV 90		

Коломийцева И.К.	I 55, I 143, I 231, I 299, III 151	Косых И.А.	I 180	Кузнецов В.А.	I 227
Колычев А.П.	I 144	Котов Н.В.	II 36	Кузнецов М.Б.	II 75
Кольтовер В.К.	II 76, III	Котова Е.А.	I 276, IV 12	Кузнецов С.С.	II
126, III 127, IV 49		Котова Н.В.	I 190, I 258	16, III 154	
Кольцова С.В.	I 236	Котова П.Д.	I 152	Кузнецова И.Е.	I 84
Колядко В.Н.	I 7	Котова Я.Н.	I 7	Кузнецова И.М.	IV 95
Командиров М.А.	II 77	Кофанова О.А.	II 80	Кузнецова М.М.	III 246
Комар А.А.	III 222	Кочарли Н.К.	I 153	Кузнецова С.М.	I 165, I 221
Комаров В.М.	I 127, I 146	Кочеткова Н.В.	I 302, II 61	Кузьменко А.В.	I 166
Комаров С.М.	I 183	Кочуева М.В.	I 154	Кузьменков А.И.	IV 53
Комелина Н.П.	I 20, I 145	Кошелев В.Б.	I 175	Кузьмин П.И.	I 37
Кондратьев М.С.	I 146	Кравацкая Г.И.	I 155	Кузьмич А.И.	IV 79
Кондрашева И.Г.	III 169	Кравцкий Ю.В.	I 155	Куканова О.В.	III 11
Кондрашова М.Н.	I 113, IV 37	Кравченко И.Е.	III 98, III 99	Кукарских Г.П.	I 63
Конева И.И.	IV 46	Кравченко С.В.	III 28	Кукурулл-Санчес Л.	II 45
Конева О.Ю.	I	Крамарова Л.И.	II 60	Кукушкин А.К.	II 10
250, III 128		Крамор Р.В.	I 186	Кукушкин Н.И.	II 130
Коннова Т.А.	I 112	Красильников П.М.	I 156, I	Кулабухова К.С.	I 154
Коновалов А.И.	III 129	157, I 185, I 218, I 278		Кулагина Т.П.	III 51
Коновалов К.А.	IV 32	Красников Г.В.	III 114, III	Кулагова Т.А.	I 312
Коновалова С.А.	I 149	133, III 223		Кулаков С.В.	II 156
Кононихин А.С.	III 39	Краснов Г.С.	I 158	Кулаковский И.В.	I 167
Кононов А.В.	II 59, II 78	Краснова М.А.	I 110, I 193	Кулева Н.В.	III 47
Кононов А.И.	IV 45	Кратасюк В.А.	I 159, II 81,	Куликова И.Ю.	I 147
Константинова Н.А.	I 147	III 25, III 221		Кулиш. А.В.	II 82
Константинова Т.С.	III	Крейнина М.В.	III 227	Кулько С.В.	I 168
38, III 130		Кременцова А.В.	III 86	Кульчицкий В.А.	II 46, II 118
Контаров Н.А.	I 27, I	Кременчугская И.Г.	III 43	Кумариану Е.	III 210
148, I 237		Кренделева Т.Е.	I 63	Куранова М.Л.	III 137
Конюхов И.В.	III 131	Креславский В.Д.	II 161	Курбанова И.М.	III 62
Корватовский Б.Н.	II 114	Крестинина О.В.	I 226	Курганов Б.И.	I 46, I 310
Корепанова Е.А.	I 245	Кривандин А.В.	I 296	Курилова Л.С.	I 169
Корзюк О.В.	III 76	Криворотов Д.В.	I 205	Курицын И.И.	I 48
Кормакова П.А.	IV 98	Крикунова Н.Н.	I 104	Куроптева З.В.	III 20
Корнев Д.Б.	IV 30	Крицкий М.С.	I 289, II	Курочкин В.Е.	I 170
Королёв В.Г.	I 313	28, III 46		Курочкин И.Н.	IV 32
Королькова Ю.В.	IV 53	Крот В.И.	I 312	Курталиев Э.Н.	III 138
Коротков Е.В.	I 283,	Крупянский Ю.Ф.	I 160	Кутузов Н.П.	I 171
IV 28, IV 50		Крутецкая З.И.	I 169, I 202	Куцый М.П.	III 139
Коротков С.М.	I 149	Крутецкая Н.И.	I 169, I 202	Кучеренко М.Г.	I 122, I 161
Короткова М.А.	IV 50	Кручинин Н.Ю.	I 122, I 161	Кушнерева Е.В.	III 238
Корпусов Е.В.	III 108	Крылов А.К.	I 162		
Корягин А.С.	III	Крылов А.С.	I 116	Л	
24, III 239		Крылов В.Н.	III 134, III	Лабынцева О.М.	III
Корягина Е.А.	II 79	135, III 240		11, III 201	
Корякина Е.В.	I	Крюков А.Ю.	IV 13	Лавриненко И.А.	I 172, I 256
150, III 132		Крюкова Е.А.	III 23	Лаврухина О.Г.	I 63
Косевич М.В.	IV 23, IV 51	Кряжев Д.В.	III 104	Лаженицын А.И.	III 84
Космачевская О.В.	III	Ксенофонтова О.И.	I 163	Лазарев В.Ф.	I 187
109, III 250		Кубасова Н.А.	I 307	Лакомкин В.Л.	III 226
Костевич В.А.	III 58, III	Кувандыкова А.Ф.	III 141	Лакионова А.А.	I 277
185, III 214		Кувичкин В.В.	I 164, IV 71	Ландер А.В.	II 86
Костерин С.А.	I 151	Кувичкина Т.Н.	III 136	Лани Я.	III 23
Костецкий Э.Я.	III 67	Кудрявцева А.В.	I 158	Ланкин В.З.	III 250
Костылева Е.И.	I 279, I 316	Кудряшова И.Б.	I 38, I 249	Лапина В.А.	III 49
		Кудряшова К.С.	IV 52, IV 53		

Лаптева Ю.С.	I 65	Лукашев Е.П.	I 108, I	248, III 249	
Лапшин Г.Д.	III 89	278, II 136, III 23		Малашенкова И.К.	III 84
Лебедева А.В.	II 83	Лукьянец Е.А.	III 190	Малеханова Е.А.	III
Лебедева Е.А.	I 173	Лукьянов С.А.	III 30, III	21, III 147	
Левадный В.Г.	I 174	245, III 246		Малиновская С.Л.	II
Левашов М.И.	III 32, IV 19	Лукьянов В.И.	I 179	16, III 165	
Левин Г.Я.	I 320, 321, 322	Лукьянов К.А.	III 245	Малкин В.М.	I 183,
Левин П.П.	II 8	Лукьянова Л.Д.	I 60	IV 61, IV 62	
Левицкий Д.И.	I 26	Лунева О.Г.	I 229	Маломуж А.И.	II 93
Левич А.П.	II 84, III 41	Лунин В.Ю.	I 273	Малыгин А.В.	I 184
Леканова Н.Ю.	III 21, III	Лунин С.М.	III 180	Мальцева Е.Л.	III 148
140, III 147		Луо К.	I 48	Мамаев С.В.	III 34
Леонова В.Б.	III	Лучинин В.В.	IV 44	Мамедова Т.А.	I 83, III 61
200, IV 22		Лушиников С.Г.	I 91	Мамирова Г.Н.	III 102
Леонова Е.М.	I	Лыжко Е.В.	II 96	Маммаев А.Т.	II 94, III
150, III 132		Лысенко Е.П.	II 87	149, III 150	
Леонова И.В.	IV 84	Лысенко Ю.А.	I 180	Мамонов А.А.	I 281
Леонтьева М.В.	III 121	Лысцов В.Н.	III 145	Мамонов П.А.	I 185
Леонтьева Т.В.	I 205	Лысякова Л.А.	IV 45, IV 91	Манохин А.А.	II 154
Лермонтова С.А.	III 140	Лэ Тхи Ким Ань	IV	Манохина И.А.	I 266
Летуа С.Н.	III 141	75, IV 101		Манькова А.А.	I 48
Ли Кисун	I 175	Лю Я.	II 66	Маракулина К.М.	I
Лидохова О.В.	I 208	Любарцев А.П.	I 246	186, III 125	
Лизьякина А.Д.	I 176	Любимов В.Ю.	II 161	Маргулис Б.А.	I 187
Лиманская О.Ю.	IV 54	Любицкий О.Б.	III 113	Маренный А.М.	III 16
Лиманский А.П.	IV 54	Людина А.Ю.	I 204	Маркевич Л.Н.	I 55, I
Липец Е.Н.	III 56, III 71,	Людникова Т.А.	II 28	143, III 151	
III 142, III 218		Лянгузов А.Ю.	II 88	Маркелов Д.А.	I 212
Липова В.В.	III 11	Лященко А.К.	IV 60	Маркосян К.А.	I 46
Липчинский А.А.	II 85			Мартинович Г.Г.	I 188, I
Лисецкий Л.Н.	IV 23	М		311, I 312	
Лисица А.В.	IV 55			Мартинович И.В.	I 188
Литовка И.Г.	III 32, IV 19	Магомедова М. Х.-М.	III	Мартиросова Е.И.	II 95
Лихацкая Г.Н.	IV 56, IV	146, III 149		Мартусевич А.К.	III 152
57, IV 58, IV 59		Маевский Е.И.	I 81, I	Мартынович Е.Ф.	IV 74
Лихачев И.В.	I 177	113, II 89, II 143, III 34, III 84, III		Марукович Н.И.	I 189
Лобанов А.В.	III 195	231, IV 37		Марченко И.В.	III 40
Лобанов М.Ю.	I 282	Мазалецкая Л.И.	I	Марченко Н.Ю.	I 190
Лобанок Е.С.	I 241	181, III 242		Марченков В.В.	I 190, I 258
Лобкаева Е.П.	III 11, III 53,	Мазейка А.Н.	III 67	Марченков Н.С.	II 54, II 71,
III 69, III 162, III 171, III 201		Мазуров М.Е.	II 90, II 91	III 94, III 120	
Лобышев В.И.	II 68, II 69,	Макарова А.А.	IV 85	Маряхина В.С.	I 191
II 122, II 132, III 116, III 117, III 143		Макарова Е.Л.	I 141	Масалов И.С.	III 13
Лобышева Н.В.	I 260	Макеев В.Ю.	I 167	Масимов Э.А.	III 153,
Ловягина Е.Р.	I 264	Макеева В.Ф.	I 310	IV 63, IV 64	
Лозина Т.А.	II 86	Макеева Е.Н.	I 194	Маслаков А.С.	I 192
Лойко Н.Г.	I 160	Макинтош Дж. Р.	I 64	Масленникова А.В.	I 154, III
Локтюшкин А.В.	I 119, I 178	Маклыгин А.Ю.	I 175	30, III 154, III 183, III 188, III 193	
Ломадзе Н.	IV 91	МакМюррей М.Д.	I 189	Маслова Г.Т.	IV 75, IV
Ломакина Г.Ю.	III	Максимов Г.В.	I 131, I	101, IV 102	
144, III 163		171, I 228, I 230, I 236, I 251, II 27		Маслова М.Н.	I 110, I 193
Лопаткина Н.В.	III 43	Максимов Е.Г.	I 247, I	Масулис И.С.	I 194
Лу Я.	II 21	278, II 92		Матвеев В.В.	I 184
Луговцов А.Е.	I 175	Макшакова О.Н.	I 182	Матвеева Н.Б.	I 195, I
Луканина Ю.К.	I 186	Маланина Н.В.	I 78	196, II 138	
Лукаткин А.С.	III 206	Малахов М.В.	III 191, III	Маторин Д.Н.	IV 65

Матюшенко А.М.	I 26	Мищенко А.А.	I 204	Н	
Махмудова Х.М.	I 197, I	Моан Й.	II 142	Нагиба В.И.	III 107, III
200, III 155		Могилевская Е.А.	II 153	157, III 171	
Махмутов Б.Б.	III 253	Модестова Ю.А.	III 163	Наглер Л.Г.	III 42
Махнева З.К.	I 247	Можеров А.М.	II 65	Нагорская Т.П.	III 78
Махортых С.А.	II 96, III 73	Моисеева В.С.	I 326	Надточенко В.А.	III 82, IV 34
Мачнева Т.В.1	III 56	Мойсенович М.М.	I 253	Найдов И.А.	I 118
Мачулин А.В.	I 34, I 267	Мокерова Д.В.	II 102	Наквасина М.А.	I 208, IV 15
Машковцева Е.В.	I 198, I	Молдавер М.В.	III 164	Намиот В.А.	I 21, I 209 I
214, II 57		Молоканов Д.Р.	III 178	300, III 167, IV 67, IV 68	
Медведев Д.А.	I 123	Молотковский Ю.Г.	I 105	Нараян Т.	I 307
Медведев Л.Н.	I 159	Молчанов П.Г.	II 46, II 47	Нарциссов Я.Р.	I 176, I
Медведев С.С.	II 85	Мольнар А.А.	I 130, I 325	198, I 214, I 260, I 293, II 26, II 55,	
Медведев Я.И.	III 157	Монич В.А.	II	II 57, II 80, II 107	
Медведева С.Е.	II 37	16, III 165		Насыбуллина Э.И.	III 109
Медведева Ю.А.	I 167	Морнев О.А.	II 103	Наумова Е.В.	III 168
Медвинский А.Б.	II 97	Мороз В.В.	II 89	Нгуен Тхи Тьук	I 315
Меерович И.Г.	III	Морозов В.Н.	I 33	Невежин Е.В.	III 191
106, III 158		Морозов И.Д.	III 240	Негинская М.А.	II 72
Межевика Л.М.	I 306, I 199	Морозова Г.И.	III 166	Негримовский В.М.	III 190
Мейланов И.С.	I 56, I 90, I	Морозова Д.В.	III 28	Негуляев Ю.А.	III 47
197, I 200, III 155		Морошкина Е.Б.	I 205, I 227	Неделина О.С.	I 210
Мелешина А.В.	III 159	Москалева Е.Ю.	III 169	Недзведь А.М.	I 54
Мельник Б.С.	I 201, I 222	Москаленко А.А.	I 247	Недопёкина С.В.	I 315
Мельник Т.Н.	I 201	Москаленко Ю.Е.	III 13	Неелов И.М.	I 211, I
Мельников А.Г.	III 168	Москвин А.Н.	I 223	212, I 292, I 318	
Мельников Г.В.	III 168	Мостовая О.А.	I 304	Некрасов А.Н.	I 213, I
Мельникова А.А.	III 28	Мосягина А.Р.	II 148	228, IV 69	
Мельницкая А.В.	I 202	Мотовилов К.А.	I 124, I	Некрасов Н.А.	I 214
Менделеева Л.П.	III 56	326, II 50		Некрасова Е.И.	III 169
Меньшов В.А.	III 160	Мохова Е.Н.	I 298	Некрасова М.М.	IV 18
Метелкин Е.А.	II 113, II	Мочалова А.Е.	III	Некрасова О.В.	IV 53
133, II 141		24, III 239		Некрасова Т.А.	III 170
Микурова А.В.	III 247	Мошкова А.Н.	I 265	Немухин А.В.	I 215, II
Милованов А.В.	II 98, II 99	Мубаракшина Э.К.	III 179	126, III 205, III 236, III 237	
Миль Е.М. I 203		Музафаров Е.Н.	I	Немцева Е.В.	I 8
Мильчевский Ю.В.	I 300	165, III 253		Немцов О.Ю.	I 216, I 224
Минакова Е.А.	III 244, III	Муранов К.О.	I 206, I 310	Неруш В.Н.	I 13, I 217
245, III 246		Муранова Л.Н.	II 24, II 162	Нестеренко А.М.	I 218
Мионов А.Ф.	III 87	Мурач Е.И.	I 207, III 24	Нестеркина И.С.	IV 74
Мионов В.	II	Мурашев А.Н.	II 89, II	Нечипуренко Д.Ю.	I 219, I 220
126, III 205		143, III 231		Нечипуренко Н.И.	IV 75, IV
Мионова Г.Д.	I 40, I 60	Мурзин Н.В.	III 145	101, IV 102	
Мионова Е.А.	IV 29	Мурзина Г.Б.	II 104	Нечипуренко Ю.Д.	I 219, I 220
Мирошников А.И.	III 161	Мурина В.Н.	I 222	Низомов Н.	III 138
Мирошниченко Е.В.	I 44	Мурина М.А.	III 203	Никанорова Е.А.	III 100, III
Митрофанов В.Н.	III 152	Муртазаева Л.А.	IV 54	107, I III 57, III 171, III 235	
Митрошина Е.В.	II 100	Мухамедзянов Р.Д.	II 105	Никитин А.М.	I 85, III 19
Михайленко Н.Ф.	II 101	Мухарамова С.С.	II 73	Никитин А.П.	II 158
Михаловский И.С.	IV 66	Мухартова Ю.В.	III 209	Никитин С.Ю.	I 175
Михеева Г.А.	III 215	Мухина И.В.	II 65, II 79,	Николаев Е.Н.	III 39, IV 70
Михельсон В.М.	I 317	II 100, II 106, II 128, II	160, IV 36	Николаев Г.М.	III 172
Мишагина М.Н.	III	Мухтарова Л.Ш.	I 291	Николаев Д.В.	II 40
53, III 162		Мысягин С.А.	I 13, I	Николаева Т.И.	I 221
Мишарина Т.А.	I 104	217, III 140		Николаас Т.	II 21, II 66
Мишина Н.М.	III 30	Мясоедов Н.А.	I 324		

Никольский Е.Е.	II 73, II 93, II 108, II 140, III 229	Орлова Ю.	II 52	Перетягин С.П.	III 152
Никольский Н.Н.	III 9, III 36	Орлова Ю.В.	I 324	Пермяков Е.А.	I 65, I
Никонов С.В.	I 222	Осинникова Д.Н.	I 227	232, III 121	
Никонова Ю.А.	III 173	Осипов А.В.	I 68	Пермяков С.Е.	I 65, III 121
Никулин А.Д.	I 222	Осипов А.Н.	I 245, III	Пермякова М.Е.	I 65
Новиков В.В.	II	57, III 156, III 184, III 227		Першин С.М.	I 233, I 235
109, IV 71		Осипов А.П.	III 211	Песина Д.А.	I 44
Новиков В.Э.	III 174, III	Осипов В.А.	IV 65	Пестов Н.А.	IV 52
175, III 176		Острроверхова Т.В.	I 228	Петренко Н.	II 131
Новиков Г.В.	IV 72	Островская Ю.В.	III 110	Петров А.М.	II 56, II 115
Новикова О.Д.	I 89, IV 58	Островский М.А.	I	Петров В.А.	III 227
Новикова Я.С.	III 177	206, III 228		Петров К.А.	II
Новицкая Г.В.	III 178	Остроумова О.С.	I 101	140, III 229	
Новицкий Ю.И.	III	Ошевенский Л.В.	III	Петров О.Ф.	III 84
178, III 207		134, III 135		Петрова Т.А.	II 88
Новодережкин В.И.	II 164			Петрович В.А.	I 271
Новоселов В.И.	III 179	П		Петровская Л.Е.	III 23, III 75
Новоселова Е.Г.	III 180	Павликов А.И.	III 246	Петухов С.В.	IV 20, IV 76
Новоселова Н.Ю.	I 223	Павлин С.В.	II 113	Печуркин Н.С.	II 116
Новоселова Т.В.	III 180	Павлов Д.В.	III 239	Пешехонов В.Т.	I 313
Нокс П.П.	I 108	Павлова Л.А.	III 113	Пигалева Т.А.	I 234
Норик В.П.	I 24, I	Пальмина Н.П.	III 148	Пикардо Ц.	II 45
216, I 224		Панасенко О.М.	I 77, III	Пикуленко М.М.	III 186
Носикова И.Н.	III 113	58, III 185		Пинелис В.Г.	I 40
Нуйдель И.В.	II 110, 121	Панина Л.К.	I 31,	Пиняскина Е.В.	II 117, III
Нурминский В.Н.	IV 74	III 33, IV 7		149, III 187	
Нурминский Е.А.	IV 56, IV	Панищев О.Ю.	III 72	Пискунова Г.М.	III 114, III
57, IV 58, IV 59		Панов А.В.	III 252	133, III 223	
Нуруллин А.Г.	II 111, III	Панова И.Г.	III 224	Письман Т.И.	III 215
181, IV 73		Пантелеев М.А.	I 7, I 225, II	Питлик Т.Н.	II 46, II
Нуруллин Л.Ф.	II	38, II 41, III 88, III 142, III 218		47, II 118	
112, III.229		Панченко Л.А.	I 220	Пищальников Р.Ю.	I 235, IV 77
Нуруллин Р.Г.	III 181	Парамонова Н.М.	I 277	Платонова А.А.	I 236
		Парин С.Б.	II	Плащина И.Г.	I 186, II 95
		121, IV 18		Плескач Н.М.	I 317
О		Паровичникова Е.Н.	III 56	Плескова С.Н.	III 194
Обыденный С.И.	I 225	Парфенюк С.Б.	III 180	Плеханова А.С.	III 188
Ованесов М.В.	II 1	Паршина Е.Ю.	I 229, I 230	Плотников Е.Ю.	I 276
Оджавердиева С.Я.	IV 63, IV 64	Паршинцев А.А.	IV 41	Плюснина С.Н.	III 242
Одиноква И.В.	I 226	Парьева Е.С.	I 37, I 269	Поварницына Т.Н.	I 201
Озolina Н.В.	IV 74	Паскевич С.И.	II 154	Погарская И.В.	I 148, I 237
Озолинь О.Н.	I 179, I	Патапович М.П.	IV	Погодин В.Ю.	IV 13
194, I 240		75, IV 101		Погодина Л.С.	II 129
Округин Б.М.	I 211	Паточка Г.Л.	III 100, III	Погорелов А.Г.	II
Окунева А.Д.	I 238	107, III 235		143, III 231	
Ольшевская В.А.	I 253	Пашинская В.А.	IV 23	Погорелова В.Н.	II
Олюнина Л.Н.	III 182	Пашкевич С.Н.	III 141	143, III 231	
Омельченко А.И.	IV 80	Пашковская И.Д.	IV 75, IV	Погосян С.И.	II 31, II 119
Онойко Е.Б.	I 114, I 242	Пашенко В.З.	I 108, I	Погромская Я.А.	III 189
Опарина Н.Ю.	I 158	247, I 278, II 92, II 114		Подлубная З.А.	I 238
Орлов А.А.	II 89, III 34	Перегудов А.С.	III 18	Подорванов В.В.	I 239, I 242
Орлов С.Н.	I 230, I 236	Перепелкина Л.Н.	I 143	Позднякова А.С.	III 190
Орлова А.Г.	III 18, III 30,	Перепелкина Н.И.	I 231	Покровский А.Н.	II 120
III 154, III 183, III 193		Перепечаева М.Л.	I 80	Покусаева В.О.	I 240
Орлова О.В.	I 129, I 257			Полевая С.А.	II 43, II
				121, IV 13, IV 18	

168, IV 83		Синельникова И.А.	IV 27, IV 47, IV 84	Соколовский И.В.	I 282
Санникова Е.П.	I 267	Синицын Д.О.	I 160	Солдатов Е.С.	IV 41
Санталова И.М.	II 154	Синицына Ю.В.	III 108	Соленов Е.И.	I 123
Сантер С.	IV 91	Синцов М.Ю.	I 269	Соловей А.Б.	II
Сапожникова А.Д.	III 28	Сиренко В.В.	I 270	Соловьева А.Б.	III
Сапронов Н.С.	I 223	Сироткина М.А.	III 245, IV 34, IV 85	244, IV 34	
Сапун А.С.	IV 46	Сирош А.А.	I 43	Соловьева Т.Ф.	I 89, IV 58
Сарис Н.-Э.	I 43	Скавуляк А.Н.	III 97	Сомова Л.А.	III 215
Сафаргалева Е.А.	I 183	Скачовски А.	II 166	Сорокин А.А.	IV 90
Сахарнова Т.А.	II 128	Скворцова Л.С.	III 252	Сорокина С.С.	III 216
Свербиль В.П.	III 222	Склифас А.Н.	II 130	Сорочкина А.И.	I 276
Свердлов Е.Д.	IV 79	Скоринкин А.	II 7, II 36, II 131	Сотников О.С.	I 277
Свиридова-Чайлахян Т.А.	II 154	Сластникова Т.А.	III	Софронова В.Е.	III 217
Свирин В.И.	IV 76	210, IV 79		Сочивко Д.Г.	I 170
Свиряева И.В.	III 250	Слобожанина Е.И.	I 271	Сошитова Н.П.	II
Седанкин М.К.	IV 24	Случанко Н.Н.	I 26	Сошкинова Ю.М.	IV 80
Сейфуллина Н.Х.	I 108	Сметанина М.В.	III 43	Спешилов Г.И.	II 141
Селезнева И.И.	II 154, III	Смирнов А.А.	I 266	Спивак И.М.	I
84, III 173, IV 78		Смирнов В.Ф.	III 104	317, III 137	
Селиванова О.М.	I 92, I 258	Смирнов С.В.	II 19, II 32, II 45, II 133, II 153, II 165	Сребницкая Л.К.	III 97
Селин А.А.	I 260	Смирнова Д.В.	III 211	Стадничук И.Н.	I 278
Семенихин А.В.	I 114, I 261	Смирнова Е.Н.	III 216	Старкова Т.Ю.	I 279, I 316
Семенов В.А.	III 86	Смирнова Е.Ю.	I	Староверов С.А.	I 84
Семенов В.В.	III 166	24, 109, 216, 272		Стасенко С.В.	I 280, II 63
Семенов М.А.	I 73	Смирнова Л.А.	III	Степанов А.С.	I 160
Семёнов С.Ю.	III 16	24, III 239		Степанов Г.О.	III 184
Семенова Т.П.	I 262	Смирнова О.Д.	III	Степанов О.А.	I 158, II 133, 153
Семин Б.К.	I 263, I 264	40, III 212		Степанов С.А.	II
Семисотнов Г.В.	I 38, I 190, I 249, I 258	Смирнова Т.В.	III 188	134, III 111	
Семьянов А. В.	II 63, II 83	Смирнова Т.И.	III 183	Степанян И.В.	IV 76
Сенько О.В.	IV 69	Смолина Н.В.	III	Стефанов В.Е.	I 163, I 281, II 88, III 137, IV 87
Серая О.Ю.	I 113, IV 37	18, III 222		Стовбун С.В.	II 137
Сергеева Е.А.	I 137, III	Смолыгина Л.Д.	I 267	Стойков И.И.	I 304
30, III 79, III 82, III 159		Смолянская О.А.	III 81	Стрельцова О.С.	III 119
Сергеева Е.И.	III 79	Снежкина А.В.	I 158	Стремовский О.А.	III 147
Сергеева Т.Ф.	I 265	Снопова Л.Б.	III 154, III 183, III 193, III 245, IV 34	Стрзалка К.	II 166
Сергиевич Л.А.	I 266	Соболев А.С.	III 80, III 210, III 213, IV 79	Стриковский А.В.	IV 34, IV 85
Сергиенко В.И.	III 203	Соболев О.В.	I 273	Стробицкая И.Ю.	I 121
Сердюк О.П.	I 267	Соболь Э.Н.	IV 80	Стронгин Л.Г.	III 170
Сердюков Ю.А.	III 207	Соколик А.И.	III 77	Стручкова И.В.	III 219
Серебровская Е.В.	III 245	Соколов А.В.	I 77, I 274, III 58, III 185, III 214	Студитский В.М.	IV 52
Серебровская Е.О.	III 246	III 58, III 185, III 214		Субочев П.В.	IV 85
Сережникова Н.Б.	II 129	Соколов В.В.	II 32, II 45	Суворина М.Ю.	I 92, I 282
Сибгатуллин Т.А.	I 268	Соколов В.С.	I 288	Суворова Ю.М.	I 283
Сиваев И.Б.	III 87	Соколов М.Е.	II 110	Суковатая И.Е.	III 221
Сивожелезов В.С.	IV 72	Соколов П.А.	II	Сулацкая А.И.	IV 95
Сидорова А.Э.	III	144, IV 45		Сурин А.К.	I 92, I 282
208, III 209		Соколов Р.А.	I 275	Сурин А.М.	I 40
Сизов Ю.А.	III 29	Соколова О.С.	IV 33, IV 86	Сурова Л.М.	I 284, I 323
Симонова М.А.	II	Соколова Т.В.	I 43	Суровая А.Н.	I 85, I
143, III 231				285, III 19	
Симонова Н.Б.	II 154			Суслов М.А.	III 14, I III
Симонян А.О.	I 270				
Синауридзе Е.И.	III 56				

03, III 220, IV 88		Титов Е.В. IV 91	Усанов С.А. I 130, I 325
Сутормин О.С. III 221		Ткачук В.А. I 152	Устинин Д.М. II 119
Сухов В.С. I 257, I 284, I 286, I 323, II 135		То Тхи Бик Тхуи I 315	Уткин Ю.Н. I 68
Сухоруков Г.Б. IV 43		Токарев А.А. II 139	Уханова Ю.А. II 61
Сырейщикова Т.И. III 222		Токарев Д.В. II 61	Учаев Д.А. IV 94
Сысоева В.А. I 152		Толмачева А.В. II 49, II 59	Учитель М.Л. II
Сычев С.В. I 276, III 23		Томилин М.В. III 182	143, III 231
Сэйберт М. I 263		Тополь И. II 126, III 205	Ушаков В.Л. II 54, II 71,
Сюсин И.В. I 287		Топоркова Я.Ю. I 291	II 144, III 94, III 120
		Топунов А.Ф. III 109	
		Торчинский Л.Г. IV 8	Ф
		Торшин И.Ю. IV 92	Фадеев П.Ю. IV 29
		Трещенкова Ю.А. III 42	Фадеев Р.С. III 121
		Трифонов Е.В. IV 56, IV 57, IV 58, IV 59	Фадюкова О.Е. I 175
		Тронов В.А. III 169, III 228	Фазилов Р.Н. III 232
		Трофимов А.В. III 160	Файзуллин Д.А. I 121, I 295
		Трофимова Н.Н. II 129	Фалькович С.Г. I 212
		Трубицына М.С. I 208	Фам Уиен Тхи IV
		Трудовишников А.С. I 40	101, IV 102
		Трунин Р.А. II 143, III 231	Фатихов Н.Ф. II
		Трусова В.М. I 105	127, II 145
		Тулеханов С.Т. I 165	Фаткуллина Л.Д. I 296, III 42, III 233
		Тулуб А.А. IV 87	Фахранурова Л.И. II 154
		Туманян В.Г. I 155, I 209, I 300, III 164, IV 92	Федоренко Г.М. II 77
		Тупицына А.И. I 292	Федоров А.А. I 170
		Туроверов К.К. IV 95	Федоров В.А. I 297
		Туровская М.В. II 49	Федоров Г.Е. I 119
		Туровский Е.А. I 96, II 49	Фёдоров Д.В. I 313
		Турутина О.С. III 177	Федорова И.В. I 181, I 313
		Турченков Д.А. I 293, I 294	Федосеев А.И. I 91
		Турченков М.А. IV 93	Федотчев А.И. III 234
		Турчин И.В. I 54, III 21, III 52, III 154, III 183, III 188, III 245	Федотчева Н.И. I 298
		Тутукина М.Н. I 179	Фелл Д.А. II 57
		Тюкин И.Ю. II 63	Фельдштейн Ф.И. III 110, III 119
		Тюняев А.А. II 48	Феофанов А.В. III 87, III 190, IV 52, IV 53
		Тюрина М.И. III 223	Ферензи М.А. I 307
		Тяпкина О.В. II 140, III 229	Фернандес М. I 307
			Фесенко Е.Е. I 199, III 179, III 180, IV 71
		У	Фетисова Е.К. II 9
		Уваровский А.Н. II 141	Фетисова З.Г. II 136, II 146, II 164
		Угарова Н.Н. III 144, III 163, III 211, III 230	Фиалковская Л.А. I 299
		Узбеков М.Г. III 18	Фикс И.И. III 21
		Узденский А.Б. II 23, II 72, II 77, II 142	Филатов И.В. I 209, I 300, III 164
		Уласов А.В. III 80	Филимонов В.В. I 222, I 301
		Ульяненко С.Е. I 150, III 132	Финкельштейн А.В. I 71, I 92
		Урнова Е.С. III 56	Фирсов Н.Н. I 147
			Фирстова Н.С. I 50, I 302
			Флорес В. II 45
			Фомин А.С. I 84

Фомин Л.Б. I 303
Фонин А.В. IV 95
Фостий З.А. IV 99
Фрайкин Г.Я. II 147
Французова В.П. III 182
Фридлянская И.И. III 9
Фролов В.А. I 36, I 37
Фрумкина Л.Е. II 160

Х

Хабибуллин Р.Д. II 148
Хазиев Э.Ф. II 127, II 145
Хаймович Т.И. III 100, III 107, III 157, III 171, III 235
Хайруллин Р.Н. II 36
Хайрудинов Б.И. I 98, I 304
Халатур П.Г. I 319
Халилова Л.А. I 324
Халявкин А.В. II 149, II 150
Хапчаева С.А. III 250
Харакоз Д.П. I 305
Харчук О.А. II 151, II 152
Хасанова Л.М. III 121
Хаспекоев Л.Г. II 100
Хаустова Я.В. I 81
Хаутаниеми Т. II 131
Хватова Е.М. I 265
Хижняк Е.П. III 84
Хлебцов Б.Н. III 225
Хлебцов Н.Г. III.225
Хлудеев И.И. III 99
Хмельницкий А.И. I 312
Ходоров Б.И. I 40
Холякка М.Г. IV 96
Хомутов Г.Б. IV 41, IV 97, IV 98
Хоробрых С.А. I 118
Хорунжая О.В. I 44
Хохлов А.А. IV 21
Хохлов А.Р. I 116, I 319
Храмов Р.Н. II 154
Храмова Ю.В. II 153
Храмцов Ю.В. III 80
Храмцова Е.А. I 306
Хребтова А.С. I 44, I 45
Хренов М.О. III 180
Хренова М.Г. III 55, III 236, III 237
Хрустова Н.В. III 238
Хрущев С.С. I 97, I 297
Хузахметова В.Ф. II 125
Хундерякова Н.В. I 113, IV 37

Ц

Цатурян А.К. I 307
Цверова Н.Е. м239
Цветков В.О. I 115, IV 99
Ценцевицкий А.Н. II 74, II 155
Цетлин В.И. I 68, I 308
Цкитишвили О.В. м226
Цукерман В.Д. II 156
Цыганков А.А. II 157
Цыганова Н.А. I 309

Ч

Чаговец В.В. IV 51
Чеботарева Н.А. I 310, IV 80
Чекашкина К.В. I 37
Чемерис Н.К. II 39, III 114, III 133, III 223
Черенкевич С.Н. I 77, I 188, I 311, I 312, II 46, II 47, II 118, III 58
Черепенин В.А. IV 98
Черкасова Е.И. III 159
Чернавская О.Д. II 158
Чернавский Д.С. II 158
Черненко А.Ю. I 313
Черников А.В. III 37, III 60
Чернов А.С. I 314
Чернов В.В. III 177
Чернышов М.Ю. IV 74
Чернышов С.В. I 194
Черныяских С.Д. I 315
Чернядьева А.В. I 259
Чертков О.В. IV 52
Черткова Р.В. I 34, I 228
Чечеткин В.Р. I 155
Чигалейчик Л.А. IV 100
Чижов А.В. I 109
Чикишев А.Ю. I 48, III 22
Чиков В.И. II 159
Чинь Н.Х. IV 101, IV 102
Чистюлин Д.К. IV 58
Чихиржин О.В. I 317
Чихиржина Е.В. I 243, I 279, I 316
Чукичева И.Ю. I 181, III 242
Чумаков Д.С. III 225
Чумаков М.И. I 88

Ш

Шабалин М.А. III 240
Шабанов П.Д. II 143, III 231
Шабарчина Л.И. IV 31, IV 43

Шадрин И.Ф. I 318
Шайтан А.К. I 319
Шайтан К.В. IV 33
Шайфер У.И. 167
Шамова Е.В. I 77
Шарабрин Е.Г. III 59
Шарапов М.Г. III 179
Шарова Е.И. II 85
Шарлио Т.П. III 76, III 77
Шаталова О.В. I 296
Шатрова А.Н. III 36
Шахова Н.М. III 30, III 79, III 154, III 183
Шварцбург П.М. II 89
Шевченко О.Г. III 241, III 242, III 243
Шевченко Т.Ф. II 8, III 38, III 130
Шевчик С.А. II 144
Шейко Я.И. IV 46
Шейман И.М. II 109
Шелудченко Н.И. I 181, III 242
Шелудько Н.С. I 270
Шемаков А.Е. III 216
Шереметьев Ю.А. I 320, I 321, I 322
Шерстнева О.Н. I 284, I 323
Шестаков П.И. II 41
Шестопалова А.В. I 44, I 45
Шигаева М.И. I 60
Ширманова М.В. I 54, III 21, III 140, III 159, III 244, III 245, III 246, IV 34
Широкова О.М. II 160
Ширшикова Г.Н. II 161
Шихабудинов А.М. I 84
Шिशалов И.С. IV 18
Шишилов О.Н. I 134
Шишкина Л.Н. I 140, I 181, I 186, III 125, III 238, III 247
Шкуринов А.П. I 48
Шкуропатов А.Я. I 327
Шмарев А.Н. II 161
Шматченко В.В. I 92
Шмиголь Т.А. III 248, III 249
Шмитт Ф.-И. II 92
Шнырова А.В. I 36, I 37
Шпирная И.А. I 115, IV 99
Шубина Л.В. II 25
Шувалов А.В. I 324
Шувалов В.А. I 327
Шумаев К.Б. II 8, III 109, III 250

Щ		Яшанова М.И	III.170	Tanggis B. I 329	
Щагина Л.В.	I 101			Trusova V.M.	I 335, I 337
Щеголев Б.Ф.	I 281	A-Z		Tsuboi T. I 174	
Щербатюк Т.Г.	III	Ahmadov I.S.	I 332	Vajda S. I 329	
170, III 177		Alam J.Md.	I 174	Van As H. I 268	
Щербина И.А.	III 17	Al-Karadaghi S.	I 333, I 334	Vergeldt F.J.	I 268
		Aura A.M. II 153		Vus K.O. I 336	
Э		Beglov D. I 329		Weisel J.W.I 295	
Эйрес Н.С. III 251		Belyaeva N.E.	II 170	Yamazaki M.	I 174
Эль-Регистан Г.И.	I 160	Chi Ho Ngan	I 329	Yudintsev A.V.	I 337
		Deligeorgiev T.	I 337	Zamarayeva M.	I 47
		Elmlund H.	I 333	Zerbe B. I 329	
		Emanuelsson C.	I 333		
Ю		Frank-Kamenetskii			
Южакова Д.В.	III 82	M.D. I 329			
Южакова О.А.	III 190	Freiberg A.	I		
Юзенине А.	II 142	330, II 171			
Юминова Н.В.	I 27, I	Gakh O. I 334			
148, I 237		Gerkema E.	I 268		
Юрина Н.П.	II 102	Hakansson A.P.	III 121		
Юров С.С. III 124		Hall D.R. I 329			
Юртаева С.В.	II	Hansson M.	I 333		
162, III 252		Hasanov H.S.	III 256		
Юрчук Ю.С.	III 22	Isaya G. I 334			
Юсипович А.И.	I 131, I	Jadko S.I. I 331			
228, I 230, I 251		Kalnina I. I 336			
		Kastorna A.P.	I 336		
Я		Khalilov R.I.	I 332		
Яблоков Е.О.	I 325	Kirilov G.K.I 336			
Яблокова Е.В.	IV 71	Kirilova E.M.	I 336		
Ягольник Е.А.	I	Kozakov D.	I 329		
165, III.253		Kutsenko O.K.	I 337		
Ягужинский Л.С.	I 124, I	Lavrova A. II 172			
260, I 326, II 50, III 37		Lindahl M. I 333			
Язев Е.А. I 152		Litvinov R.I.	I 295		
Якименко А.О.	I 7	Lundqvist J.	I 333		
Якимова О.В.	III 254	Masimov E.A.	III 256		
Яковенко Л.В.	I 12, II 163	Mavlyanov S.	I 47		
Яковенко С.А.	II	Murtazaeva L.A.	I 337		
68, III 116		Musayeva S.I.	III 256		
Яковлев А.Г.	I	Paschenko V.Z.	II 170		
327, II 164		Pashayev B.G.	III 256		
Яковлева Т.А.	165	Rajan S. I 334			
Якушев Л.В.	I 327	Ramazanov M.A.	I 332		
Якушенкова Т.П.	II 166	Renger G. I 247, II 114, II 170			
Янюшин М.Ф.	I 278	Riznichenko G.Yu. II 170			
Яралиева Ф.Я.	I 200	Roche-Hakansson H. III 121			
Ярмолюк С.М.	III 8, III 224	Rubin A.B. II 170			
Ярославов А.А.	IV 98	Schmitt F.-J.	I		
Ярош О.Г. III 91, III 255		247, II 170			
Яхно В.Г. II 110, II 121, II 167, II		Shkumatov A.	I 334		
168, II 169		Sienkiewicz A.	I 332		
Яхно Т.А. II 168, II 169, IV 83		Söderberg C.	I 334		
Яхъяева Ф.Р.	III 63	Svergun D.	I 334		
		Takahashi T.	I 174		

ГЕНЕРАЛЬНЫЕ СПОНСОРЫ

BioScope Catalyst

АСМ для медико-биологических приложений

ОПТЭК
Объединяя решения



Высокоразрешающее изображение на молекулярном уровне

- Липидные биослои и мембраны
- Плазмиды ДНК и другие биомолекулы
- Структура биополимеров

Изображение живых клеток

- Связь между структурой и функцией
- Комбинированные оптические и АСМ исследования
- Получение ответа на внешние воздействия

Силовые и механические исследования

- Упругость клеточных мембран
- Наноманипуляции и механические стимулы
- Картирование взаимодействия лиганд-рецептор
- Силовая спектроскопия отдельных молекул

BioScope Catalyst - это наиболее полно интегрированный и простой в обращении АСМ для биологических и медицинских исследований, предлагаемых сегодня на рынке

Обратитесь за подробной информацией в "ОПТЭК"

8-800-2000-567

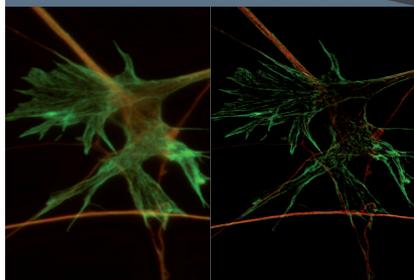
(звонки по России бесплатные)

www.optecgroup.com

Представительства "ОПТЭК"

Москва, Санкт-Петербург, Казань, Нижний Новгород,
Краснодар, Екатеринбург, Новосибирск, Владивосток,
Киев, Алматы, Ташкент, Баку, Ереван, Минск, Тбилиси

BRUKER
think forward



ELYRA - войдите в мир сверхразрешения

ELYRA PS.1 от Carl Zeiss позволяет выбрать метод сверхвысокого разрешения, который лучше всего подходит для изучения вашего образца. Никогда еще так много методов визуализации не были доступны на одной платформе.

Сложность экспериментов с биологическими объектами диктует необходимость использования разных методов манипуляции и визуализации. Система сверхвысокого разрешения ELYRA PS.1 позволяет реализовать разные методы, не прерывая эксперимент.

ELYRA PS.1 - это единая платформа для микроскопии сверхвысокого разрешения по технологиям SR-SIM, PALM и лазерной широкопольной микроскопии. Все технологии объединены в единый модуль оптики и электроники, а также программного обеспечения.

SR-SIM - это методика структурированного освещения, позволяющая строить трехмерное изображение объекта с разрешением до 120 нм

Технология PAL-M (последовательная фотоактивация молекул) позволяет достичь оптического разрешения - 20 нм.

Возможность объединения системы ELYRA PS.1 с конфокальным микроскопом последнего поколения LSM 710/780 позволяет комбинировать методы сверхвысокого разрешения с широкими возможностями лазерного сканирующего микроскопа.

Обратитесь за подробной информацией в "ОПТЭК"

8-800-2000-567
(звонки по России бесплатные)

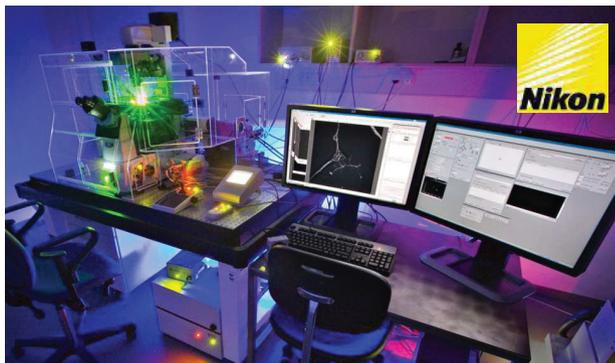
www.optecgroup.com

Представительства "ОПТЭК"

Москва, Санкт-Петербург, Казань, Нижний Новгород, Краснодар,
Екатеринбург, Новосибирск, Владивосток, Киев, Алматы, Ташкент,
Баку, Ереван, Минск, Тбилиси

ОПТЭК
Объединяя решения

Компания Stormoff основана в 1992 году и в настоящее время является крупной международной торговой компанией с головным офисом в Москве, занимающейся оснащением медицинских и научно-исследовательских учреждений. Компания имеет представительства в России и за рубежом.



Номенклатурный ряд оборудования насчитывает более 3000 наименований по 20 основным направлениям биологии и медицины, что предоставляет возможность проектирования комплексного оснащения лечебных и научных учреждений. На сегодняшний день Stormoff входит в десятку крупнейших компаний-поставщиков медицинского и лабораторного оборудования в России и СНГ.

Главные достоинства компании

- Команда квалифицированных специалистов, менеджеров и инженеров
- Официальный дистрибьютор лидеров лабораторного приборостроения Nikon, Andor, SIGMA Laborzentrifugen, Memmert, GFL, Miele, Fujifilm, Thermo и др.
- Поставка оборудования с заводов производителей со склада готовой продукции в Москве.
- Предложение потребителю доступных цен и коротких сроков доставки.
- Информационная техническая поддержка пользователей
- Адаптация оборудования под отечественные условия работы и ввод ее в эксплуатацию.
- Обучение специалистов новым методикам и технологиям работы
- Гарантийное и постгарантийное обслуживание поставляемого оборудования

Компания Stormoff является официальным представителем в России лидеров в разработке и производстве систем световой микроскопии и микроспектроскопии для научно-исследовательских работ компаний Nikon (Япония) и Andor (Великобритания). В линейку продукции по микроскопии входят:

- Микроскопы сверхвысокого разрешения N-SIM / N-STORM (Nikon)
- Многофотонные микроскопы A1RMP+/ A1MP (Nikon)
- Лазерные сканирующие конфокальные микроскопы серий A1+/A1R+ (Nikon), C2+ (Nikon), Revolution XD (Andor)
- Биостанции
- Системы анализа и обработки изображений спектрометры
- Поляризационные микроскопы
- Микроскопы для электрофизиологии
- Стереомикроскопы

История сотрудничества с компанией Nikon началась с 2002 года, когда на базе микроскопов Nikon специалисты Stormoff осуществили комплексное оснащение отделения ВРТ в Национальном Медико-Хирургическом Центре им. Н.И. Пирогова. Благодаря совместной работе, современными микроскопами были оснащены сотни лабораторий от простых учебных до научно-исследовательских создаются уникальные установки под конкретные исследовательские задачи. Высокое качество микроскопов Nikon привело к их широкому выходу и закреплению на отечественном рынке. Работая с нами, Вы используете богатый опыт нашей компании и научно-исследовательских лабораторий с которым мы сотрудничаем

1. Секвенирование и фрагментный анализ

Система генетического анализа GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System. Может быть использована для анализа фрагментов ДНК длиной до 700 пар нуклеотидов. Все возможности системы GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System реализованы в одном массиве капилляров и едином программном обеспечении. Автоматическое генотипирование и исследование экспрессии генов, обеспечивает высокое качество и адаптивную скорость в определении нуклеотидных последовательностей.



2. Luminex. Мультиплексный анализ в исследовании динамики белков и их комплексов, структуры и динамика нуклеиновых кислот. Детекция до 100 различных меток в одной пробе.

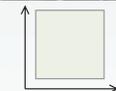
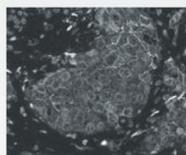


- Мультиплексный анализ, основанный на технологии жидких бид-массивов.
- Единовременный анализ до 100 различных протеинов, пептидов, фрагментов ДНК и РНК в малом и едином объеме пробы.

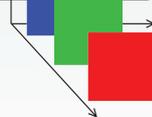


- Уникальная 2x цветовая система координат: красный/инфракрасный
- Анализ биологических суспензий в 96 луночных планшетах
- Принцип детекции, основанный на проточной цитометрии бидов.
- Каждому биду соответствует область – спектральный адрес микросферы, зависящий от отношения красный/инфракрасный

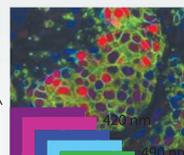
3. Программно-аппаратный комплекс мультиспектральной микроскопии. CRi. Мультиспектральная тонкослойная микроскопия



• Монохром



• Цветное (RGB)

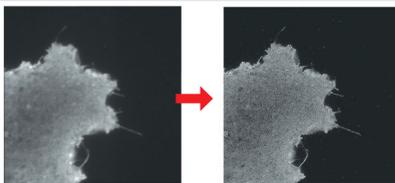
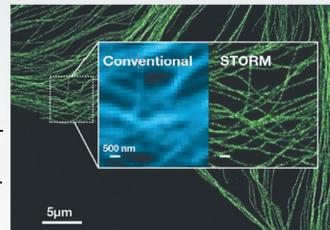


• Мультиспектр

Nikon — это всемирно известный бренд, специализирующийся на оптическом оборудовании, и единственная в мире компания-производитель микроскопов, выпускающая собственное оптическое стекло с гарантией отличного качества. 90-летний опыт работы в области микроскопии позволяет компании Nikon постоянно оставаться на передовой производителей современных оптических систем благодаря непрерывному внедрению инновационных технологий, ставших частью глобальной миссии компании.

В 2010 году компания Nikon выпустила на рынок новые системы сверхвысокого разрешения, позволяющие оставаясь в рамках оптической микроскопии, визуализировать наноскопические клеточные структуры и молекулярную активность при беспрецедентном разрешении.

Корпорация Nikon подписала лицензионное соглашение с Гарвардским университетом, согласно которому Nikon получает права на использование технологии микроскопии со стохастической оптической реконструкцией изображения (STORM). Технология STORM, обеспечивающая более четкое наблюдение тканей и клеток, является передовой разновидностью оптической микроскопии — одного из самых широко используемых методов биомедицинских исследований. Технология N-STORM, обеспечивающая в 10 раз более высокое разрешение по сравнению с обычными оптическими микроскопами, основана на признанном во всем мире исследовательском инвертированном микроскопе Nikon Eclipse Ti. Приборы N-STORM, расширяя возможности оптических микроскопов приближением разрешения к молекулярному уровню, будут пригодны для двух- и трехмерной много-спектральной наноскопии с боковым разрешением около 20 нм и осевым разрешением до 50 нм.



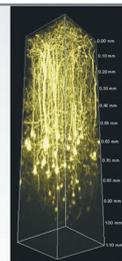
Plasma Membrane: Cell B16/YFP

Новый микроскоп N-SIM со сверхвысоким разрешением производства Nikon позволяет выявлять структуры и функции живых клеток на нано уровне. При помощи высокочастотной структурированной иллюминации микроскоп Nikon N-SIM может давать разрешение 85нм, считавшееся ранее недостижимым для оптических микроскопов. Более того, временное разрешение до 0,6 сек/кадр позволяет

микроскопу N-SIM выполнять замедленную съемку динамических взаимодействий молекул в живых клетках со сверхвысоким разрешением.

Мультифотонная система A1R MP от Nikon — это уникальная система получения мультифотонных изображений, оснащенная гальванометрическим сканером высокого разрешения и высокоскоростным резонансным сканером.

Эксклюзивный резонансный сканер Nikon позволяет регистрировать изображения больших площадей на значительно более высокой скорости по сравнению с нерезонансным сканером - до 420 кадров в секунду. Для поточечной сканирующей технологии это самая высокая скорость в мире. NDD-детектор для мультифотонной микроскопии позволяет быстро получать изображения из глубины самых толстых образцов.



СПЕКТРОМЕТРЫ APPLIED PHOTOPHYSICS ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ

Компания **Applied Photophysics Ltd.** (Великобритания) является мировым лидером в области спектроскопии кругового дихроизма, кинетических исследований в остановленном потоке и лазерного импульсного фотолиза, а также связанных с ними технологий. Производитель проводит обучение и поддержку пользователей в соответствии с международными стандартами для достижения лучших результатов. **Техноинфо Лтд.** является официальным дистрибьютором компании **Applied Photophysics Ltd.** в России.

Области применения
в биологии: анализ структуры и фолдинга белков и нуклеиновых кислот, разработка лекарственных препаратов, анализ малых биомолекул, механизмов биохимических реакций и многое другое...

ОСНОВНЫЕ КЛАССЫ СПЕКТРОМЕТРОВ:

I. Спектрометры кругового дихроизма Chirascan

Chirascan вводит новые стандарты для статистической спектроскопии кругового дихроизма. Это включает в себя инновационную оптическую систему, обеспечивающую максимальное светопропускание, особенно в дальнем-УФ диапазоне длин волн, высококлассную систему сбора и обработки информации, которая обеспечивает быструю регистрацию максимально точных и верных КД-спектров. В отличие от обычных КД-спектрометров, в которых используются аналоговые фильтры электронов, которые сглаживают (а соответственно и искажают) КД-спектры, система электронного аппроксимирования **Chirascan** гарантирует получение неискаженных спектров.

II. Спектрометры остановленного потока (Stopped-flow) SX20



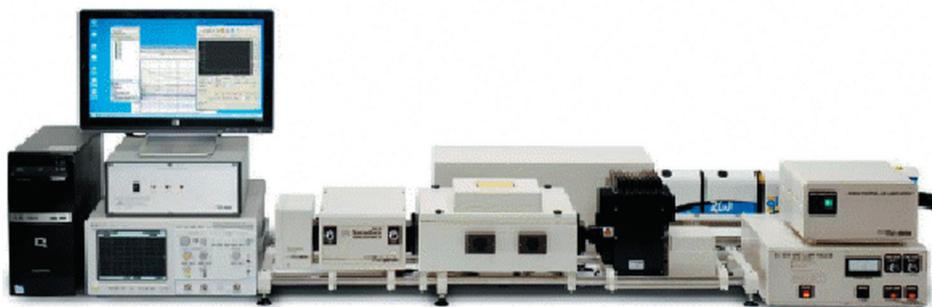
SX20 является золотым стандартом в области изучения кинетики химических реакций в остановленном потоке. Система предоставляет возможность одновременного смешивания исследуемых образцов, регистрации спектров поглощения и флуоресценции (или светорассеяния) как в стационарном, так и в динамическом режиме с непревзойдённым качеством. Циркуляционный контур спектрометра выполнен

из биосовместимых материалов и полностью термостатирован, а так же поддерживает широкий спектр возможностей по асимметричному смешиванию реагентов. Сбор, отображение и анализ поступающей информации производится при помощи пакета программного обеспечения **Pro-Data**, работающего в среде Windows® 7 и поставляемого в комплекте с прибором. Частота импульсов превышает 3000 с-1 с мертвым временем менее 500 мкс. Типичный верхний предел коэффициента скорости реакции составляет 2000 с-1 при стандартной конфигурации прибора (при меньших объемах кюветы - 3000 с-1). Также вам доступен широкий спектр дополнительного оборудования для модернизации данной системы, что позволит проводить любые требуемые исследования.



III. Спектрометры для лазерного импульсного фотолиза LKS.80

LKS.80 - универсальные спектрометры для наносекундной кинетики. Использование лазера в качестве источника возбуждающего излучения позволяет проводить исследования при четко заданной длине волны с наносекундной развёрткой. Непревзойденная чувствительность моно- и мульти-волновых измерений в кинетическом анализе. Прибор оптимизирован для измерений в диапазоне от наносекунд до секунд. Возможно изменение конфигурации до комбинированного спектрометра остановленного потока **SX20**. Модульный дизайн для долговременной службы с возможностью изменения конфигурации. Новое программное обеспечение для управления работой прибора Windows® 7 (ежегодное обновление ПО).



Более полную информацию Вы найдете
на сайтах www.technoinfo.ru и www.photophysics.ru,
а также у наших специалистов.

Наши контакты: Техноинфо Лтд., Москва, Кутузовский пр., 9/2а,
Тел./Факс: +7(499)243-6626, E-mail: sales@technoinfo.ru, www.technoinfo.ru

СПОНСОРЫ



GE Healthcare Life Sciences является мировым лидером в оснащении оборудованием и расходными материалами научныхисследовательских лабораторий и биотехнологических компаний для разработки и производства биофармацевтических препаратов, анализа их воздействия на клетку, исследования живых организмов на уровне генов, белков, клеточных структур с целью изучения механизмов жизни на молекулярном уровне и развития новых подходов для диагностики и лечения.

GE Healthcare Life Sciences – это сумма многих успешных брендов включая Sephadex, AKTA, Amersham, Biacore, MicroCal, WAVE, Whatman, IN Cell, PAA Laboratories и Applied Precision, Inc.

Основные направления

<p>1. Биопроцесс– оборудование и расходные материалы для производства биофармацевтической и биотехнологической продукции:</p> <ul style="list-style-type: none">• Промышленные хроматографические системы и колонны• Хроматографические сорбенты• Волновые биореакторы• Фильтрационные модули и установки	
<p>2. Оборудование и расходные материалы для лабораторной хроматографии и молекулярно-биологических исследований</p>	
<p>3. Оборудование и расходные материалы для изучения живых клеток и анализа взаимодействия молекул в режиме реального времени</p>	
<p>4. Среды и материалы PAA Laboratories и имиджевые платформы Applied Precision для клеточных исследований и технологий</p>	
<p>5. Фильтровальное оборудование и расходные материалы Whatman</p>	
<p>6. Сервисное обслуживание</p>	



GE Healthcare Life Sciences представляет технологию оптического биосенсора *Biacore™* на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (SPR), а также технологию на основе термодинамики микрокалориметр *MicroCal™*, которые позволяют контролировать межмолекулярные взаимодействия биочипах или в микрочаечке в режиме реального времени без использования меток.



Biacore™ T200



MicroCal™ ITC 200

Biacore™ и *MicroCal™* с успехом используются в разнообразных исследованиях межмолекулярных взаимодействий белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов, низкомолекулярных соединений клеток, вирусов, бактерий, липосом, наночастиц и др.

Технология дифференциального электрофореза DIGE (*IPGphor™* для изоэлектрофокусирования, *Ettan DALTsix™* для SDS-электрофореза), флуоресцентные метки *Cy™*, сканнер *Typhoon™*, программное обеспечение *DeCyder™* или *ImageMaster™*, популярность которой растет с конца 90х годов, позволяет прочитать весь клеточный протеом, в 6 раз снизить количество используемых материалов, время при проведении двумерного электрофореза, а также число артефактов.



CyDye™



Typhoon™ FLA 9500



Данные инновационные технологии широко используются по всему миру в самых разных областях: биотехнологии, онкологии, нейробиологии, протеомике, иммунологии, исследованиях инфекционных заболеваний, трансдукции сигнала, скрининге и характеристике лекарственных препаратов, разработке вакцин. Наши российские ученые идут нога в ногу со своими коллегами из ведущих западных центров используя эти технологии в своих исследованиях и публикуясь в лучших мировых изданиях.

ЗАО «ДжиИ Хэлскеа»
123317 Россия, Москва,
Пресненская наб., 10С, 12этаж
Т. +7 (495) 411-97-14
Ф. +7 (495) 739-69-32

WWW.RUSBIOLINK.COM



Компания «РУСБИОЛИНК» предлагает свои услуги научно-исследовательским лабораториям, специализирующимся в области биохимии, молекулярной и клеточной биологии и научно-производственным биотехнологическим фирмам:

- поставку реактивов, расходных материалов и оборудования,
- консультации,
- помощь в реализации Ваших продуктов и услуг.

МЫ ОБЕСПЕЧИВАЕМ:

максимальное удобство для клиентов:

- активно используем современные средства коммуникации (копии счетов и других документов по электронной почте, оперативная связь через Skype);
- доставляем заказы и документы в Вашу лабораторию*;
- располагаем сетью региональных партнеров;
- поможем Вам составить и оптимизировать заказ

уверенность в качестве продукции:

- выбираем поставщиков по оптимальному соотношению цены и качества продукции;
- реализуем продукцию только в оригинальной упаковке и с документацией поставщика;
- тщательно следим за соблюдением условий хранения и транспортировки термолабильных реагентов;
- ответственно относимся к Вашим претензиям и рекламациям

возможность выбора:

- мы официально представляем в России ряд зарубежных фирм: Applichem, Avanti Polar Lipids, BioLegend, Biotium, Enzo Life Sciences, Electron Microscopy Sciences, Iris Biotech, Lucigen, Merck Biosciences, Peprotech, Santa Cruz Biotechnology, Takara/Clontech, R&D Systems, Vector Labs, Zymo Research и другие;
- готовы осуществить поставку продукции зарубежных фирм, не представленных в России, в разумные сроки и по разумным ценам;
- а также поставку некоторых зарубежных фирм, имеющих представительства в России (в том числе Sigma-Aldrich, Bio-Rad), по ценам представительств;
- постоянно расширяем ассортимент продукции, доступной со склада.

*доставка документов и продукции может быть платной, подробности см. на нашем сайте

РАССМОТРИМ ВАШИ ПРЕДЛОЖЕНИЯ:

Мы заинтересованы в предложениях от биотехнологических фирм и научных коллективов, предлагающих продукцию собственного производства и услуги по выполнению контрактных работ. Мы готовы к работе с региональными дилерами и представителями.

ПОДРОБНУЮ ИНФОРМАЦИЮ

Вы можете получить при личном контакте:

Русбиолинк

115201, г. Москва, Каширское ш,
д.22, корп. 3 стр.2,
тел. (499) 502-04-70
факс (495) 727-44-35
mail@rusbiolink.com

Представительство

Русбиолинк в Санкт-Петербурге:
Абдулин Наиль, тел. (921) 578-08-23

Представительство

Русбиолинк в Новосибирске:
Бизяева Светлана, тел. (913) 916-35-38

Представительство

Русбиолинк в Пушчине:
ООО "Окабиолаб",
тел. (4967) 33-06-09, (495) 502-59-93

Mir Biotech s.r.o.

ul. Josefa Knihy, 33701
Rokycany, Czech Republic
www.mirbiotech.com
info@mirbiotech.com
tel +420 377221936
fax +420 227077285

Или на нашем web-сайте:

www.rusbiolink.com

Компания «РУСБИОЛИНК» предлагает свои услуги научно-исследовательским лабораториям, специализирующимся в области биохимии, молекулярной и клеточной биологии и научно-производственным биотехнологическим фирмам:

- поставку реактивов, расходных материалов и оборудования,
- консультации,
- помощь в реализации Ваших продуктов и услуг.

Реагенты для общелабораторного использования:

- постоянно расширяющийся ассортимент качественных реагентов по каталогу;
- под заказ – продукция по каталогам Applichem, Santa Cruz и других фирм;

Реагенты для молекулярной биологии:

- По каталогу – реагенты производства Медиген (ферменты, маркеры молекулярного веса, dNTP, протеиназа K); TRI-реагент (MRC), реагент RNALater (Ambion); наборы для выделения ДНК и РНК (Zymo Res.), никелевая агароза (Biontex);
- Под заказ – продукция Zymo Research, Takara/Clontech, Lucigen, Epicentre, Roche, Ambion, New England Biolabs, USB и др.

Антитела и реагенты для иммунологии:

- По каталогу – конъюгаты вторичных антител;
- Под заказ – продукция Santa Cruz Biotechnology, LSBio (LifeSpan), BioLegend, R&D Systems, Biovendor, Vector Labs, BioLegend, Jackson ImmunoResearch и многих других производителей. Подбор антител, оптимизация заказов, техническая поддержка.

Реагенты и пластик для клеточной биологии:

- Наиболее популярные среды, сыворотки и реагенты (Биолот, HyClon), реагенты для трансфекции (Biontex, Mirus Bio) по каталогу;
- Среда, сыворотки и другие реактивы под заказ (ScienCell, HyClon и др.). Культуральный пластик от Corning Costar, Nest Biotechnology, Orange Scientific.

Цитокины от Peprotech, R&D Systems.

Ферменты от Biozym, Worthington, Calzyme и др.

Субстраты и ингибиторы от Calbiochem, Tocris, Enzo Life Sciences (Biomol) и др.

Липиды от Avanti Polar Lipids.

Для исследований signal transduction – продукция компании Cell Signalling и др.

Реагенты и расходные материалы для электронной микроскопии от Electron Microscopy Sciences. **Реактивы для пептидного синтеза** от Iris Biotech, Merck и Bachem.

Синтетические пептиды от Anaspec и Merck.

Расходные материалы и лабораторное оборудование:

- Недорогое, современное и качественное оборудование китайских (Dragon Lab, Bante, Scopetech) и западных (Bioer, Exacta Optech) фирм, сделанное в КНР.
- Общелабораторный и культуральный пластик (Axygen, Orange Scientific, Corning Costar), расходные материалы для фильтрации и диализа – по каталогу.
- Под заказ – продукция «лабораторных гипермаркетов» из США (Thermo Fisher Scientific, VWR).
- Пластик Corning Costar по специальным ценам под заказ.
- Лабораторное оборудование Bio-Rad, Biosan
- Поставки под заказ продукции фирм, не имеющих представительство в России.

Контрактные работы: синтез пептидов, получение антител, иммуноконъюгатов и иммуносорбентов, разработка высокочувствительных ИФА наборов, генная и белковая инженерия, клеточная биология, биоаналитика.

Другие услуги:

- консультации по нашему профилю (снабжение биологических лабораторий) и от наших партнеров – специалистов в разных областях науки и технологии;
- содействие в импорте и экспорте;
- реализация Вашей продукции в Европе и по всему миру через партнерскую фирму MirBiotech (Чешская республика);
- помощь в поиске партнеров для выполнения Ваших научных и технологических разработок.



группа компаний

ГРУППА КОМПАНИЙ «БИОЛАЙН»

197101, Россия, Санкт-Петербург
Петроградская наб., 36А
тел. (812) 320 49 49,
факс: (812) 320 49 40
e-mail: main@bioline.ru
www.bioline.ru

Профиль компании - комплексное оснащение, технический сервис, обучение и консультативная поддержка лабораторий различного профиля.

НАША ПРОДУКЦИЯ: Весь комплекс общелабораторного, медицинского и диагностического оборудования от ведущих мировых производителей.

Приборы и реагенты для проточной цитометрии **BD Biosciences** для клинических и научных исследований

Гистологическое оборудование, микроскопы, реагенты и расходные материалы

Leica Microsystems

- Ламинарно-поточные шкафы **Kojair**
- Автоклавы и средоварки **Systec**
- Лабораторные инкубаторы, сухожаровые шкафы и CO₂ инкубаторы **Shellab**
- Анаэробная станция **Bactron**
- Универсальные лабораторные центрифуги **Hermle**
- Низкотемпературные морозильники **Snijders**
- Приборы для работы в микропланшетном формате производства **BioTek Instruments Inc.**

НАШИ ПОЛЬЗОВАТЕЛИ:

Более 1000 клинических и научных центров по всей России.

Клинические и научные лаборатории различного профиля. Ведущие профильные учреждения по всей стране: Российский Онкологический центр им. Н.Н. Блохина РАМН, ГНЦ Институт иммунологии ФМБА, Гематологический научный центр, НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Институт клинической иммунологии СО РАН, НИИ Акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта, МГУ, СПбГУ и многие другие.

НАШИ РЕСУРСЫ:

Опытные специалисты с многолетним практическим опытом

Квалифицированная сервисная служба

Собственная служба логистики.

НАШ ОПЫТ:

Поставки оборудования и реагентов в клинические и исследовательские лаборатории с 2000 года

Поставки оборудования и реагентов в рамках национальных проектов Министерства здравоохранения РФ

Поставки в рамках международных программ Всемирного банка и Глобального фонда по борьбе с ВИЧ/СПИД и туберкулезом в России и Украине.

**IV СЪЕЗД
БИОФИЗИКОВ РОССИИ**

**СИМПОЗИУМ I
«ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ
БИОПОЛИМЕРОВ И КЛЕТОК»**

МАТЕРИАЛЫ ДОКЛАДОВ

Дизайн, техническое редактирование, вёрстка:
Февральских А.В.
Поль Маник

Качество визуального воспроизведения соответствует качеству предоставленных материалов