V Российский симпозиум «Белки и пептиды»

V Российский симпозиум

Белки и пептиды

Петрозаводск, 8–12 августа 2011 года

тезисы докладов

2011

БЕЛКИ
ПЕПТИДЫ

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

Научный совет по биоорганической химии

Учреждения Российской академии наук:

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Петрозаводский государственный университет

V РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ

БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ

Петрозаводск, 8–12 августа 2011 г.

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

ПЕТРОЗАВОДСК
2011

УДК 577.112(063)
ББК 28.072
Б43

СИМПОЗИУМ ОРГАНИЗОВАН ПРИ ФИНАНСОВОЙ ПОДДЕРЖКЕ

Президиума Российской академии наук

Отделения биологических наук РАН

Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 11-04-06042

СПОНСОРЫ И ПАРТНЕРЫ МЕРОПРИЯТИЯ

Генеральный спонсор:

Общество с ограниченной ответственностью «ГЕРОФАРМ» (ООО «ГЕРОФАРМ»), г. Санкт-Петербург

Спонсоры:

Общество с ограниченной ответственностью «ПЕПТОС ФАРМА» (ООО «ПЕПТОС ФАРМА»), г. Москва

Закрытое акционерное общество «Инновационный научно-производственный центр “Пептоген”» (ЗАО «ИНПЦ “Пептоген”»), г. Москва

Учреждение РАМН Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург

Общество с ограниченной ответственностью «Спектроника» (ООО «Спектроника»), г. Москва

Закрытое акционерное общество «ДжиИ Хэлскеа» (ЗАО «ДжиИ Хэлскеа») г. Москва

ISBN 978-5-9274-0475-9

© Учреждение РАН Институт биологии Карельского научного центра РАН, 2011
© Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, 2011

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕЗИСЫ ПЛЕНАРНЫХ ДОКЛАДОВ

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАШИНЫ
Финкельштейн А.В., Спирин А.С. 39

ОТ ПРОЕКТА «ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА» К ПРОЕКТУ «ПРОТЕОМ ЧЕЛОВЕКА»
Арчаков А.И. 40

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ КАК ИНЕРТНЫЕ МЕТКИ И АКТИВНЫЕ ФОТОХИМИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ
Лукьянов С.А. 41

ПЕПТИДЕРГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК
Хавинсон В.Х. 42

ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ СТРУКТУРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ИСТОЧНИКОВ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ
Попов В.О. 43

СТРУКТУРНАЯ БИОЛОГИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ
Арсеньев А.С., Бочаров Э.В., Шенкарев З.О., Минеев К.С., Парамонов А.С., Надеждин К.Д., Бочарова О.В., Люкманова Е.Н., Кирпичников М.П. 44

МИНИМАЛЬНЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ КОНТЕНТ КЛЕТКИ
Говорун В.М., Алексеев Д.Г., Базалеев Н.А., Галямина М.А., Дёмина И.А., Жукова Н.А., Кондратов И.Г., Ладыгина В.Г., Серебрякова М.В., Фисунов Г.Ю. 45

МЕХАНИЗМ ДЕГРАДАЦИИ АУТОАНТИГЕНОВ
Габибов А.Г. 46

ТРИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ДОМЕНА НИКОТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ: ОТ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ К ДИАГНОСТИКЕ И НОВЫМ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ
Цетлин В.И. 47

ВРОЖДЕННЫЙ ИММУНИТЕТ, ЦИТОКИНЫ И «ОБРАТНАЯ ГЕНЕТИКА»
Недоспасов С.А. 48

ПРИРОДНЫЕ ТОКСИНЫ И ИХ МЕМБРАННЫЕ МИШЕНИ
Гришин Е.В. 49

МНОЖЕСТВЕННЫЕ ФОРМЫ ПРОТЕАСОМ И СУДЬБА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ
Шарова Н.П. 50

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БЕЛКОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ
Привалов П.Л. 51

РАЗРАБОТКА ОСНОВ СОЗДАНИЯ ПЕПТИДНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ
Мясоедов Н.Ф. 52

ТЕЗИСЫ СЕКЦИОННЫХ ДОКЛАДОВ

Секция 1: Выделение, очистка, характеризация белков и пептидов. Пептидомика. Протеомика

ПЕПТИДОМИКА ЭКЗОГЕННЫХ ОЛИГОПЕПТИДОВ
Замятнин А.А. 55

ТЕХНОЛОГИИ ПЕПТИДОМИКИ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ
Зиганшин Р.Х., Арапиди Г.П., Азаркин И.В., Говорун В.М., Иванов В.Т. 56

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРОТЕОМА И ПЕПТИДОМА В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ ПРОТОПЛАСТОВ МХА *PHYSCOMITRELLA PATENS*
Скрипников А.Ю., Поляков Н.Б., Слижикова Д.К., Галямина М.Ю., Демина И.Ю., Казаков В.С., Козьмин Ю.П., Птушенко В.В., Мажейка И.С., Мочалов К.Е., Говорун В.М., Иванов В.Т. 57

ЕСТЬ ЛИ НЕЙРОТОКСИНЫ В ЯДЕ ГАДЮКИ?
Уткин Ю.Н., Вульфиус Е.А., Горбачева Е.В., Старков В.Г., Никитин И.Г., Осипов А.В., Рамазанова А.С., Цетлин В.И. 58

НОВЫЕ ГЕМОТОКСИЧНЫЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ ИЗ ЯДОВ ЗМЕЙ
Рамазанова А.С., Осипов А.В., Филькин С.Ю., Старков В.Г., Уткин Ю.Н. 59

МЕМБРАНО-АКТИВНЫЕ ПЕПТИДЫ ИЗ ЯДА ПАУКОВ
Василевский А.А., Гришин Е.В. 60

ЗАЩИТНЫЕ ПЕПТИДЫ ИММУНИТЕТА РАСТЕНИЙ (ИЛИ ХИМИЯ И ГЕНЕТИКА ЗАЩИТНЫХ ПЕПТИДОВ ИММУНИТЕТА РАСТЕНИЙ)
Егоров Ц.А., Одинцова Т.И. 61

БЕЛКИ ВТОРИЧНОЙ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВОЛОКОН
Ибрагимова Н.Н., Мокшина Н.Е., Горшкова Т.А. 62

ВАРИАБИЛЬНОСТЬ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ПУЛА КАК ОТВЕТНАЯ РЕАКЦИЯ ОРГАНИЗМА РЫБ НА ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ
Смирнов Л.П., Суховская И.В. 63

ЛАНТИБИОТИКИ – УНИКАЛЬНЫЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПЕПТИДЫ: РАЗНООБРАЗИЕ СТРУКТУРЫ И МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ
Коробов В.П., Полюдова Т.В., Лемкина Л.М. 64

ПОДХОД К ВЫДЕЛЕНИЮ ИНТАКТНЫХ МОЛЕКУЛ ТАЙТИНА
Шумилина Ю.В., Вихлянцев И.М., Подлубная З.А. 65

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ *ESCHERICHIA COLI*
Курилова С.А., Воробьева Н.Н., Родина Е.В., Назарова Т.И. 66

Секция 2: Химия белков и пептидов. Методы синтеза, химическая модификация

ТВЕРДОФАЗНЫЙ ИЗОТОПНЫЙ ОБМЕН СО СПИЛЛОВЕР-ВОДОРОДОМ В ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЯХ
Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Борисов Ю.А., Козик В.С., Мясоедов Н.Ф. 68

ТВЕРДОФАЗНЫЙ ИЗОТОПНЫЙ ОБМЕН ВОДОРОДА В ПЕПТИДАХ И БЕЛКАХ, ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ
Дадаян А.К., Золотарев Ю.А., Козик В.С., Васьковский Б.В., Назимов И.В., Мясоедов Н.Ф. 69

СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ КАРДИОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ АПЕЛИНА-12 И ЕГО СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ
Сидорова М.В., Азьмуко А.А., Палькеева М.Е., Молокоедов А.С., Бушуев В.Н., Шульженко В.С., Пелогейкина Ю.А., Писаренко О.И., Беспалова Ж.Д. 70

Секция 3: Биотехнология (конструирование и получение рекомбинантных белков и пептидов)

ЭКСПРЕССИОННЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ИНТЕИНОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ. ПРИМЕНЕНИЕ И ОГРАНИЧЕНИЯ
Есипов Р.С., Степаненко В.Н., Мирошников А.И. 72

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ГЛИКОМОДИФИКАЦИИ ПОЛИМЕРОМ СИАЛОВОЙ КИСЛОТЫ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНКазы I ЧЕЛОВЕКА, ЭКСПРЕССИРОВАННОЙ В *PICHIA PASTORIS*
Бобик Т.В., Смирнов И.В., Пономаренко Н.А., Генкин Д.Д., Габибов А.Г. 73

НОВЫЕ БИОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ГЕМОСОРБЕНТЫ ДЛЯ ЭФФРЕНТНОЙ МЕДИЦИНЫ
Макаревич Д.А., Федоров А.А., Голубович В.П., Голубович Д.В., Кирковский В.В. 74

АФФИННЫЙ СОРБЕНТ НА ОСНОВЕ ТРИПТОФИЛТРЕОНИЛТИРОЗИНА ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА G. АСПЕКТЫ МЕДИЦИНСКОГО И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ
Левашов П.А., Овчинникова Е.Д., Афанасьева М.И., Фрид Д.А., Азьмуко А.А., Беспалова Ж.Д., Адамова И.Ю., Афанасьева О.И., Покровский С.Н. 75

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО ПРЕДШЕСТВЕННИКА НЕЙРОТРОФИНА NT-3 ЧЕЛОВЕКА
Сафина Д.Р., Шамонов Н.А., Сурин А.М., Пинелис В.Г., Костров С.В. 76

НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ КОМПОНЕНТОВ ЭКЗОТОКСИНА *BACILLUS ANTHRACIS*
Панина А.А., Алиев Т.К., Топорова В.А., Шемчукова О.Б., Бикетов С.Ф., Долгих Д.А., Свешников П.Г. 77

МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ВЕЧНОЙ МЕРЗЛОТЫ КАК ИСТОЧНИК НОВЫХ ГЕНОВ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ
Петровская Л.Е., Лукашев Е.П., Новотоцкая-Власова К.А., Крюкова Е.А., Сычев С.В., Спирина Е.В., Ривкина Е.М., Гиличинский Д.А., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. 78

Секция 4: Физико-химические и компьютерные методы исследования. Пространственная структура и динамика. Биоинформатика

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ ДВУХДОМЕННОГО N-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА АРХЕЙНОГО РИБОСОМНОГО БЕЛКА L10(P0) И УТОЧНЕНИЕ КРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ АРХЕЙНОЙ РИБОСОМЫ
Гарбер М.Б., Кравченко О.В., Митрошин И.В., Пиндл В., Никонов С.В. 80

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ПЕПТИДОВ НА ИХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИШЕНИ В РАСТВОРЕ И В МЕМБРАНЕ: ВОЗМОЖНОСТИ КОМПЬЮТЕРНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА
Волынский П.В., Полянский А.А., Логинов П.А., Озеров И.В., Балицкая Е.Д., Ефремов Р.Г. 81

ВЫРАЩИВАНИЕ КРИСТАЛЛОВ БЕЛКОВ НА МЕЖДУНАРОДНОЙ КОСМИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ МЕТОДОМ ВСТРЕЧНОЙ ДИФФУЗИИ
Куранова И.П., Ковальчук М.В. 82

НОВЫЕ ПОДХОДЫ В РЕШЕНИИ ЗАДАЧ ПРОТЕОМИКИ, ОСНОВАННЫЕ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ НАНОКРИСТАЛЛОВ (КВАНТОВЫХ ТОЧЕК)
Олейников В.А., Генералова А.Н., Мочалов К.Е., Артемьев М.В., Сизова С.В., Зубов В.П., Набиев И.Р. 83

СВОЙСТВА ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ АЦИЛОВ ФОСФОЛИПИДОВ И ЛИПИД-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ (КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ)
Рабинович А.Л., Рипатти П.О. 84

ЦИКЛИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ И ИХ РОЛЬ В СВОРАЧИВАНИИ БЕЛКОВ
Ефимов А.В. 85

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ОБОЛОЧЕЧНЫХ ВИРУСОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ПРОТЕОЛИЗА, MALDI-TOF MACC-СПЕКТРОМЕТРИИ И МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ
Кордюкова Л.В., Серебрякова М.В., Полянский А.А., Veit M. 86

ВЛИЯНИЕ АКТИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ НА ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ МОНОМЕРНОГО G-АКТИНА
Левицкий Д.И., Пивоварова А.В., Чеботарева Н.А. 87

ВЛИЯНИЕ ТОЛЩИНЫ МЕМБРАНЫ НА СТРУКТУРУ ДИМЕРА ТРАНСМЕМБРАННЫХ ФРАГМЕНТОВ FGFR3
Волынский П.Е., Фахрутдинова Г.Н., Полянский А.А., Ефремов Р.Г. 88

СТРУКТУРНЫЕ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ КАНАЛОВ ЧЕЛОВЕКА С ЛИГАНДАМИ (БЛОКАТОРАМИ)
Шайтан К.В., Соколова О.С., Кирпичников М.П. 89

ПОИСК НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДНЫХ АНАЛОГОВ ФАКТОРОВ РОСТА И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
Голубович В.П., Шутова И.В., Голубович Д.В., Грибовская О.В., Коваленко А.П. 90

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОИСК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ В ТРАНСКРИПТОМАХ
Козлов С.А. 91

РОЛЬ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ И ФАЗОВЫХ СОСТОЯНИЙ РАСТВОРА В РЕГУЛЯЦИИ СТРУКТУРНОЙ ДИНАМИКИ БЕЛКОВ
Рожков С.П., Горюнов А.С. 92

КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ZN-ТФП В ХЛОРОФОРМЕ КАК МОДЕЛЬ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ С УЧАСТИЕМ МЕТАЛЛОПОРФИРИНОВ В ВОДНЫХ И ОРГАНИЧЕСКИХ СРЕДАХ
Андреев В.П., Соболев П.С., Зайцев Д.О., Романова М.И., Ларкина Е.А., Ткачевская Е.П. 93

МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ ФИЛАМЕНТОВ ИЗ ПЕПТИДА H-$(RADA)_4$-OH
Удовиченко И.П., Данилкович А.В., Липкин В.М. 95

Секция 5: Биологическая активность. Методы тестирования

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ПОИСКА И ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ
Гривенников И.А., Антонов С.А., Арсеньева Е.Л., Долотов О.В., Иноземцева Л.С., Кобылянский А.Г., Лагарькова М.А., Лебедева О.С., Мануилова Е.С., Новосадова Е.В. 97

МАТРИКИНЫ И ДРУГИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ПЕПТИДЫ, ОБРАЗУЮЩИЕСЯ ИЗ БЕЛКОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА
Шрам С.И., Мясоедов Н.Ф. 98

ФОФСОЛИПАЗЫ ИЗ ЯДА ЗМЕЙ СПОСОБНЫ БЛОКИРОВАТЬ НИКОТИНОВЫЕ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРЫ
Вульфиус Е.А., Горбачева Е.В., Старков В.Г., Осипов А.В., Никитин И.Г., Кашеверов И.Е., Андреева Т.В., Цетлин В.И., Уткин Ю.Н. 99

ПЕРИНАТАЛЬНОЕ «ПРОГРАММИРОВАНИЕ» ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПЕПТИДАМИ ГИПОТАЛАМУСА
Захарова Л.А., Мельникова В.И. 100

КАРДИОПРОТЕКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ЭНКЕФАЛИНОВ
Мурашев А.Н., Шайхутдинова Э.Р., Боброва И.А., Хохлова О.Н., Слащева Г.А., Берчатова А.А., Крапф Г., Биссессар Э. 101

К ПРОБЛЕМЕ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ
Толпыго С.М., Певцова Е.И., Котов А.В. 102

БЕЛОК HLDF И АУТОАНТИТЕЛА К НЕМУ – БИОМАРКЕРЫ СОПРЯЖЕННЫХ ПОРАЖЕНИЙ НЕРВНОЙ, СОСУДИСТОЙ И ИММУННОЙ СИСТЕМ У ЧЕЛОВЕКА
Грудень М.А., Костанян И.А. 103

HLDF-6 – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПЕПТИДНЫЙ ПРЕПАРАТ С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ, НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫМ И НООТРОПНЫМ ДЕЙСТВИЕМ
Богачук А.П., Липкин В.М., Сурина Е.А., Костанян И.А. 104

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ ГАПОНИНА С ПОМОЩЬЮ ПАНЕЛИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ С ИЗМЕНЁННЫМИ УРОВНЯМИ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА
Ракитина Т.В., Смирнова Е.В., Воробьёва Е.Е., Иванова Д.Л., Богатова О.В., Поздеев В.И., Юдкина О.В., Костанян И.А., Липкин В.М.....105

ПЕПТИДЫ ИММУНОГЛОБУЛИНОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ: МИФЫ И РЕАЛЬНОСТЬ
Наволоцкая Е.В., Костанян И.А.....106

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ БЕЛКОВ ЗРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ БЛИЗОРУКОСТИ (МИОПИИ)
Липкин В.М., Богачук А.П., Минкевич Н.И., Иомдина Е.Н., Курылева И.М., Бабиченко И.И., Костанян И.А. 107

Секция 6: Взаимосвязь структура – функция. Механизмы действия

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ НООТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКИХ МЕЛАНОКОРТИНОВ ОТ СТРУКТУРЫ
Левицкая Н.Г., Глазова Н.Ю., Атанов М.С., Манченко Д.М., Андреева Л.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. 109

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТИВНЫХ ВЛИЯНИЙ ПЕПТИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ И МЕЖПОЛУШАРНУЮ АСИММЕТРИЮ МОЗГА ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ И ОРГАНИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ
Соллертинская Т.Н., Шорохов М.В., Мясоедов Н.Ф.....110

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА
Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Дудков А.В., Трофимов А.В. 111

СВОЙСТВА И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ИММУНОРФИНА – АГОНИСТА НЕОПИОИДНОГО РЕЦЕПТОРА БЕТА-ЭНДОРФИНА
Ковалицкая Ю.А., Чернов А.С., Катаев А.А., Садовников В.Б., Наволоцкая Е.В. 112

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА РАЗВИТИЕ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ НА МОДЕЛИ *DANIO RERIO*
Рафиева Л.М., Гасанов Е.В., Костров С.В. 113

С-КОНЦЕВОЙ СЕГМЕНТ КАК ВСТРОЕННЫЙ МОДУЛЯТОР ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА НЕЙРОНАЛЬНЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ СЕНСОРОВ
Зерний Е.Ю., Колпакова Т.В., Пермяков С.Е., Назипова А.А., Зинченко Д.В., Комолов К.Е., Шольтен А., Григорьев И.И., Пермяков Е.А., Кох К.-В., Филиппов П.П., Сенин И.И. 114

ПРИМЕНЕНИЕ ПЕПТИДНОЙ СТРАТЕГИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ И РЕГУЛЯЦИИ ГОРМОНАЛЬНЫХ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ
Шпаков А.О. 115

ЭФФЕКТИВНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В МОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМАХ
Некрасов А.Н., Зинченко А.А. 116

ОБРАТИМАЯ АГРЕГАЦИЯ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ *VIBRIO CHOLERAE* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ
Родина Е.В., Курилова С.А., Воробьева Н.Н., Тарасова Е.А., Назарова Т.И. 117

РОЛЬ ЛИГАНДОВ И ВНЕШНИХ УСЛОВИЙ В ПРОЦЕССАХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ И САМООРГАНИЗАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНОГО ШАПЕРОНА GroEL *IN VITRO*
Семисотнов Г.В., Марченков В.В., Марченко Н.Ю., Котова Н.В., Кашпаров И.А., Кашпарова Н.Я., Рябова Н.А. 118

ВИРУСНЫЕ ШАПЕРОНИНЫ: СТРУКТУРА, СВОЙСТВА И МЕХАНИЗМ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ
Курочкина Л.П., Семенюк П.И., Орлов В.Н., Амарантов С.В., Сыкилинда Н.Н. 119

Секция 7: Химия и биология протеолитических ферментов

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА КЛЕТОЧНОГО ПРОТЕОМА: ЭНЕРГОЗАВИСИМЫЕ ПЕПТИДГИДРОЛАЗЫ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ШАПЕРОНЫ
Ротанова Т.В.....121

ДЕСТАБИЛАЗА-ЛИЗОЦИМ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ВЗАИМОСВЯЗЬ
Завалова Л.Л., Антипова Н.В., Фадеева Ю.И., Павлюков М.С., Плетнева Н.В., Плетнев В.З., Баскова И.П. 122

ПРОБЛЕМЫ ОРГАНИЗАЦИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ПРОТЕИНАЗ ВЫСОКОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ. ВИДОВАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЭНТЕРОПЕПТИДАЗЫ
Михайлова А.Г., Румш Л.Д. 123

МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ – ММП-1,-2,-9 И ИХ ЭНДОГЕННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЕ ШЕЙКИ МАТКИ
Соловьева Н.И., Рыжакова О.С., Андреева Ю.Ю., Завалишина Л.Э. 124

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ И ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ ПРИ МЕТАСТАЗИРОВАНИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ
Кондакова И.В., Клишо Е.В., Спирина Л.В., Какурина Г.В., Малахова Е.В., Савенкова О.В., Шишкин Д.А., Чойнзонов Е.Л., Шарова Н.П. 125

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИНВАЗИИ БАКТЕРИЙ, СИНТЕЗИРУЮЩИХ ГРИМЕЛИЗИН И ПРОТЕАЛИЗИН, В ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ
Хайтлина С.Ю., Божокина Е.С., Демидюк И.В., Цаплина О.А., Ефремова Т.Н.....126

ПРОТЕИНАЗЫ СЕМЕЙСТВА КАЛЬПАИНОВ У ВОДНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И РЫБ
Лысенко Л.А., Канцерова Н.П., Немова Н.Н. 127

ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА IgA1 ПРОТЕИНАЗЫ *N. MENINGITIDIS*
Жигис Л.С., Ягудаева Е.Ю., Серова О.В., Бичучер А.М., Дрожжина Е.Ю., Зуева В.С., Козлов Л.В., Котельникова О.В., Разгуляева О.А., Аваков А.Э., Аллилуев А.П., Румш Л.Д., Зинченко А.А. 128

ЭНДОГЕННЫЙ ИНГИБИТОР ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА *PARALITHODES CAMCHATICUS*
Руденская Г.Н. 129

ИНГИБИРОВАНИЕ ПРОТЕАСОМЫ И ИММУНОПРОТЕАСОМЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЕЩЕСТВ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ
Бачева А.В., Кузина Е.С., Белогуров А.А., Пономаренко Н.А., Габибов А.Г. 130

МЕХАНИЗМЫ КОРРЕКЦИИ ОШИБОК ТРАНСКРИПЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ
Кульбачинский А.В., Пупов Д.В., Есюнина Д.М. 131

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕСИИ ГЕНОВ ПРОБЕЛОК-КОНВЕРТАЗ ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО
Демидюк И.В., Шубин А.В., Гасанов Е.В., Куринов А.М., Демкин В.В., Виноградова Т.В., Зиновьева М.В., Сасс А.В., Зборовская И.Б., Костров С.В. 132

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ИММУННЫХ ПРОТЕАСОМ В ЦНС МЫШЕЙ, НОКАУТНЫХ ПО B_2-МИКРОГЛОБУЛИНУ
Люпина Ю.В., Богатырев М.Е., Астахова Т.М., Абатурова С.Б., Марюхнич Е.В., Казанский Д.Б., Шарова Н.П. 133

ВЛИЯНИЕ АНТАГОНИСТА РЕЦЕПТОРА-1, АКТИВИРУЕМОГО ПРОТЕИНАЗОЙ (иПАР1-II), НА ВЫЗВАННУЮ ТРОМБИНОМ ГИБЕЛЬ НЕЙРОНОВ
Горбачева Л.Р., Румш Л.Д., Беспалова Ж.Д., Фельдман Б.М., Ворожцов Г.Н., Струкова С.М. 134

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТЕИНАЗЫ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА И ЕЕ МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНОГО МУТАНТА СО СПЕЦИФИЧЕСКИМИ ИНГИБИТОРАМИ МЕТОДОМ ОСТАНОВЛЕННОГО ПОТОКА
Дронина М.А., Кузнецов Н.А., Захарова М.Ю., Смирнов И.В., Козырь А.В., Колесников А.В., Калиберда Е.Н., Румш Л.Д., Федорова О.С., Габибов А.Г. ...135

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МАЛДИ МАСС-СПЕКТРОВ ПРОДУКТОВ ПРОТЕОЛИЗА КАК МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПРОТЕИНАЗ
Еремеев Н.Л., Борзенкова А.В., Драчевская М.И. 136

Секция 8: Создание новых лекарственных средств

АНТИЭПИЛЕПТИЧЕСКОЕ И НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ КОРТЕКСИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СУДОРОЖНОЙ АКТИВНОСТИ, ВЫЗВАННОЙ ВВЕДЕНИЕМ ПЕНТИЛЕНТЕТРАЗОЛА, У КРЫС
Аниол В.А., Новицкая Ю.А., Лазарева Н.А., Моисеева Ю.В., Онуфриев М.В., Попова М.С., Степаничев М.Ю., Тишкина А.О., Яковлев А.А., Гранстрем О.К., Гуляева Н.В. 138

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ И ОПТИЧЕСКОЙ ИЗОМЕРИИ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ И ПРОИЗВОДНЫХ 2,5-ДИКЕТОПИПЕРАЗИНОВ
Дейгин В.И., Ксенофонтова О.Б., Ефремов Е.С., Шевченко А.С., Семин Ю.А., Изместьева О.С., Лузянина А.А., Саенко А.С. 139

ПСИХОФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ СПЕКТР АКТИВНОСТИ НЕЙРОТЕНЗИНПОДОБНЫХ ПЕПТИДОВ
Кост Н.В., Мешавкин В.К., Батищева Е.Ю., Соколов О.Ю., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. 140

СОЗДАНИЕ СИСТЕМНО АКТИВНОГО ДИПЕПТИДНОГО МИМЕТИКА ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ
Гудашева Т.А., Середенин С.Б. 141

ПОИСК МАЛЫХ МОЛЕКУЛ С АНТИПСИХОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ НА ОСНОВЕ НЕЙРОТЕНЗИНА
Островская Р.У., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. 142

ГЛИПРОЛИНЫ И ЯЗВА ЖЕЛУДКА
Самонина Г.Е., Копылова Г.Н., Умарова Б.А., Багликова К.Е., Бакаева З.В. 143

ПЕПТИД МОЛОКА ЧЕЛОВЕКА ЛАКТАПТИН КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ПРОТИВОРАКОВЫЙ ПРЕПАРАТ
Рихтер В.А., Коваль О.А., Каледин В.И., Фомин А.С., Потапенко М.О., Кулигина Е.В., Семенов Д.В. 144

ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ АЛЬФА7-СУБЪЕДИНИЦЫ АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА И ПРИОННОГО БЕЛКА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА
Камынина А.В., Бобкова Н.В., Медвинская Н.И., Александрова И.Ю., Короев Д.О., Волкова Т.Д., Вольпина О.М. 145

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ТРАНСПЛАНТАЦИИ VEGF И FGF2 В ОБЛАСТЬ ТРАВМАТИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ ПРИ ПОМОЩИ КЛЕТОК КРОВИ ПУПОВИНЫ И ПУТЕМ ПРЯМОЙ ИНЪЕКЦИИ
Шаймарданова Г.Ф., Мухамедшина Я.О., Ризванов А.А., Салафутдинов И.И., Челышев Ю.А. 146–147

ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА ПУТЕМ СЕЛЕКТИВНОЙ ЭЛИМИНАЦИИ АУТОРЕАКТИВНЫХ В-КЛЕТОК
Степанов А.В., Белогуров А.А.-мл., Пономаренко Н.А., Козлов Л.В., Дмитриев С.Е., Стремовский О.А., Деев С.М., Габибов А.Г.....148

ОЦЕНКА ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДОВ ПРОСТАМАКС И КОРТАГЕН НА МОДЕЛИ ХИМИЧЕСКОГО ОТЕКА СТОПЫ КРЫС: ИССЛЕДОВАНИЕ В СООТВЕТСТВИИ С ТРЕБОВАНИЯМИ КАЧЕСТВЕННОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКИ
Ленцман М.В., Артемьева А.И., Гранстрем О.К., Шопотов И.К. 148

ИММУНОГЕННЫЕ И ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА IgA 1 ПРОТЕИНАЗЫ МЕНИНГОКОККА
Котельникова О.В., Бичучер А.М., Дрожжина Е.Ю., Жигис Л.С., Зуева В.С., Мельников Э.Э., Разгуляева О.А., Серова О.В., Ягудаева Е.Ю., Аваков А.Э., Аллилуев А.П., Козлов Л.В., Румш Л.Д. 150

ПЕПТИДНЫЕ ИММУНОГЕНЫ ДЛЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГЕПАТИТА С
Колесанова Е.Ф., Мойса А.А., Пындык Н.В., Фарафонова Т.Е., Фуников С.Ю., Соболев Б.Н., Арчаков А.И. 151

ПЕПТИДНЫЙ ФРАГМЕНТ 29-40 АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ МОНОЦИТАРНОГО ХЕМОТАКСИЧЕСКОГО БЕЛКА-1 (MCP-1) СТИМУЛИРУЕТ МИГРАЦИЮ МОНОЦИТОВ
Красникова Т.Л., Кухтина Н.Б., Арефьева Т.И., Соколов В.О., Рулева Н.Ю., Пылаева Е.А., Азьмуко А.А., Сидорова М.В., Беспалова Ж.Д. 152

НОВЫЙ ПОДХОД К СОЗДАНИЮ УСТОЙЧИВЫХ К ФЕРМЕНТАТИВНОМУ ГИДРОЛИЗУ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ
Валуева Т.А., Валуев Л.И., Валуев И.Л. 153

ТЕЗИСЫ СТЕНДОВЫХ ДОКЛАДОВ

Секция 1: Выделение, очистка, характеризация белков и пептидов. Пептидомика. Протеомика

1. 10-ЦИСТЕИНОВЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM KIHARAE*: РОЛЬ В ОТВЕТЕ НА СТРЕСС И ПРОИСХОЖДЕНИЕ
Андреев Я.А., Коростылева Т.В., Одинцова Т.И., Егоров Ц.А., Гришин Е.В. 157

2. ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ УБИКВИТИНИРОВАННЫХ БЕЛКОВ МИТОХОНДРИЙ МОЗГА МЫШИ В НОРМЕ И ПРИ ВВЕДЕНИИ НЕЙРОТОКСИНА МРТР
Бунеева О.А., Копылов А.Т., Згода В.Г., Неробкова Л.Н., Капица И.Г., Непоклонов А.В., Медведев А.Е. 158

3. СУБСТРАТ-СВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА С-КОНЦЕВЫХ МОДУЛЕЙ ЛАМИНАРИНАЗЫ LIC16A *CLOSTRIDIUM THERMOCELLUM*
Дворцов И.А., Лунина Н.А., Великодворская Г.А. 159

4. ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ИЗМЕНЕНИЯ БЕЛКОВ-МАРКЕРОВ НЕОСМОТИЧЕСКОГО ДЕПОНИРОВАНИЯ НАТРИЯ У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ
Доброхотов И.В., Валеева О.А., Пастушкова Л.Х., Николаев Е.Н., Попов И.А., Кононихин А.С., Иванисенко В.А., Ларина И.М. 160

5. ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТ-СОДЕРЖАЩИХ ПРОТЕОГЛИКАНОВ КУЛЬТУРЫ МИОБЛАСТОВ L6J1
Ермакова И.И., Сакута Г.А., Федорова М.А., Морозов В.И. 161

6. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЦИТОСКЕЛЕТНОГО БЕЛКА ЗИКСИНА С РЕЦЕПТОРОМ HEDGEHOG КАСКАДА PATCHED 2 В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ ЦНС *XENOPUS LAEVIS*
Мартынова Н.Ю., Ермолина Л.В., Зарайский А.Г. 162

7. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТРАНСКРИПЦИОННОГО РЕГУЛЯТОРА SOXD С ГОМЕОДОМЕННЫМ ФАКТОРОМ XANF1 В РАННЕМ РАЗВИТИИ ПЕРЕДНЕГО МОЗГА У ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ
Мартынова Н.Ю., Ерошкин Ф.М., Зарайский А.Г. 163

8. ПРОТЕОМНЫЙ СОСТАВ И ФУНКЦИИ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВОЙ ОРГАНЕЛЛЫ PING-BODY, ОБНАРУЖЕННОЙ В ПЕРВИЧНЫХ СПЕРМАТОЦИТАХ *DROSOPHILA MELANOGASTER*
Оленина Л.В., Кибанов М.В., Егорова К.С., Рязанский С.С., Соколова О.А., Котов А.А., Оленкина О.М., Гвоздев В.А. 164

9. ПОЛУЧЕНИЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ И БЕЛКОВЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ ИЗ ГИДРОБИОНТОВ БАРЕНЦЕВА МОРЯ
Рысакова К.С., Лыжов И.И., Новиков В.Ю. 165

10. ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПРОДУКТА ГЕНА 145 НА ЧАСТИЦЕ БАКТЕРИОФАГА phiKZ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
Сыкилинда Н.Н., Курочкина Л.П., Кадыков В.А. 166

11. ПОИСК БЕЛКОВ-ПАРТНЁРОВ МАЛОЙ ГТФазы НОВОГО СЕМЕЙСТВА RAS-DVA
Терёшина М.Б., Мартынова Н.Ю., Зарайский А.Г. 167

12. ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ПРОТЕОМА КРОВИ ЗДОРОВОГО ЧЕЛОВЕКА
Трифонова О.П., Пахарукова Н.А., Пастушкова Л.Х., Мошковский С.А., Лисица А.В., Ларина И.М. 167

Секция 2: Химия белков и пептидов. Методы синтеза, химическая модификация

13. УДОБНЫЙ И ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД ВВЕДЕНИЯ N^{ind}-ФОРМИЛЬНОЙ ЗАЩИТНОЙ ГРУППЫ В МОЛЕКУЛУ ТРИПТОФАНА И НОВАЯ ПОБОЧНАЯ РЕАКЦИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ H-Trp(N^{ind}-For)-OH В ТВЁРДОФАЗНОМ ПЕПТИДНОМ СИНТЕЗЕ
Азев В.Н., Чулин А.Н., Мустаева Л.Г., Горбунова Е.Ю., Родионов И.Л. 170

14. ПЕПТИД m 879 – ИНГИБИТОР ИНТЕГРАЗЫ ИЗ HIV-I
Елякова Л.А., Васьковский Б.В., Ванцева С.И., Гаранин С.К. 171

15. ПОДХОДЫ К СИНТЕЗУ КОНЪЮГАТОВ АРГИНИНСОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДОВ С ГЕМИНОМ И ИХ АНТИГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ
Желтухина Г.А., Окороченков С.А., Арзуманян В.Г., Небольсин В.Е.....172

16. N-АЦИЛИРОВАННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ИНСУЛИНА И ЕГО ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ АНАЛОГОВ
Зинченко А.А., Мелихова Т.Д., Гордеева Е.А., Нокель Е.А., Красильщикова М.С., Михалев А.В., Зиганшин Р.Х., Шибанова Е.Д. 173

17. СИНТЕЗ ГК-2 – ДИПЕПТИДНОГО ДИМЕРНОГО МИМЕТИКА ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ
Курилов Д.В., Помогайбо С.В., Гудашева Т.А. 174

18. ИНГИБИТОРЫ КАСПАЗ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПЕПТИДОМЕТИЛКЕТОНОВ
Мартинович В.П., Грибовская О.В., Голубович В.П., Бурая Т.А., Янченко В.В. 175

19. ПОБОЧНЫЕ РЕАКЦИИ В ХОДЕ СИНТЕЗА АПЕЛИНА-12 И ЕГО АНАЛОГОВ И ПУТИ ИХ ПРЕОДОЛЕНИЯ
Палькеева М.Е., Сидорова М.В., Азьмуко А.А., Молокоедов А.С., Бушуев В.Н., Беспалова Ж.Д. 176

20. ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ ДЭЦ С АЛЬБУМИНОМ ЧЕЛОВЕКА, НО НЕ С АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНОМ И АЛЬБУМИНАМИ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ
Панова И.Г., Татиколов А.С. 177

21. МУЛЬТИПЛЕТНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ В ОБРАЗОВАНИИ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ И КОМПЛЕКСНЫХ ЛИГАНДОВ
Скляров Л.Ю., Козин С.А., Градюшко А.Т., Вагида М.С., Казанский Д.Б. 178

22. ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД СИНТЕЗА β-ФЛУОРЕНИЛМЕТИЛОВОГО ЭФИРА АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ
Чулин А.Н., Азев В.Н., Мустаева, Л.Г., Родионов И.Л. 179

23. СИНТЕЗ АНАЛОГОВ ЛЮЛИБЕРИНА И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СИСТЕМАХ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ГЕНОВ
Яблокова Т.В., Челушкин П.С., Дорош М.Ю., Орлов С.В., Ефремов А.М., Буров С.В. 180

Секция 3: Биотехнология (конструирование и получение рекомбинантных белков и пептидов)

24. КОНСТРУИРОВАНИЕ ФНО-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ ДОМЕНА ФИБРОНЕКТИНА МЕТОДОМ ПЕРЕСАДКИ CDR
Крюкова Е.А., Петровская Л.Е., Шингарова Л.Н., Болдырева Е.Ф., Якимов С.А., Гурьянова С.В., Долгих Д.А., Кирпичников М.П.....182

25. СОЗДАНИЕ ПАНЕЛИ ТИРОЗИНОВЫХ КИНАЗ ДЛЯ ПОИСКА И ИЗУЧЕНИЯ НОВЫХ ХИМИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ
Липкин А.В., Ракитина Т.В., Юдкина О.В., Осипов Е.М., Чилов Г.Г.....183

26. КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГИРУДИНА В РАСТЕНИЯХ РЯСКИ МАЛОЙ (*LEMNA MINOR*)
Таранов А.И., Фирсов А.П., Долгов С.В.....184

27. КОНСТРУИРОВАНИЕ И ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ДЕЛЕЦИОННЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА *DRGA* ЦИАНОБАКТЕРИИ *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC 6803 И ИХ ГИБРИДОВ С ГЕНАМИ, КОДИРУЮЩИМИ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ
Топорова В.А., Алешин А.В., Некрасов А.Н., Муронец Е.М., Лукашев Е.П., Тимофеев К.Н., Долгих Д.А., Еланская И.В. 185

28. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА CIS ДИСПЛЕЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ TNF-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ ДОМЕНА ФИБРОНЕКТИНА
Шингарова Л.Н., Петровская Л.Е., Ключарева А.Ю., Крюкова Е.А., Болдырева Е.Ф., Хабибуллина Н.Ф., Долгих Д.А., Кирпичников М.П.....186

Секция 4: Физико-химические и компьютерные методы исследования. Пространственная структура и динамика. Биоинформатика

29. МОДЕЛИРОВАНИЕ ФОРМЫ И РАДИАЛЬНОЙ ПЛОТНОСТИ БЕЛКА α-КРИСТАЛЛИНА ПО КРИВЫМ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ
Амарантов С.В., Волков В.В., Налётова И.Н., Аттанасио Ф. 188

30. ТРИТИЕВАЯ ПЛАНИГРАФИЯ. ОТЛИЧИЯ В ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЕ БЕЛКА М1 ВИРУСА ГРИППА В КРИСТАЛЛЕ, РАСТВОРЕ И ВИРИОНЕ
Богачева Е.Н., Долгов А.А., Чуличков А.Л., Шишков А.В., Ксенофонтов А.Л., Федорова Н.В., Баратова Л.А. 189

31. СТЕРЕОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СИЛЬНО СКРУЧЕННЫХ И ИЗОГНУТЫХ ββ-ШПИЛЕК В ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКАХ
Бражников Е.В., Ефимов А.В. 190

32. ПРОСТРАНСТВЕННАЯ МОДЕЛЬ КОМПЛЕКСА ИНГИБИТОРА ФОТОСИНТЕЗА И ФОТОСИСТЕМЫ II ИЗ *THERMOSYNECHOCOCCUS ELONGATES*
Габдулхаков А.Г., Донцова М.В., Зенгер В.....191

33. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ И СВОЙСТВА БЕЛКОВ КРОВИ В ВОДНЫХ ДИСПЕРСИЯХ НАНОУГЛЕРОДА
Горюнов А.С., Рожков С.П., Борисова А.Г., Суханова Г.А. 192

34. АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОМИМЕТИКОВ
Горячева Е.А., Архипова С.Ф., Артемьев И.В., Плетнев В.З. 193

35. ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ СТРУКТУРЫ МАТРИКСНОГО М1-БЕЛКА ВИРУСА ГРИППА В РАСТВОРЕ
Ксенофонтов А.Л., Федорова Н.В., Добров Е.Н., Богачева Е.Н. 194

36. РОЛЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ В ОБЪЕМНОЙ БИОРЕГУЛЯЦИИ
Курзанов А.Н. 195

37. ХРОМОФОР-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЖЕЛТЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ
Мартынов В.И., Пахомов А.А. 196

38. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АНОМАЛЬНОЙ ТЕПЛОВОЙ АГРЕГАЦИИ GFP
Молочков Н.В., Мельник Б.С., Прохоров Д.А., Уверский В.Н., Кутышенко В.П. 197

39. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПЕПТИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНТРОЛИРУЕМОЙ ФРАГМЕНТАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ИОНОВ ПРИ ЭЛЕКТРОРАСПЫЛЕНИИ РАСТВОРОВ
Назимов И.В., Новиков А.В., Бубляев Р.А., Краснов Н.В. 198

40. ПРОГРАММНО-АППАРАТНЫЙ КОМПЛЕКС РАСПОЗНАВАНИЯ ФРАГМЕНТНЫХ МАСС-СПЕКТРОВ ПЕПТИДОВ НА ОСНОВЕ ПРОТЕОМНЫХ БАЗ ДАННЫХ – PROTEOS
Назимов И.В., Присяч С.С., Фиронов С.В. 199

41. ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТНОЙ ЗАМЕНЫ ПРО^{11}-АЛА^{11} НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА БУФОРИНА 2: ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ
Науменкова Т.В. 200

42. КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА L1-ВЫСТУПА РИБОСОМЫ С РАЗРЕШЕНИЕМ 2.0 Å
Невская Н.А., Сарских А.В., Костарева О.С., Никонова Е.Ю., Габдулхаков А.Г., Тищенко С.В., Гарбер М.Б., Никонов С.В. 201

43. СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ УЧАСТКА СВЯЗЫВАНИЯ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТА БЕЛКОМ HFQ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
Никулин А.Д., Гарбер М.Б., Никонов С.В., Мурина В.Н. 202

44. БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ОБЪЯСНЕНИЮ АЛЛОРЕАКТИВНОСТИ КАК ПРОЯВЛЕНИЯ ПЕРЕКРЕСТНОЙ РЕАКТИВНОСТИ Т-КЛЕТОК С ВИРУСНЫМИ БЕЛКАМИ
Новоселецкий В.Н., Абрамов В.Ю. 203

Секция 5: Биологическая активность. Методы тестирования

45. ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ПРОДИГИОЗИНА
Андреева И.Н., Рязанцева И.Н., Захарченко Н.Л., Огородникова Т.И. 205

46. ВВЕДЕНИЕ СЕМАКСА В ТЕЧЕНИЕ 3–4 НЕДЕЛЬ ЖИЗНИ КРЫС ОСЛАБЛЯЕТ НЕГАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ ХРОНИЧЕСКОЙ МАТЕРИНСКОЙ ДЕПРИВАЦИИ
Володина М.А., Глазова Н.Ю., Себенцова Е.А., Манченко Д.М., Левицкая Н.Г., Андреева Л.А., Каменский А.А. 206

47. АНТИДЕПРЕССАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ АНАЛОГА С-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА АРГИНИН-ВАЗОПРЕССИНА – ТЕТРАПЕПТИДА N-Ac-D-MET-PRO-ARG-GLY-NH2
Воскресенская О.Г., Голубович В.П., Каменский А.А. 207

48. НОВЫЕ ФУНКЦИИ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА NOGGIN: ИНГИБИРОВАНИЕ СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДОВ TGF-β И WNT
Ерошкин Ф.М., Байрамов А.В., Мартынова Н.Ю., Ермакова Г.В., Соловьева Е.А., Зарайский А.Г. 208

49. РАЗРУШЕНИЕ БИОПЛЕНОК СТАФИЛОКОККОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО КАТИОННОГО ПЕПТИДА ВАРНЕРИНА
Полюдова Т.В., Лемкина Л.М., Коробов В.П. 209

50. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АКТИВАЦИИ АУТОЛИЗИНОВ БАКТЕРИЙ *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* КАТИОННЫМ ПЕПТИДОМ ВАРНЕРИНОМ И ДЕТЕРГЕНТАМИ
Филатова Л.Б., Лемкина Л.М., Полюдова Т.В., Коробов В.П. 210

51. ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРИРОДНЫХ АНАЛЬГЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ АНЕМОНЫ *HETERACTIS CRISPA*
Королькова Ю.В., Мошарова И.В., Андреев Я.А., Гришин Е.В. 211

52. ВЛИЯНИЕ N-КОНЦЕВЫХ МОДИФИКАЦИЙ α-КОНОТОКСИНА MII НА ЕГО ФИЗИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ
Крюкова Е.В., Сурин А.М., Струков А.С., Жмак М.Н., Кашеверов И.Е. ...212

53. РОЛЬ ИОНОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО КАЛЬЦИЯ НА РАННИХ СТАДИЯХ ПОЛИКЛОНАЛЬНОЙ АКТИВАЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*
Литвинов И.С., Мерсиянова И.В., Кирпичников М.П. 213

54. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ РАСЩЕПЛЕНИЯ БЕЛКОВ
Мухин В.А., Пискунович Д.И. 214

55. ОТСТАВЛЕННОЕ ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ СОЙМОРФИН-5-АМИДА НА ОБУЧЕНИЕ С ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМ ПОДКРЕПЛЕНИЕМ
Сарычева Н.Ю., Иванова Е.А., Дубынин В.А., Каменский А.А., Калихевич В.Н., Ардемасова З.А. 215

56. УРОВЕНЬ ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА В ТКАНЯХ РЫБ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ СРЕДЫ
Суховская И.В., Смирнов Л.П., Борвинская Е.В., Немова Н.Н. 216

57. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА ВНУТРИ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ МИКРОКАПСУЛ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ pH СРЕДЫ
Шабарчина Л.И., Дубровский А.В., Санталова И.М., Казакова Л.И., Мошков Д.А., Аполонник Н.В. 217

Секция 6: Взаимосвязь структура – функция. Механизмы действия

58. МЕХАНИЗМ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ СЕЛЕКТИВНОСТИ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Т ИЗ *THERMOACTINOMYCES VULGARIS*
Акпаров В.Х., Тимофеев В.И., Куранова И.П. 219

59. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НОВОГО АНАЛОГА ФРАГМЕНТА АКТГ НА УРОВЕНЬ ТРЕВОЖНОСТИ ЖИВОТНЫХ В НОРМЕ И НА ФОНЕ ОСТРОГО СТРЕССОГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ
Глазова Н.Ю., Левицкая Н.Г., Атанов М.С., Себенцова Е.А., Андреева Л.А., Манченко Д.М., Мясоедов Н.Ф. 220

60. ВЗАИМОСВЯЗЬ СТРУКТУРЫ И ШАПЕРОНО-ПОДОБНОЙ АКТИВНОСТИ БЕТА-КАЗЕИНА
Захарченко Н.Л., Коннова Т.А., Гоголева Н.Е., Зуев Ю.Ф., Haertlé T. 221

61. ВЛИЯНИЕ ФРАГМЕНТА КОЛЛАГЕНА НА МОРФОЛОГИЮ И ЦИТОСКЕЛЕТ ФИБРОБЛАСТОВ МЫШИ
Иванова В.П., Ковалева З.В., Анохина В.В., Сорочинская Е.И., Кривченко А.И. 222

62. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЛИЯНИЯ ЭПИТАЛОНА И МЕЛАТОНИНА НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРЫС
Илюха В.А., Виноградова И.А., Ильина Т.Н., Узенбаева Л.Б., Хижкин Е.А., Кижина А.Г., Анисимов В.Н., Хавинсон В.Х. 223

63. НОВЫЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БЕЛКОВ С НЕИЗВЕСТНОЙ ФУНКЦИЕЙ
Горбачева М.А., Ярош А.Г., Корженевский Д.А., Яковлев А.К., Дороватовский П.В., Липкин А.В. 224

64. ОЦЕНКА МЕХАНИЗМОВ ВЛИЯНИЯ АНАЛОГА АКТГ(4-10) СЕМАКСА НА СТРЕСС-ВЫЗВАННЫЕ АНАЛЬГЕЗИЮ И ПОВЕДЕНИЕ БЕЛЫХ КРЫС
Манченко Д.М., Виленский Д.А., Левицкая Н.Г., Андреева Л.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. 225

65. НОВЫЕ МОДУЛЯТОРЫ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ
Никольский А.С., Василевский А.А., Гришин Е.В. 226

66. РИБОСОМ-ЗАВИСИМАЯ ГТФаза В НЕАКТИВНОМ СОСТОЯНИИ СПОСОБНА СВЯЗЫВАТЬ ГТФ
Никонов О.С., Столбоушкина Е.А., Никулин А.Н., Лазопуло А.М., Лазопуло С.М., Гарбер М.Б., Никонов С.В. 227

67. СВЯЗЬ ДЛИНЫ МЕЖДОМЕННОЙ ПЕРЕТЯЖКИ С КОНФОРМАЦИЕЙ РИБОСОМНОГО БЕЛКА L1
Никонова Е.Ю., Шкляева А.А., Костарева О.С., Габдулхаков А.Г., Тищенко С.В., Невская Н.А., Гарбер М.Б., Никонов С.В. 228

68. ДЕЛЬТА-СОН ИНДУЦИРУЮЩИЙ ПЕПТИД (ДСИП) И ЕГО АНАЛОГИ В КАЧЕСТВЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ПРОТЕКТИВНЫХ СРЕДСТВ ПРИ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЦИТОСТАТИКОВ
Оноприенко Л.В., Михалева И.И., Прудченко И.А., Ефремов Е.С., Чикин Л.Д., Якубовская Р.И., Немцова Е.Р., Безбородова О.А. 229

69. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ МАКРОФАГОВ МОДИФИЦИРОВАННЫМИ ПЕПТИДНЫМИ ФРАГМЕНТАМИ IL-2 ЧЕЛОВЕКА
Оноприенко Л.В., Михалева И.И., Войтенков Б.О., Иванов В.Т. 230

70. СТЕРЕОСЕЛЕКТИВНОСТЬ МУТАНТНЫХ ФОРМ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗЫ ИЗ *E.COLI* αS149R И βF71L В РЕАКЦИЯХ АЦИЛИРОВАНИЯ АМИНОСОЕДИНЕНИЙ
Панин Н.В., Щербакова Т.А., Гуранда Д.Ф., Швядас В.К. 231

71. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДИСТАМИЦИНА А С ХРОМАТИНОМ ЯДЕР ГЕПАТОЦИТОВ КРЫСЫ И ВЛИЯНИЕ НА МОДИФИКАЦИИ ГИСТОНОВ Н1 И Н3
Смирнова Т.А., Прусов А.Н., Коломийцева Г.Я., Ванюшин Б.Ф. 232

72. БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ЦИТОХРОМА *C* : ДВА ПОДХОДА К ИЗУЧЕНИЮ САЙТОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С КОМПЛЕКСАМИ III И IV ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ
Черткова Р.В., Островерхова Т.В., Некрасов А.Н., Долгих Д.А., Кирпичников М.П.....233

73. ОЛИГОПЕПТИДНЫЕ АНАЛОГИ ПРОТЕИНА А: ПРОГНОЗ, СИНТЕЗ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С IgG
Шутова И.В., Мартинович В.П., Ермола Е.М., Рудаковская А.Г., Лапко А.В., Макаревич Д.А., Голубович В.П. 234

Секция 7: Химия и биология протеолитических ферментов

74. ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА АДАМАЛИЗИНОПОДОБНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ *BACILLUS PUMILUS 3-19*
Балабан Н.П., Рудакова Н.Л., Данилова Ю.В., Шарипова М.Р.....236

75. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, НЕСУЩИХ ВСТРОЕННЫЙ ГЕН ИНГИБИТОРА СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ ИЗ СЕМЯН ГРЕЧИХИ
Хадеева Н.В., Дунаевский Я.Е., Яковлева Е.Ю., Белозерский М.А. 237

76. РОЛЬ АНТИОКСИДАНТОВ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА И ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ИНВАЗИИ БАКТЕРИЙ, ПРОДУЦЕНТОВ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ
Божокина Е.С., Вахромова Е.А. , Гамалей И.А. , Хайтлина С.Ю. 238

77. ЭКСПРЕССИЯ КАСПАЗ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ОБРАБОТКЕ КОМБИНАЦИЯМИ ЦИТОСТАТИКОВ С СИСТЕМНЫМИ КОРТИКОСТЕРОИДАМИ
Волкова Т.О., Багина У.С., Курмышкина О.В., Немова Н.Н. 239

78. ДЕЙСТВИЕ ЭНДОГЕННОГО ИНГИБИТОРА ПРОТЕИНАЗ ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА НА КУЛЬТУРЫ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК
Голышев С.А., Кузнецов С.А., Куранова И.П., Руденская Г.Н. 240

79. ПРОПЕПТИД ПРОТЕАЛИЗИНА ВЫПОЛНЯЕТ ФУНКЦИЮ ФОЛДИНГ-АССИСТЕНТА
Громова Т.Ю., Демидюк И.В., Костров С.В. 241

80. ПЕПТИДАЗЫ ГРИБОВ И ИХ СВЯЗЬ С ПАТОГЕННОСТЬЮ
Дунаевский Я.Е., Дубовенко А.Г., Семенова Т.А., Белозерский М.А., Элпидина Е.Н. 242

81. МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОТЕОЛИЗА ФИБРИНОГЕНА ТРОМБИНОМ
Завьялова Е.Г., Копылов А.М. 243

82. L-КАТЕПСИН ИЗ КИШЕЧНИКА ЛИЧИНКИ *DERMESTES MACULATUS*
Калиберда Е.Н., Барановская А.Ю., Румш Л.Д.....244

83. ЭВОЛЮЦИОННАЯ МОДЕЛЬ СЕКРЕЦИИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ У ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ
Кудрявцева Н.Н., Гвоздева Е.Л., Иевлева Е.В., Ревина Т.А., Софьин А.В., Валуева Т.А.....245

84. УЧАСТИЕ Ca^{2+}-АКТИВИРУЕМЫХ И ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ И ПЕПТИДАЗ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ЛОСОСЯ *SALMO SALAR SEBAGO*
Кяйвяряйнен Е.И., Крупнова М.Ю., Немова Н.Н.....246

85. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ *PROTEUS MIRABILIS*
Марданова А.М., Бондырева Н.М. 247

86. РОЛЬ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ N И АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА В СИСТЕМЕ ГЕМОСТАЗА ОНКОЛОГИЧЕКИХ БОЛЬНЫХ
Постнова Т.Ю., Генгин М.Т. 248

87. ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ОЛИГОМЕРА Lon-ПРОТЕИНАЗЫ *E. COLI* РОЛЬ N-КОНЦЕВОЙ ОБЛАСТИ В РЕАЛИЗАЦИИ ПРОЦЕССИВНОГО ПРОТЕОЛИЗА
Морозкин А.Д., Ротанова Т.В. 249

88. ЭКСПРЕССИЯ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ – ММП-1, ММП-2, ММП-9 И ИХ ЭНДОГЕННЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЕ ШЕЙКИ МАТКИ
Рыжакова О.С., Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю., Соловьева Н.И.....250

89. ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ФИТОГОРМОНОВ НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ИНГИБИТОРОВ ТРИПСИНА ПРИ ХОЛОДОВОЙ АДАПТАЦИИ ПШЕНИЦЫ
Титов А.Ф., Фролова С.А., Таланова В.В., Венжик Ю.В. 251

90. ВЛИЯНИЕ ЛЕЙ^{5}-ЭНКЕФАЛИН-АРГ^{6} НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ОБМЕНА РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ В МОЗГЕ КРЫС
Фирстова Н.В., Сметанин В.А., Бардинова Ж.С., Стёксова Н.А., Латынова И.В., Генгин М.Т.....252

91. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА СЕКРЕТИРУЕМОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ *B.PUMILUS 3-19*
Шарипова М.Р., Сабирова А.Р., Шагимарданова Е.И., Черемин А.М. 253

92. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕОЛИЗА НЕКОТОРЫХ АНАЛОГОВ СЕМАКСА
Шевченко К.В., Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Мясоедов Н.Ф. 254

Секция 8: Создание новых лекарственных средств

93. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕПТИДОВ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ
Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф.....256

94. ГИДРОЛИТИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ ПЕПТИДОВ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ КРЫСЫ
Безуглов В.В., Назимов И.В., Грецкая Н.М., Дейгин В.И., Акимов М.Г. 257

95. ВЫБОР УСЛОВИЙ ПРОВЕДЕНИЯ ГИДРОЛИЗА ФАРША МОРСКИХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПРЕСНОВОДНЫХ РЫБ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВОГО ПРЕПАРАТА, ОБЛАДАЮЩЕГО ВЫСОКОЙ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ
Крупнова М.Ю., Немова Н.Н., Мухин В.А. 258

96. КОРТАГЕН КАК НЕЙРОПРОТЕКТОР ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНСУЛЬТЕ У КРЫС
Гаврилова С.А., Шрам С.И., Новицкая Ю.А., Гранстрем О.К. 259

97. СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОСТАТРОПНОГО ПЕПТИДНОГО ПРЕПАРАТА «ПРОСТАМАКС»
Пахомова А.В., Румпель О.А., Гранстрем О.К., Боровская Т.Г. 260

98. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЕПТИДНОГО ПРЕПАРАТА «КОРТАГЕН» ПРИ ГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННЫХ СНИЖЕНИЯХ КОГНИТИВНЫХ СПОСОБНОСТЕЙ
Румпель О.А., Пахомова А.В., Гранстрем О.К., Боровская Т.Г. 261

99. ИССЛЕДОВАНИЕ АНКСИОЛИТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ СЕЛАНКА ПРИ СОВМЕСТНОМ ВВЕДЕНИИ С БЕНЗОДИАЗЕПИНАМИ
Мешавкин В.К., Балашов А.М., Ларионова А.В., Кост Н.В., Терещенко О.Н., Беляева М.Л., Мешавкина М.А., Хрущова О.Н., Мясоедов Н.Ф. 262

ШКОЛА МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

ТЕЗИСЫ СТЕНДОВЫХ ДОКЛАДОВ

Секция 1: Выделение, очистка, характеризация белков и пептидов. Пептидомика. Протеомика

Ш1. ЗАЩИТНЫЕ ПЕПТИДЫ ОДУВАНЧИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО (*TARAXACUM OFFICINALE* WIGG.)
Астафьева А.А., Рогожин Е.А., Егоров Ц.А. 265

Ш2. ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ, СОДЕРЖАЩИХ ФАКТОР ТРАНСКРИПЦИИ КАИЗО
Байкалова Е.А., Женило С.В., Прохорчук Е.Б.....266

Ш3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХИТОЗАНА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ β-ЛАКТОГЛОБУЛИНА ИЗ СМЕСИ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ МОЛОКА
Бакулин А.В., Гавриленко Н.В., Червяковский Е.М., Курченко В.П., Варламов В.П. 267

Ш4. ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ *MYCOPLASMA HOMINIS* PG37 НА СТРЕССОРЫ: СЕКРЕЦИЯ МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ И РЕОРГАНИЗАЦИЯ ПРОТЕОМА
Баранова Н.Б., Медведева Е.С., Музыкантов А.А., Горшков О.В., Шаймарданова Г.Ф., Чернов В.М., Чернова О.А. 268

Ш5. ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛУТАТИОН S-ТРАНСФЕРАЗЫ ПЕЧЕНИ ЩУКИ
Борвинская Е.В., Смирнов Л.П., Немова Н.Н. 269

Ш6. ТЕПЛОВАЯ АГРЕГАЦИЯ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА
Борзова В.А. 270

Ш7. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОТЕОМА И СЕКРЕТОМА БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА *TRAMETES HIRSUTA* ПРИ РОСТЕ НА СРЕДАХ РАЗНОГО СОСТАВА
Васина Д.В., Федорова Т.В., Королева О.В. 271

Ш8. ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ ГАПОНИНА И ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА БЫКА *BOS TAURUS*
Воробьева Е.Е., Костанян И.А., Гринкевич В.А., Липкин В.М. 272

Ш9. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ОХАРАКТЕРИЗАЦИЯ РИЦИНА И ПРОДУКТОВ ЕГО ДЕГРАДАЦИИ В ВОДНОЙ СРЕДЕ
Гладилович В.Д., Краснов К.А., Подольская Е.П. 273

Ш10. ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЦА БЫКА *BOS TAURUS*. АНАЛИЗ БЕЛКОВ ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЫ
Громова Е.В., Поляков Н.Б., Гринкевич В.А. 274

Ш11. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТАЛЛ-АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ АЛКИЛИРОВАННЫХ АДДУКТОВ ГЛОБИНА КРЫСЫ
Дубровский Я.А., Гладилович В.Д., Краснов И.А., Мурашко Е.А., Подольская Е.П., Бабаков В.Н., Гончаров Н.В. 275

Ш12. ПРОТЕОМНЫЙ ОТВЕТ КОРНЕЙ ГОРОХА НА ДЕЙСТВИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И МЕТИЛЖАСМОНАТА
Егорова А.М., Яковлева В.Г. 276

Ш13. СЕРПИН Н1 – ПРОДУКТ ГЕНА *SERPINH1* – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ БИОМАРКЕР РАКОВОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ В ЭПИТЕЛИОПОДОБНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЧЕЛОВЕКА
Иванов А.В., Еремина Л.С., Лисицкая К.В., Хряпова Е.В., Торопыгин И.Ю., Ковалева М.А., Ковалев Л.И., Шишкин С.С. 277

Ш14. ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВОГО ХИТИНАЗОПОДОБНОГО БЕЛКА КРЫСЫ В МОДЕЛИ ОСТРОГО ВОСПАЛЕНИЯ
Ильницкая Е.В., Радченко В.В., Родионова А.С., Шуваева Т.М., Липкин В.М. 278

Ш15. ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРЛЕКАНА ИЗ ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА
Комарова М.С., Ермакова И.И. 279

Ш16. ЛЕКТИН ИЗ МИДИИ *MYTILUS TROSSULUS*: ВЫДЕЛЕНИЕ И ОСНОВНЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
Кондрашина А.С., Чикаловец И.В., Черников О.В. 280

Ш17. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОБНАРУЖЕНИЯ АДДУКТОВ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ КРЫСЫ
Краснов И.А., Гладилович В.Д., Дубровский Я.А., Войтенко Н.Г., Бабаков В.Н., Подольская Е.П., Гончаров Н.В. 281

Ш18. НОВЫЕ ПОЛИПЕПТИДНЫЕ ИНСЕКТОТОКСИНЫ ИЗ ЯДА ПАУКА *LACHESANA TARABAEVI*
Кузьменков А.И., Василевский А.А., Гришин Е.В. 282

Ш19. АДАПТАЦИЯ МИКОПЛАЗМ К ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ: ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ КЛЕТОК *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* PG8, ВЫРАЩЕННЫХ В ОПТИМАЛЬНЫХ И СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ
Медведева Е.С., Музыкантов А.А., Ефимова И.Р., Давыдова М.Н., Чернова О.А., Чернов В.М. 283

Ш20. ИССЛЕДОВАНИЕ НОВОГО ТРЕХПЕТЕЛЬНОГО ТОКСИНА ИЗ ЯДРА КОБРЫ *NAJA KAOUTHIA*
Мещерякова А.В., Кашеверов И.Е., Крюкова Е.В., Макарова Я.В., Осипов А.В., Уткин Ю.Н. 284

Ш21. ВЛИЯНИЕ КРАСНОГО ПИГМЕНТА НА АМИЛОИДИЗАЦИЮ ДРОЖЖЕВЫХ БЕЛКОВ
Михайлова Е.В., Артемов А.В., Сойдла Т.Р., Невзглядова О.В. 285

Ш22. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЛОБИНА КРЫСЫ И ЧЕЛОВЕКА С АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ *IN VITRO*: МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЦЕТИЛИРОВАННЫХ ЛИЗИНОВ
Мурашко Е.А., Шрейнер Е.В., Дубровский Я.А., Подольская Е.П., Бабаков В.Н., Гончаров Н.В. 286

Ш23. ПЕПТИДНЫЙ АНТИБИОТИК МИКРОЦИН С (МсС): ТРАНСПОРТ МсС И РОЛЬ БЕЛКА МссЕ МИКРОЦИНОВОГО ОПЕРОНА В КЛЕТКЕ
Новикова М., Серебрякова М., Метлицкая А., Северинов К. 287

Ш24. ПОЛИПЕПТИДНЫЙ АНАЛОГ БЛОКАТОРОВ ИОННЫХ КАНАЛОВ ИЗ ЯДА МОРСКОЙ АНЕМОНЫ *HETERACTIS CRISPA*
Осмаков Д.И., Козлов С.А., Кошелев С.Г., Козловская Э.П., Гришин Е.В. 288

Ш25. НОВЫЙ ИНГИБИТОР ХИМОТРИПСИНА ИЗ КЛУБНЕЙ КАТРОФЕЛЯ. ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА ПРИРОДНОГО И РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКОВ
Парфенов И.А., Валуева Т.А. 289

Ш26. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЕПТИДОВ ИЗ СЕМЯН И ЛИСТЬЕВ ЭФЕМЕРНОГО РАСТЕНИЯ – ЗВЕЗДЧАТКИ СРЕДНЕЙ (*STELLARIA MEDIA* L.)
Рогожин Е.А., Слезина М.П., Егоров Ц.А., Гришин Е.В. 290

Ш27. НОВЫЕ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ БАРАНА
Седов С.А., Белогурова Н.Г., Шиповсков С.В., Семёнова М.В., Гитинов М.М., Левашов А.В., Левашов П.А. 291

Ш28. ЦИТОХРОМЫ P450 СЕМЕЙСТВА CYP74 КУКУРУЗЫ
Топоркова Я.Ю., Горина С.С., Мухтарова Л.Ш., Гоголев Ю.В., Гречкин А.Н. 292

Ш29. МОДУЛЬНЫЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКИ НОВЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM KIHARAE*
Уткина Л.Л., Андреев Я.А., Пухальский В.А., Егоров Ц.А., Одинцова Т.И. 293

Секция 2: Химия белков и пептидов. Методы синтеза, химическая модификация

Ш30. ИЗУЧЕНИЕ МАСС-СПЕКТРОВ МЕТАСТАБИЛЬНОГО РАСПАДА ПЕПТИДОВ НИЗИНА И ЦЕКРОПИНА
Пыцкий И.С., Федоткина О.С., Буряк А.К. 295

Ш31. СИНТЕЗ, ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДОВ, ПРОИЗВОДНЫХ СЕРОТОНИНОВОГО РЕЦЕПТОРА 6-го ТИПА
Шпакова Е.А., Тарасенко И.И., Шпаков А.О., Власов Г.П. 296

Секция 3: Биотехнология (конструирование и получение рекомбинантных белков и пептидов)

Ш32. ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ АНТИТЕЛ ЧЕЛОВЕКА ПРОТИВ ГАММА-ИНТЕРФЕРОНА
Вихрова М.А. 298

Ш33. КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДИВИНИЛЭФИРСИНТАЗЫ NTDES ТАБАКА (*NICOTIANA TOBACUM*)
Ермилова В.С., Осипова Е.В., Ланцова Н.В., Гоголев Ю.В., Гречкин А.Н. 299

Ш34. ПОЛУЧЕНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *DEINOCOCCUS RADIODURANS*
Есюнина Д.М., Кульбачинский А.В. 300

Ш35. ЭКСПРЕССИЯ FAB-ФРАГМЕНТОВ АНТИТЕЛ, СВЯЗАННЫХ С МЕМБРАНОЙ, В ДРОЖЖАХ *P.PASTORIS*
Захаров А.В., Смирнов И.В., Бобик Т.В., Пономаренко Н.А., Габибов А.Г. 301

Ш36. ПОЛУЧЕНИЕ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНОЙ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНОЙ АРХЕИ *THERMOCOCCUS SIBIRICUS*
Зейфман Ю.С., Эльцина А.А., Черкашин Е.А. 302

Ш37. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО ХИТОЗАНА С БЕЛКОМ Aspf2
Зубарева А.А., Свирщевская Е.В., Парыгина Н.А., Варламов В.П. 303

Ш38. ПОЛУЧЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО [LEU1, THR2]-63-ДЕСУЛЬФАТОГИРУДИНА-1 ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ
Костромина М.А., Есипов Р.С. 304

Ш39. ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО МНС КЛАССА II В КЛЕТКАХ НАСЕКОМЫХ И ДРОЖЖАХ
Мамедов А.Э., Воробьева Н.Е., Белогуров А.А., Пономаренко Н.А., Габибов А.Г. 305

Ш40. ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ КАТАЛИТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К ГЛИКОПРОТЕИНУ GP120 ВИЧ-1, В ДРОЖЖЕВОЙ СИСТЕМЕ
Мокрушина Ю.А., Смирнов И.В., Решетняк А.В., Бобик Т.В., Пономаренко Н.А., Габибов А.Г. 306

Ш41. ВЛИЯНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКА Hfq НА ЕГО СТРУКТУРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ
Мурина В.Н., Селиванова О.М., Гарбер М.Б., Никонов С.В., Никулин А.Д. 307

Ш42. РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНАЛОГИ 4Cys ЗАЩИТНЫХ ПЕПТИДОВ РАСТЕНИЙ
Опарин П.Б., Беркут А.А., Василевский А.А., Гришин Е.В., Егоров Ц.А. 308

Ш43. МУТАНТНЫЕ OmpF ПОРИНЫ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* С ДЕЛЕЦИЯМИ НАРУЖНЫХ ПЕТЕЛЬ: СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ, ЭКСПРЕССИЯ, ВЫДЕЛЕНИЕ, РЕФОЛДИНГ
Сидорова О.В., Чистюлин Д.К., Хоменко В.А., Портнягина О.Ю., Исаева М.П., Новикова О.Д. 309

Ш44. НОВОЕ МУЛЬТИГЕННОЕ СЕМЕЙСТВО АКТИНОПОРИНОВ (Hct-S) АКТИНИИ *HETERACTIS CRISPA*
Ткачева Е.С., Еськов А.А., Лейченко Е.В., Исаева М.П., Монастырная М.М., Козловская Э.П. 310

Ш45. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЭСТЕРАЗ ИЗ ТЕРМОФИЛЬНОЙ АРХЕИ *THERMOCOCCUS SIBIRICUS*
Черкашин Е.А., Тамаркин М. 311

Ш46. КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ В *E.COLI* ФЕРМЕНТОВ ИЗ ТЕРМОФИЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ
Черкашина А.С., Ларина Д.С., Егоров М.В. 312

Ш47. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА
Ярославцева А.К., Степаненко В.Н., Есипов Р.С. 313

Секция 4: Физико-химические и компьютерные методы исследования. Пространственная структура и динамика. Биоинформатика

Ш48. ВЫРАЩИВАНИЕ КРИСТАЛЛОВ РЕКОМБИНАНТНОЙ ТИМИДИНФОСФОРИЛАЗЫ *E. COLI* И ЕЕ КОМПЛЕКСА С ИНГИБИТОРОМ МЕТОДОМ ВСТРЕЧНОЙ ДИФФУЗИИ В НАЗЕМНЫХ УСЛОВИЯХ И В УСЛОВИЯХ НЕВЕСОМОСТИ
Абрамчик Ю.А., Тимофеев В.И., Муравьёва Т.И., Есипов Р.С., Куранова И.П. 315

Ш49. СРАВНЕНИЕ ПРОЦЕССА ОБРАЗОВАНИЯ АМИЛОИДОВ МУТАНТНОЙ ФОРМОЙ АЛЬБЕБЕТИНА В СВОБОДНОМ ВИДЕ И В СОСТАВЕ ГИБРИДНОГО БЕЛКА ТИОРЕДОКСИН – АЛЬБЕБЕТИН
Балобанов В.А., Егорова А.Г., Ильина Н.Б., Черткова Р.В., Долгих Д.А., Бычкова В.Е. 316

Ш50. ПОСТРОЕНИЕ И АНАЛИЗ СТРУКТУРНОГО ДРЕВА β-БЕЛКОВ, СОДЕРЖАЩИХ 3β-УГОЛКИ
Бошкова Е.А., Гордеев А.Б., Ефимов А.В. 317

Ш51. НОВЫЕ СТРУКТУРНЫЕ ДЕРЕВЬЯ (АЛЬФА + БЕТА)-БЕЛКОВ
Гордеев А.Б., Ефимов А.В. 318

Ш52. МОДЕЛИРОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ
Довидченко Н.В., Галзитская О.В. 319

Ш53. ВЛИЯНИЕ ИОНОВ НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЛЕЙ НА СТАБИЛЬНОСТЬ БЕЛКА К РАЗРУШЕНИЮ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОМ
Дурденко Е.В., Сабурова Е.А. 320

Ш54. МЕТОДЫ ЯВНОГО УЧЁТА МОЛЕКУЛ ВОДЫ ДЛЯ ПРЕДСКАЗАНИЯ СВЯЗЫВАНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЛИГАНДОВ С БЕЛКАМИ
Зейфман А.А., Новиков Ф.Н., Строганов О.В., Стройлов В.С., Чилов Г.Г. 321

Ш55. ПОСТРОЕНИЕ И АНАЛИЗ КОМПЬЮТЕРНЫХ ВЕРСИЙ СТРУКТУРНЫХ ДЕРЕВЬЕВ ДЛЯ βαβψ-МОТИВА И ψβαβ-МОТИВА
Каргатов А.М., Ефимов А.В. 322

Ш56. МОЛЕКУЛЯРНО-СТАТИСТИЧЕСКИЕ РАСЧЕТЫ И МАЛДИ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕПТИДОВ НА УГЛЕРОДНЫХ СОРБЕНТАХ
Кузнецова Е.С., Буряк А.К. 323

Ш57. СВОЙСТВА КСИЛАНАЗЫ Е МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *PENICILLIUM CANESCENS*
Логинов Д.С., Майсурадзе И.Г., Чулкин А.М., Федорова Т.В., Поляков К.М., Королева О.В. 324

Ш58. КРОССРЕАКТИВНОСТЬ АНТИТЕЛ, ОТОБРАННЫХ ИЗ ФАГ-ДИСПЛЕЙНОЙ БИБЛИОТЕКИ БОЛЬНЫХ РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ НА ОСНОВНОЙ БЕЛОК МИЕЛИНА С LMP1 ВИРУСА ЭПШТЕЙНА-БАРР
Ломакин Я.А., Захарова М.Ю., Белогуров А.А., Авакян М.Э., Дубровская В.В., Пономаренко Н.А., Тикунова Н.В., Габибов А.Г. 325

Ш59. N-КОНЦЕВАЯ ЧАСТЬ БЕЛКА ТБГ1 ГОРДЕИВИРУСА СОСТОИТ ИЗ ДВУХ ДОМЕНОВ С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ НЕУПОРЯДОЧЕННЫХ СТРУКТУР
Макаров В.В., Добров Е.Н., Калинина Н.О. 326

Ш60. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МОЛЕКУЛ ДИОКСАНА НА ГИДРАТНУЮ ОБОЛОЧКУ ПОЛИПЕПТИДОВ
Макшакова О.Н., Файзуллин Д.А, Зуев Ю.Ф. 327

Ш61. МОДЕЛИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПОКСИГЕНАЗ РАСТЕНИЙ И СВОБОДНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ
Осипова Е.В., Ермилова В.С., Ермакова Е.А., Гоглев Ю.В., Гречкин А.Н. 328

Ш62. ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО ОКРУЖЕНИЯ НА СИНТЕЗ ХРОМОФОРА В ХРОМОБЕЛКЕ asCP
Пахомов А.А., Мартынов В.И. 329

Ш63. РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФОРМ ПРИ СОЗРЕВАНИИ ХРОМОФОРА ЗЕЛЁНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА
Плетнева Н.В., Лукьянов К.А., Гурская Н.Г., Горячева К.А., Мартынов В.И., Плетнев В.З. 330

Ш64. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА СОРБЦИИ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ApoAI НА ПОВЕРХНОСТИ ПЕРФТОРУГЛЕРОДНОЙ ЭМУЛЬСИИ, СТАБИЛИЗИРОВАННОЙ ПРОКСАНОЛОМ 268
Покусаева В.О., Жалимов В.К., Склифас А.Н., Кукушкин Н.И. 331

Ш65. *IN SILICO* ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПОЛИПЕПТИДОВ КУНИТЦ-ТИПА КОМБИНАТОРНОЙ БИБЛИОТЕКИ АКТИНИИ *HETERACTIS CRISPA* С БОЛЕВЫМ ВАНИЛЛОИДНЫМ РЕЦЕПТОРОМ TRPV1
Табакмахер В.М., Чаусова В.Е., Зелепуга Е.А., Монастырная М.М., Исаева М.П., Козловская Э.П. 332

Ш66. РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФОСФОПАНТЕТЕИН АДЕНИЛИЛТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* В АПО-ФОРМЕ И В КОМПЛЕКСЕ С КОФЕРМЕНТОМ А И С ДЕФОСФОКОФЕРМЕНТОМ А
Тимофеев В.И., Смирнова Е.А., Чупова Л.А., Есипов Р.С., Куранова И.П. 333

Ш67. ПРИМЕНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИИ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПЕПТИДНЫХ ПРОДУКТОВ
Федоткина О.С., Пурыгин П.П., Буряк А.К. 334

Ш68. КИНЕТИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЦИСПЛАТИНА С ДНК В ПРИСУТСТВИИ БЕЛКА HMGB1
Феофилова М.С., Огарков М.А., Чихиржина Е.В., Поляничко А.М. 335

Ш69. АСИММЕТРИЯ ГИДРОФОБНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ – ОСОБЕННОСТЬ α-МЛЕКОТОКСИНОВ СКОРПИОНОВ
Чугунов А.О., Коромыслова А.Д., Василевский А.А., Полянский А.А., Гришин Е.В., Ефремов Р.Г. 336

Секция 5: Биологическая активность. Методы тестирования

Ш70. БЕЛОК ЯДРЫШКА ФИБРИЛЛАРИН КАК МАРКЕР ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА
Барыкина Н.В., Зацепина О.В. 338

Ш71. ВЛИЯНИЕ ФРАГМЕНТА АВП(6-9) И АНАЛОГА АВП(6-9) – Ac-D-SPRG – НА ОБУЧЕНИЕ С ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМ И ОТРИЦАТЕЛЬНЫМ ПОДКРЕПЛЕНИЕМ
Белякова А.С., Угрина А.П., Воскресенская О.Г., Каменский А.А. 339

Ш72. ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА ПРОЛИЛ-ГЛИЦИЛ-ПРОЛИНА (PGP) НА РАЗВИТИЕ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ВЕЩЕСТВОМ 48/80
Бондаренко Н.С., Умарова Б.А., Копылова Г.Н., Самонина Г.Е., Гусева А.А. 340

Ш73. ДЕЙСТВИЕ НОВЫХ АНАЛОГОВ НОЦИЦЕПТИНА НА ДВИГАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ БЕЛЫХ КРЫС
Иванова Е.А., Сарычева Н.Ю., Дубынин В.А., Каменский А.А., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. 341

Ш74. БЕЛОК ТЕПЛОВОГО ШОКА 70 ИНГИБИРУЕТ ИНДУЦИРОВАННУЮ LPS ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ NK-КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА
Каневский Л.М., Коваленко Е.И. 342

Ш75. КОРРЕКЦИЯ «ТИМОГЕНОМ®» ИЗМЕНЕНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ В КРОВИ КРЫС ВОЗДЕЙСТВИЕМ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОЙ ГИПОКИНЕЗИИ И НИЗКОИНТЕНСИВНЫМ γ-ОБЛУЧЕНИЕМ
Лузянина А.А., Шевченко А.С., Изместьева О.С., Семин Ю.А., Жаворонков Л.П., Дейгин В.И. 343

Ш76. ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА КИОТОРФИНА НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У МЫШЕЙ
Мартынов А.А., Попова С.С., Шумилов А.С., Захарова Н.М. 344

Ш77. ВЛИЯНИЕ НАТРИЙУРЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ НА АКТИВНОСТЬ РЕЦЕПТОРНЫХ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗ У КРЫС С НЕОНАТАЛЬНЫМ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВЫМ ДИАБЕТОМ
Мойсеюк И.В., Шпаков А.О., Деркач К.В., Чистякова О.В., Бондарева В.М.....345

Ш78. АКТИВИЗАЦИЯ СИНТЕЗА ГЛИАЛЬНОГО ФИБРИЛЛЯРНОГО КИСЛОГО БЕЛКА В АСТРОЦИТАХ СЕТЧАТКИ ПРИ РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ У КРЫС
Недорубов А.А., Недзвецкий В.С., Шрам С.И.....346

Ш79. РОЛЬ АНТИТЕЛ К ДЕСМОГЛЕИНАМ И ДЕСМОКОЛЛИНАМ В АКАНТОЛИЗЕ ПРИ ПУЗЫРЧАТКЕ
Прохоров А.В., Свирщевская Е.В. 347

Ш80. ВЛИЯНИЕ PRO-GLY-PRO И ACETYL-PRO-GLY-PRO НА ТРАНСКРИПЦИЮ ЦИТОКИНОВ ПРИ ЭТАНОЛОВОМ И СТРЕССОРНОМ ПОВРЕЖДЕНИЯХ ЖЕЛУДКА У КРЫС
Сангаджиева А.Д., Бакаева З.В., Самонина Г.Е., Мезенцева М.В. 348

Ш81. ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА 70 кДа НА МОДЕЛИ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНОГО СЕПСИСА У КРЫС
Сапронова А.А., Остров В.Ф., Мурашев А.Н.....349

Ш82. ВЛИЯНИЕ АНАЛОГА АВП(6-9) – Ac-L-MPRG – НА ДЕПРЕССИВНЫЕ СОСТАВЛЯЮЩИЕ ПОВЕДЕНИЯ БЕЛЫХ КРЫС
Синюшин А.А., Белякова А.С., Воскресенская О.Г., Каменский А.А. 350

Ш83. ИНТРАНАЗАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ ИНСУЛИНА ВОССТАНАВЛИВАЕТ ДОЛГОВРЕМЕННУЮ ПАМЯТЬ У КРЫС С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-го ТИПА
Сухов И.Б., Чистякова О.В., Шипилов В.Н., Бондарева В.М., Шпаков А.О. 351

Ш84. ВЛИЯНИЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ НА КАТАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФЕРМЕНТОВ
Тихоненко С.А., Шабарчина Л.И., Сабурова Е.А., Аполонник Н.В. 352

Ш85. РЕДОКС-СТАТУС ГЛУТАТИОНА КАК ПОКАЗАТЕЛЬ АДАПТАЦИОННЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ
Хаертдинова Л.Р., Сибгатуллина Г.В., Румянцева Н.И. 353

Ш86. АКТИВНОСТЬ ЦИТОХРОМ *С* ОКСИДАЗЫ И УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СУБЪЕДИНИЦ *COX* I И COX *IV* ЦИТОХРОМ *С* ОКСИДАЗЫ В БЕЛЫХ МЫШЦАХ АТЛАНТИЧЕСКИХ ЛОСОСЕЙ (*SALMO SALAR* L.) РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТОВ
Чурова М.В., Мещерякова О.В., Немова Н.Н. 354

Ш87. ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕМОСТИМУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ «СТЕМОКИНА®» И ЕГО АНАЛОГА НА ОСНОВЕ 2,5-ДИКЕТОПИПЕРАЗИНА
Шевченко А.С., Лузянина А.А., Семин Ю.А., Изместьева О.С., Жаворонков Л.П., Дейгин В.И. 355

Секция 6: Взаимосвязь структура – функция. Механизмы действия

Ш88. НЕОБХОДИМОСТЬ ВЗАМОДЕЙСТВИЯ РИБОСОМНОГО БЕЛКА L25 С 5S рРНК ДЛЯ РАБОТЫ БАКТЕРИАЛЬНОГО АППАРАТА ТРАНСЛЯЦИИ
Аникаев А.Ю., Коробейникова А.В., Корепанов А.П., Никонов С.В., Гарбер М.Б., Гонгадзе Г.М. 357

Ш89. АГРЕГАЦИЯ БЕЛКОВ, ИНДУЦИРУЕМАЯ АМФИФИЛЬНЫМИ ПЕПТИДАМИ
Артемова Н.В., Штейн-Марголина В.А., Гурвиц Б.Я. 358

Ш90. КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ АРХЕЙНОГО ФАКТОРА ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ 2 С ФРАГМЕНТОМ мРНК
Архипова В.И., Столбоушкина Е.А., Никонов О.С., Никонов С.В., Гарбер М.Б. 359

Ш91. ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ СВОЙСТВ ДОМЕНА I БАКТЕРИАЛЬНОГО РИБОСОМНОГО БЕЛКА L1
Баженова М.В., Корепанов А.П., Костарева О.С., Тищенко С.В., Гарбер М.Б. 360

Ш92. ВЛИЯНИЕ ДЕЗОКСИХОЛАТА НАТРИЯ НА АКТИВНОСТЬ ЛИПАЗЫ *CANDIDA RUGOSA*
Богданова Л.Р., Идиятуллин Б.З., Ермакова Е.А., Зуев Ю.Ф. 361

Ш93. СТРУКТУРНОЕ СОСТОЯНИЕ И КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ В РАСТВОРАХ ГЕМИНАЛЬНЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
Валиуллина Ю.А., Файзуллин Д.А., Ермакова Е.А., Зуев Ю.Ф. 362

Ш94. ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ РАЗЛИЧНОЙ СТРУКТУРЫ НА СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НА ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ КЛЕТОК МОЗГА
Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Шевченко К.В., Мясоедов Н.Ф. 363

Ш95. ХАРАКТЕРИСТИКА ДИВИНИЛЭФИРСИНТАЗЫ LuDES ЛЬНА – НОВОГО ПРЕДСТАВИТЕЛЯ НЕКЛАССИЧЕСКИХ ЦИТОХРОМОВ P450 ПОДСЕМЕЙСТВА CYP74B
Горина С.С., Топоркова Я.Ю., Гоголева Н.Е., Мухтарова Л.Ш., Чечеткин И.Р., Гоголев Ю.В., Гречкин А.Н. 364

Ш96. ИНГИБИРОВАНИЕ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА КОРОТКИМИ ГИДРОКСИПРОЛИН-СОДЕРЖАЩИМИ ПЕПТИДАМИ
Данюкова Т.Н., Биневский П.В., Шрам С.И., Кост О.А. 365

Ш97. ЦИТОСКЕЛЕТНЫЙ БЕЛОК ЗИКСИН ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С ТРАНСКРИПЦИОННЫМ ФАКТОРОМ GLi1 В РАННЕМ РАЗВИТИИ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ
Ермолина Л.В., Мартынова Н.Ю., Зарайский А.Г. 366

Ш98. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ ГОМОЛОГИЧНЫХ ГОМЕОБОКСОВЫХ ГЕНОВ В ГЕНОМАХ ЧЕЛОВЕКА РАЗУМНОГО, ДОМОВОЙ МЫШИ И ПЛОДОВОЙ МУШКИ С УЧЁТОМ ДНК-СПЕЦИФИЧНОСТИ ГОМЕОДОМЕНОВ
Желтухин Е.И., Сивожелезов В.С., Полозов Р.В. 367

Ш99. БЕЛОК GP39, КОДИРУЕМЫЙ БАКТЕРИОФАГОМ P23-45 *THERMUS THERMOPHILUS*, ПОДАВЛЯЕТ ИНИЦИАЦИЮ ТРАНСКРИПЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ
Жилина Е.В., Кульбачинский А.В., Минахин Л.С. 368

Ш100. ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИЙ ДОМЕНОВ ИНСУЛЯТОРНОГО БЕЛКА ДРОЗОФИЛЫ dCTCF
Ивлиева Т.А., Бончук А.Н., Кырчанова О.В. 369

Ш101. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКОГО АНТИТЕЛА А.17, ГИДРОЛИЗУЮЩЕГО ФОСФОРООРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ
Казначеева А.В., Куркова И.Н., Бобик Т.В., Смирнов И.В., Пономаренко Н.А., Габибов А.Г. 370

Ш102. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ МИЦЕЛЛ БЕТА-КАЗЕИНА В ВОДНО-ЭТАНОЛЬНЫХ РАСТВОРАХ
Коннова Т.А., Файзуллин Д.А., Захарченко Н.Л., Зуев Ю.Ф., Haertlé T. 371

Ш103. РОЛЬ РИБОСОМНОГО БЕЛКА L5 В ФОРМИРОВАНИИ ЦЕНТРАЛЬНОГО ПРОТУБЕРАНЦА БОЛЬШОЙ СУБЧАСТИЦЫ РИБОСОМЫ
Корепанов А.П., Коробейникова А.В., Шестаков С.А., Бубуненко М.Г., Гарбер М.Б., Гонгадзе Г.М. 372

Ш104. ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТНЫХ ФОРМ $G\alpha_o$ СУБЪЕДИНИЦЫ ГЕТЕРОТРИМЕРНОГО G-БЕЛКА ИЗ ДРОЗОФИЛЫ
Костарева О.С., Тин У.Ф., Тищенко С.В., Гарбер М.Б. 373

Ш105. ЗАМЕНЫ АМИНОКИСЛОТ В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ЙОТА УВЕЛИЧИВАЮТ ТОЧНОСТЬ СИНТЕЗА ДНК
Макарова А.В. 374

Ш106. ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ НЕКОТОРЫХ СТРУКТУРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ РИБОСОМНОГО БЕЛКА L5 В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ РИБОСОМЫ
Максимова Е.М., Корепанов А.П., Коробейникова А.В., Гарбер М.Б., Гонгадзе Г.М. 375

Ш107. ФУНКЦИИ N-КОНЦЕВОГО РАЙОНА СИГМА-СУБЪЕДИНИЦЫ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ В ИНИЦИАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ
Миропольская Н.А., Игнатов А.В. 376

Ш108. БОКОВОЙ P1-ВЫСТУП АРХЕЙНОЙ РИБОСОМЫ: КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ N-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА РИБОСОМНОГО БЕЛКА P0 С ФРАГМЕНТАМИ ДОМЕНА II 23S рРНК РАЗНОЙ ДЛИНЫ
Митрошин И.В., Кравченко О.В., Габдулхаков А.Г., Никонова Е.Ю., Шкляева А.А., Никонов С.В., Гарбер М.Б. 377

Ш109. СВОЙСТВА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА ОКТАРФИНА
Некрасова Ю.Н., Садовников В.Б., Наволоцкая Е.В. 378

Ш110. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКА-АДАПТЕРА TRIP8b С КЛАТРИНОМ
Попова Н.В., Деев И.Е., Петренко А.Г. 379

Ш111. ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ ХРОМОСОМНОГО БЕЛКА HMGB1 ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С ДНК КАК ОСНОВА МНОГООБРАЗИЯ ВЫПОЛНЯЕМЫХ ИМ ФУНКЦИЙ
Родионова Т.Ю., Чихиржина Е.В., Поляничко А.М. 380

Ш112. ОЦЕНКА ШАПЕРОНОПОДОБНОЙ АКТИВНОСТИ α-КРИСТАЛЛИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-СИСТЕМЫ, ОСНОВАННОЙ НА АГРЕГАЦИИ ОБЛУЧЕННОГО УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫМ СВЕТОМ БЕЛКОВОГО СУБСТРАТА
Роман С.Г., Чеботарева Н.А., Еронина Т.Б., Макеева В.Ф., Клейменов С.Ю., Филиппов Д.О., Курганов Б.И. 381

Ш113. САМООРГАНИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ШАПЕРОНА GroEL/GroES *in vitro*: ОТ КЛУБКА ДО ОЛИГОМЕРА
Рябова Н.А., Марченков В.В., Марченкова С.Ю., Котова Н.В., Семисотнов Г.В. 382

Ш114. НОВЫЙ МОДУЛЬНЫЙ ТОКСИН OtTx ИЗ ЯДА ПАУКА *OXYOPES TAKOBIUS*
Сачкова М.Ю., Василевский А.А., Козлов С.А., Гришин Е.В. 383

Ш115. ОСОБЕННОСТИ СУБЪЕДИНИЧНОЙ СТРУКТУРЫ АДГЕЗИОННОГО G-БЕЛОКСОПРЯЖЕННОГО РЕЦЕПТОРА CIRL-1
Серова О.В., Попова Н.В., Деев И.Е., Петренко А.Г. 384

Ш116. СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕТЕРОТРИМЕРНОГО АРХЕЙНОГО ФАКТОРА ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ 2
Столбоушкина Е.А., Архипова В.И., Никонов О.С., Никонов С.В., Гарбер М.Б. 385

Ш117. КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И СИНТЕЗ АНАЛОГА ПЕПТИДИЛ-тРНК – ПРЕДСТАВИТЕЛЯ НОВОГО КЛАССА ИНГИБИТОРОВ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА
Сумбатян Н.В., Терещенков А.Г., Головин А.В., Шишкина А.В., Коршунова Г.А., Богданов А.А. 386

Ш118. ПЕПТИДЫ ФАКТОРА eRF1, СОСЕДСТВУЮЩИЕ СО СТОП-СИГНАЛОМ В СОСТАВЕ ТЕРМИНАЦИОННОГО КОМПЛЕКСА 80S РИБОСОМ ЧЕЛОВЕКА
Хайрулина Ю.С., Булыгин К.Н., Грайфер Д.М., Веньяминова А.Г., Воробьев Ю.Н., Фролова Л.Ю., Карпова Г.Г. 387

Ш119. ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ЭПИТОПОВ БЕЛКА P35 ОРТОПОКСВИРУСОВ
Хлусевич Я.А. 388

Ш120. ИССЛЕДОВАНИЕ НЕОПИОИДНОЙ РЕЦЕПЦИИ β-ЭНДОРФИНА В ДОИМПЛАНТАЦИОННОМ РАЗВИТИИ ЭМБРИОНОВ МЫШИ *IN VITRO*
Чернов А.С., Ковалицкая Ю.А., Давыдова Г.А. 389

Ш121. РОЛЬ БЕЛКА CHROMATOR В РАБОТЕ Su(Hw)-ЗАВИСИМОГО ИНСУЛЯТОРНОГО КОМПЛЕКСА
Шаповалов И.С., Головнин А.К. 390

Ш122. РЕГУЛЯТОРЫ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДОВ, СООТВЕТСТВУЮЩИХ ТРЕТЬЕЙ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ ПЕТЛЕ РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА
Шпакова Е.А., Тарасенко И.И., Власов Г.П., Шпаков А.О. 391

Секция 7. Химия и биология протеолитических ферментов

Ш123. ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПСИХРОТРОФНОГО КАТЕПСИНА L ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА (*PARALITHODES CAMTSCHATICA)*
Балашова М.В., Руденская Г.Н., Шагин Д., Исаев В.А. 393

Ш124. ПРОТЕАСОМЫ В РАЗВИТИИ ЦНС У КРЫС
Богатырев М.Е., Люпина Ю.В., Карпова Я.Д., Астахова Т.М., Абатурова С.Б., Шарова Н.П. 394

Ш125. ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ПРОТЕАСОМ В РАЗВИТИИ ПОРТАЛЬНОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ У КРЫС ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ
Богомягкова Ю.В., Карпова Я.Д., Божок Г.А., Люпина Ю.В., Астахова Т.М., Легач Е.И., Бондаренко Т.П., Шарова Н.П. 395

Ш126. МЕХАНИЗМ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ГЛУТАМИЛЭНДОПЕПТИДАЗ БАЦИЛЛ И КОККОВ
Вайчюлионис Т.С., Гасанов Е.В. 396

Ш127. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ АКТИВНОСТЬЮ АМИЛОИД-ДЕГРАДИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ СВОЙСТВАМИ ТКАНИ МОЗГА
Васильев Д.С., Багрова Д.И., Морозова А.Ю., Дубровская Н.М. 397

Ш128. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСТГЛУТАМИНСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПЕПТИДАЗЫ ИЗ ЛИЧИНОК НАСЕКОМОГО-ВРЕДИТЕЛЯ *TENEBRIO MOLITOR*
Воротникова Е.А., Семашко Т.А., Гоптарь И.А., Смирнова Ю.А., Филиппова И.Ю., Элпидина Е.Н. 398

Ш129. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПРОТЕИНАЗ СТАТИСТИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ МАЛДИ МАСС-СПЕКТРОВ ПРОДУКТОВ ПРОТЕОЛИЗА
Драчевская М.И., Еремеев Н.Л. 399

Ш130. ВЗАИМОСВЯЗЬ АКТИВНОСТИ Ca^{2+}-ЗАВИСИМЫХ ПРОТЕИНАЗ С СОДЕРЖАНИЕМ АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ В ЖАБРАХ МИДИЙ *MYTILUS EDULIS* ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ КАДМИЕМ
Канцерова Н.П., Фокина Н.Н., Лысенко Л.А., Немова Н.Н. 400

Ш131. ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ИММУНОПРОТЕАСОМЫ В ПРОТЕОЛИЗЕ ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА ПРИ АУТОИММУННЫХ ПАТОЛОГИЯХ ЦНС
Кузина Е.С., Белогуров А.А., Бачева А.В., Кононихин А.С., Харыбин О.Н., Пономаренко Н.А., Николаев Е.Н., Габибов А.Г. 401

Ш132. ВОЗДЕСТВИЕ ТОКСИНА Cry3Aa *BACILLUS THURINGIENSIS* НА ЭКСПРЕССИЮ ПЕПТИДАЗ КИШЕЧНИКА БОЛЬШОГО МУЧНОГО ХРУЩАКА *TENEBRIO MOLITOR*
Мартынов А.Г., Элпидина Е.Н., Опперт Б. 402

Ш133. ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ БЕЛКОВЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ
Мищенко Е.С., Новиков В.Ю., Мухин В.А. 403

Ш134. ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ У ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ
Репкина Н.С. 404

Ш135. НОВАЯ СЕКРЕТИРУЕМАЯ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗА *BACILLUS PUMILUS 3-19*
Рудакова Н.Л., Валеева Л.Р., Балабан Н.П., Шарипова М.Р. 405

Ш136. ПРИСУТСТВИЕ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА БЕЛКА, СВЯЗЫВАЮЩЕГОСЯ С АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩИМ ФЕРМЕНТОМ
Савельев М.И., Биневский П.В., Кост О.А. 406

Ш137. ОЧИСТКА И ИЗУЧЕНИЕ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ ДИПЕПТИДИЛПЕПТИДАЗЫ IV ИЗ ЛИЧИНОК БОЛЬШОГО МУЧНОГО ХРУЩАКА *TENEBRIO MOLITOR*
Смирнова Ю.А., Кулемзина И.А., Гоптарь И.А., Дунаевский Я.Е., Белозерский М.А., Филиппова И.Ю., Элпидина Е.Н. 407

Ш138. ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПРОТЕАЛИЗИНА ПРИ ИНВАЗИИ БАКТЕРИЙ-ПРОДУЦЕНТОВ В ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ
Цаплина О.А., Ефремова Т.Н., Демидюк И.В., Хайтлина С.Ю. 408

Секция 8: Создание новых лекарственных средств

Ш139. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ L-АСПАРАГИНАЗЫ *RHODOSPIRILLUM RUBRUM*
Покровский В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Андрианов Р.М., Жданов Д.Д., Омельянюк Н.М., Соколов Н.Н. 410

Ш140. ПОЛУЧЕНИЕ, ОЧИСТКА И ПРОВЕРКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ХИМЕРНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА
Байков И.К., Матвеев А.Л., Матвеева В.А., Бабкина И.Н., Леванов Л.Н., Рихтер В.А., Тикунова Н.В. 411

Ш141. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕЙРОТЕНЗИНПОДОБНЫХ ПЕПТИДОВ С ДОФАМИНОВОЙ СИСТЕМОЙ
Батищева Е.Ю., Мешавкин В.К., Кост Н.В., Беляева М.Л., Андреева Л.А., Золотарев Ю.А., Мясоедов Н.Ф. 412

Ш142. РЕКОМБИНАНТНЫЙ ФРАГМЕНТ ФАКТОРА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ (44-77) ПРЕПЯТСТВУЕТ РАЗВИТИЮ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ РОГОВИЦЫ
Бейрахова К.А., Чупова Л.А., Лихванцева В.Г., Степанова Е.В., Есипов Р.С. 413

Ш143. СИНТЕЗ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ ВЫСОКОАФФИННОГО РЕЦЕПТОРА FCεR1 ИММУНОГЛОБУЛИНА Е, ОБЛАДАЮЩИХ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ
Грибовская О.В., Мартинович В.П., Янченко В.В., Голубович В.П., Новиков Д.К. 414

Ш144. ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДА PRO-GLY-PRO НА ПОТРЕБЛЕНИЕ ЭТАНОЛА И ПОВЕДЕНИЕ САМЦОВ БЕЛЫХ КРЫС СО СФОРМИРОВАННОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТЬЮ
Ефимова Е.В., Ловать М.Л. 415

Ш145. АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИН КАК РЕГУЛЯТОР АКТИВНОСТИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ
Зубкова Е.С., Семенкова Л.Н., Дудич Е.И., Парфенова Е.В., Меньшиков М.Ю. 416

Ш146. БИФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ ХИМЕРНОГО БЕЛКА СУРФАКТАНТ С-ИНТЕРФЕРОН-γ
Кузнецова Н.Р., Антипова Н.В., Болдырев И.А., Шахпаронов М.И., Завалова Л.Л. 417

Ш147. ПЕПТИДНЫЕ ФРАГМЕНТЫ ХЕМОКИНОВОГО ДОМЕНА ФРАКТАЛКИНА: ВЛИЯНИЕ НА МИГРАЦИЮ МОНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА
Кухтина Н.Б., Сидорова М.В., Азьмуко А.А., Беспалова Ж.Д., Красникова Т.Л. 418

Ш148. ОТБОР СТАБИЛЬНОГО КЛОНА КЛЕТОК СНО К1, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ХИМЕРНОЕ АНТИТЕЛО
Матвеев А.Л., Байков И.К., Матвеева В.А., Тикунова Н.В. 419

Ш149. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СЕПСИСА У КРЫС И ВОЗМОЖНОСТЬ ЕГО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ С ПОМОЩЬЮ ЭКЗОГЕННОГО БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА 70 кДа
Остров В.Ф., Евгеньев М.Б., Мурашев А.Н. 420

Ш150. ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНЫЕ ИНГИБИТОРЫ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ НА ОСНОВЕ АПТАМЕРОВ
Пупов Д.В., Есюнина Д.М., Кульбачинский А.В. 421

Ш151. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЗМАРКЕРНЫХ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ В КАЧЕСТВЕ БИОБЕЗОПАСНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГЕПАТИТА В
Пучко Е.Н., Рукавцова Е.Б., Бурьянов Я.И. 422

Ш152. ПРОТЕИНАЗА 3С ВИРУСА ГЕПАТИТА А ЧЕЛОВЕКА ВЫЗЫВАЕТ КАСПАЗОНЕЗАВИСИМУЮ ГИБЕЛЬ РАКОВЫХ КЛЕТОК
Шубин А.В., Лунина Н.А., Рощина М.П., Демидюк И.В., Костров С.В. 423

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ СИМПОЗИУМА. ЗАОЧНОЕ УЧАСТИЕ

ИССЛЕДОВАНИЕ ПУТЕЙ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПРОТИВОВИРУСНЫХ СВОЙСТВ ПРОИЗВОДНЫХ АДАМАНТАНОВОГО РЯДА В ОТНОШЕНИИ ВИРУСОВ ГРИППА А H1N1v и H3N2 С ПОМОЩЬЮ АМИНОКИСЛОТНЫХ И ПЕПТИДНЫХ ОСТАТКОВ
Гараев Т.М., Шибнев В.А., Финогенова М.П., Шевченко Е.С., Бурцева Е.И. 425

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ У МОЛОДЫХ И СТАРЫХ ЖИВОТНЫХ
Линькова Н.С., Чалисова Н.И., Концевая Е.А., Катанугина А.С., Хавинсон В.Х. 426

ВЛИЯНИЕ СЕЛАНКА НА АКТИВНОСТЬ ОСНОВНЫХ КАРБОКСИПЕПТИДАЗ В НЕРВНОЙ ТКАНИ КРЫС
Соловьев В.Б., Генгин М.Т., Мясоедов Н.Ф. 427

КОРОТКИЕ ПЕПТИДЫ СТИМУЛИРУЮТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА HSPA1A БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА У ЛЮДЕЙ
Трофимова С.В., Линькова Н.С., Трофимов А.В., Дудков А.В., Хавинсон В.Х., Горчаков А.А. 428

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА LysK С ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТАМИ
Филатова Л.Ю., Гладилин А.К., Кабанов А.В., Клячко Н.Л. 429

ТРИПЕПТИД РЕГУЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ
Хавинсон В.Х., Кветной И.М., Полякова В.О., Линькова Н.С. 430

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ЭВОЛЮЦИИ: ПЕПТИДЫ РЕГУЛИРУЮТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ И УВЕЛИЧИВАЮТ РЕСУРС ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ ОРГАНИЗМА
Хавинсон В.Х., Малинин В.В., Ванюшин Б.Ф.....431

АКТИВНОСТЬ ДИПЕПТИДИЛПЕПТИДАЗЫ-4 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ С ГИПОКСИЧЕСКИ-ИШЕМИЧЕСКИМ ПОРАЖЕНИЕМ ЦНС
Яковлева А.А., Золотов Н.Н., Колясникова К.Н., Соколов О.Ю., Михеева И.Г., Корнеева Е.В., Верещагина Т.Г., Кост Н.В. 432

ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ДИПЕПТИДИЛПЕПТИДАЗЫ-4 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЗДОРОВЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ И ИХ МАТЕРЕЙ
Яковлева А.А., Золотов Н.Н., Колясникова К.Н., Соколов О.Ю., Михеева И.Г., Кост Н.В. 433

АВТОРСКИЙ ИНДЕКС 434

ТЕЗИСЫ ПЛЕНАРНЫХ ДОКЛАДОВ

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАШИНЫ

Финкельштейн А.В., Спирин А.С.

Учреждение РАН Институт белка РАН, 142290 Пущино, ул. Институтская, 4, Московская обл.

E-mail: afinkel@vega.protres.ru

Одни и те же физические законы, действующие при разных масштабах, приводят к тому, что устройство машин в биологическом наномире отличается от устройства привычных нам макроскопических машин (таких, как колесо, рычаг, маховик, двигатель внутреннего сгорания или электромотор). (1) Молекулы и макромолекулы имеют относительно небольшие размеры и массы, и они движутся в относительно очень вязкой и теплопроводящей среде. Поэтому наномашины не могут запасать ни тепло, ни кинетическую энергию. (2) Детали наномашин имеют конфигурационную гибкость и подвергаются, при биологических температурах, интенсивному броуновскому движению. Поэтому действие наномашин должно быть стохастическим, а не механически детерминированным. В частности, они не могут передавать направленную силу на большое расстояние. (3) Конфигурационные переходы в наномашинах создают и разрушают каталитические центры и меняют энергетический ландшафт для подвижных частей этих машин. Поэтому каждый заданный конфигурационный переход и каждая заданная химическая реакция может происходить только при строго определенном (для него или для нее) состоянии наномашины. Это и обеспечивает то направленное движение наномашины, в ходе которого происходит гидролиз высокоэнергетического соединения (АТФ, ГТФ) или другая экзоэргоническая реакция. Элементарный акт движения сводится к преимущественному отбору наномашиной тех броуновских движений, что ведут от конфигураций с более высоким уровнем свободной энергии к конфигурациям с более низкой свободной энергией. Описанные механизмы иллюстрируются работой кинезина, роторных молекулярных моторов, и некоторых стадий рабочего цикла рибосомы.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», программой «Научные школы», Федеральным агентством по науке и инновациям и грантами РФФИ.

ОТ ПРОЕКТА «ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА» К ПРОЕКТУ «ПРОТЕОМ ЧЕЛОВЕКА»

Арчаков А.И.

Учреждение РАМН НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121 Москва, ул. Погодинская, 10

E-mail: archak@ibmc.msk.ru

Конечной целью проекта «Геном человека», завершенного в 2001–2003 годах, было секвенирование последовательности нуклеотидов всего генома. Несмотря на окончание проекта, знания о геноме в основном исчерпываются экспрессируемой частью генома, то есть той частью генома, которая реализуется в виде экспрессии белков через стадию транскрипции, а это всего не более 1,5% от полного генома человека [1]. Тем не менее, проект «Геном человека» привнес большие изменения в современные технологии и в биомедицинскую науку в целом.

Международный проект «Протеом человека», о начале которого было объявлено 23 сентября 2010 года в Сиднее, является логичным продолжением проекта «Геном человека». В соответствии с геноцентричным подходом целями проекта «Протеом человека» является описание человеческих белков и расшифровка их взаимодействий.

Главной проблемой в протеомике является низкая чувствительность протеомных технологий. Так, в геномике существует полимеразная цепная реакция (ПЦР), позволяющая преодолеть барьер чувствительности. Размножая молекулы нуклеиновых кислот, можно начать даже с одной молекулы, существующей в каком-то биологическом объекте, и добиться увеличения ее концентрации до такого уровня, когда ее можно обнаружить [2]. Поэтому главной проблемой является увеличение чувствительности методов идентификации белков.

Теоретически, чувствительность может быть увеличена до уровня 10^{-24} M (обратное число Авогадро), что соответствует 1 копии белка на литр. На сегодняшний день стало возможным увеличение чувствительности до 10^{-18} M [3], что соответствует одной копии белка на 1 μL. Это стало достижимым благодаря совмещению технологии MRM (Multiple Reaction Monitoring) – масс-спектрометрии с необратимым связыванием белков на BrCN-сефарозе. На наш взгляд, достигнутый уровень чувствительности является достаточным для выполнения проекта «Протеом человека».

Литература

1. http://podcasts.aaas.org/science_podcast/SciencePodcast_101217.mp3
2. Saiki, R.K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)* 239, 487-91(1988).
3. Archakov, A. et al. Biospecific irreversible fishing coupled with atomic force microscopy for detection of extremely low-abundant proteins. *Proteomics* 9, 1326-43(2009).

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ КАК ИНЕРТНЫЕ МЕТКИ И АКТИВНЫЕ ФОТОХИМИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ

Лукьянов С.А.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: luk@ibch.ru

Зеленый флуоресцентный белок медузы *Aequorea victoria* (Green Fluorescent Protein, GFP) широко используется в современной клеточной биологии и биомедицинских исследованиях в качестве генетически кодируемой флуоресцентной метки. В последние годы было открыто широкое филогенетическое и спектральное разнообразие белков семейства GFP. В частности, GFP-подобные белки были найдены в коралловых полипах Anthozoa, морских рачках Copepoda, и даже в представителях низших хордовых (ланцетниках).

Кроме широко признанного использования флуоресцентных белков как инертных меток, в настоящее время зарождается новое направление исследований, в котором флуоресцентные белки выступают в качестве активных фотохимических агентов в живой клетке. Так, например, фототоксичный флуоресцентный белок KillerRed обладает способностью производить активные формы кислорода в ответ на облучение зеленым светом. Это свойство может быть использовано для светозависимой инактивации целевых белков или индукции клеточной гибели. Недавние исследования показали, что присоединение белка KillerRed к хроматину позволяет вносить повреждения в ДНК и временно блокировать клеточные деления. Мы полагаем, что это может стать удобным инструментом как в исследовании собственно процессов митоза и мейоза, так и для изучения роли специфических клеточных популяций в развитии, регенерации и канцерогенезе.

Недавно мы показали, что зеленые флуоресцентные белки из разных таксономических групп могут выступать в качестве свето-индуцируемых доноров электронов в фотохимических реакциях с различными окислителями (акцепторами электронов), такими как бензохинон, флавины и флавопротеины, цитохром *c* и другими. В ходе этих реакций происходит фотоконверсия зеленых флуоресцентных белков в форму с эмиссией в красной области спектра, четко детектируюмую с помощью методов флуоресцентной спектроскопии и флуоресцентной микроскопии. Было показано, что такая фотоконверсия происходит в живых клетках без добавления внешних окислителей, очевидно, за счет взаимодействия флуоресцентного белка с внутриклеточными редокс-активными молекулами.

Эти данные позволяют по-новому взглянуть на зеленые флуоресцентные белки: они представляют собой не только пассивные пигменты, способные к поглощению света и флуоресценции, но и могут играть активную роль в светоиндуцируемом переносе электронов, что важно как для понимания эволюции и биологической роли этого белкового семейства, так и для разработки принципиально новых областей практического применения флуоресцентных белков в молекулярной и клеточной биологии.

ПЕПТИДЕРГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

Хавинсон В.Х.

Учреждение РАН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
199034 С.-Петербург, наб. Макарова, 6
Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН,
197110 С.-Петербург, пр. Динамо, 3

E-mail: khavinson@gerontology.ru

Процесс дифференцировки клеток является ключевым в онтогенезе. Известно, что по мере старения способность клеток к дифференцировке уменьшается, что сопровождается снижением функциональной активности органов и тканей.

Нами установлено, что короткие пептиды стимулируют дифференцировку $CD34^+$стволовых клеток костного мозга эмбриона человека в $CD14^+$ клетки (миелоциты), $CD3^+$ клетки (предшественники Т-лимфоцитов), $CD4^+$ клетки (Т-хелперы) и $CD8^+$ клетки (цитотоксические Т-лимфоциты). Пептид Lys-Glu-Asp усиливает дифференцировку $CD4^+CD8^+$ тимоцитов в Т-хелперы. Таким образом, короткие пептиды способствуют поэтапной дифференцировке клеток лимфоидного ряда, стимулируя переход стволовых форм в малодифференцированные, которые, в свою очередь, под влиянием пептидов переходят в следующую стадию дифференцировки – зрелые клетки. В культуре полипотентных клеток *Xenopus laevis* была выявлена дифференцировка их в различные ткани в зависимости от структуры воздействующего пептида. Пептид Ala-Glu-Asp-Gly стимулировал появление нервной ткани, пептид Lys-Glu-Asp-Pro – эпидермиса, мезенхимы и сомитов, пептид Lys(H-Glu-OH) – сетчатки. Кроме того, пептиды Ala-Glu-Asp-Gly, Lys-Glu-Asp-Pro и Lys(H-Glu-OH) способствовали усилению синтеза в культуре *Xenopus laevis* белка α-актина, участвующего в ремоделировании цитоскелета при клеточной дифференцировке. Пептид Ala-Glu-Asp-Gly в 6.8 раза усиливал экспрессию транскрипционного фактора CGRP и белков MMP2, MMP9 в культуре клеток эпифиза крыс, что свидетельствует о стимуляции дифференцировки пинеалоцитов. В старых культурах клеток поджелудочной железы эмбриона человека пептид Lys-Glu-Asp-Trp восстанавливал экспрессию транскрипционного фактора CXCL12 до уровня молодых культур, что указывает на геноспецифическую дифференцировку исследуемых клеток.

Таким образом, короткие пептиды в зависимости от их структуры индуцируют дифференцировку стволовых клеток в различные ткани, что указывает на пептидергическую активацию экспрессии генов, участвующих в процессах клеточной дифференцировки. Следовательно, короткие пептиды являются сигнальными молекулами, участвующими в дифференцировке клеток, что указывает на их важнейшую роль в эволюции.

ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ СТРУКТУРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ИСТОЧНИКОВ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Попов В.О.

НБИК-Центр НИЦ «Курчатовский институт», 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 1
Учреждение РАН Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,
119071 Москва, Ленинский просп., 33

E-mail: vpopov@inbi.ras.ru

Белковая Фабрика является одним из структурных подразделений Курчатовского Центра конвергентных нано-, био-, инфо-, когнитивных наук и технологий (НБИК-Центра). Одной из задач НБИК-Центра является интенсификация исследований в области структурной биологии с использованием источников синхротронного излучения.

В докладе будут представлены возможности, которыми располагает Белковая Фабрика и НБИК Центр для исследования структур макромолекул и их комплексов. Рассмотрены текущие проекты по структурной биологии в области нанотехнологий, разработки лекарств, промышленных биотехнологий и создания новых биокатализаторов.

СТРУКТУРНАЯ БИОЛОГИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

Арсеньев А.С., Бочаров Э.В., Шенкарев З.О., Минеев К.С., Парамонов А.С., Надеждин К.Д., Бочарова О.В., Люкманова Е.Н., Кирпичников М.П.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: aars@nmr.ru

Несмотря на то, что ~1/3 открытых рамок считывания в геномах организмов кодируют мембранные белки (МБ), наши знания о пространственной структуре и, соответственно, о взаимосвязях пространственная структура–функция весьма ограничены. Причиной такого состояния дел является несовершенство современных биофизических и биохимических методов, применяемых для работы с мембранными белками. В докладе проанализирован опыт авторов доклада по использованию ЯМР спектроскопии для решения различных задач структурной биологии МБ. На примерах бактериородопсина, ряда рецепторных тирозинкиназ, вольтсенсорного домена калиевого канала и других белков и пептидов рассмотрены основные этапы исследования пространственной структуры и динамики МБ: 1) выбор объекта, 2) получение достаточного количества ^{15}N,^{13}C,^{2}H изотопно меченного образца, 3) рефолдинг и оптимизация образца и 4) собственно ЯМР исследование структуры и динамики. В тех случаях, когда это возможно, обсуждаются взаимосвязи между полученной структурой, динамикой, термодинамикой и функцией МБ.

Кроме того, на основании литературных данных в докладе коротко обсуждаются современные тенденции и перспективы развития ЯМР спектроскопии мембранных белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

МИНИМАЛЬНЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ КОНТЕНТ КЛЕТКИ

Говорун В.М.[1,2,3], Алексеев Д.Г.[1,3], Базалеев Н.А.[1], Галямина М.А.[1], Дёмина И.А.[1], Жукова Н.А.[2], Кондратов И.Г.[1], Ладыгина В.Г.[1], Серебрякова М.В.[1], Фисунов Г.Ю.[1]

[1]*ФГУ НИИ физико-химической медицины ФМБА России, Москва*
[2]*Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва*
[3]*Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Московская обл.*

Молликуты (микоплазмы) – группа прокариот, родственных грам-положительным бактериям, представители которой отличаются чрезвычайно редуцированным геномом и, следовательно, его низкой кодирующей ёмкостью. Вследствие этого, микоплазмы могут служить моделью «минимальной клетки», т.е. клетки обладающей наименьшим возможным количеством белков, но способной к автономному делению.

Нами было проведено сравнение исчерпывающих протеомов трёх видов микоплазм: *Acholeplasma laidlawii, Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma mobile*. Эти организмы являются с одной стороны родственными, с другой стороны живущими в разных условиях, что позволяет с одной стороны избежать большого количества неортологичных замен генов, с другой стороны позволяет исключить белки, вовлечённые в адаптацию к конкретной экологической нише.

Для выделения консервативного ядра в трёх протеомах были использованы кластеры ортологичных групп (COG). Предполагалось, что попадание гомологичных белков в один кластер означает, с достаточной степенью точности, тождество их функций. В результате консервативное протеомное ядро составило 212 COG'ов, в то время как консервативное геномное ядро составило 284 COG'а. Среди 72 COG'ов, отсутствующих в протеомном ядре, 37 могли быть не определены в ходе протеомных исследований в силу их экстремальных физико-химических свойств. Прочие 35 COG'ов по-видимому не нужны для жизнедеятельности клетки в нормальных условиях. В составе протеомного кора были обнаружены белки всех основных молекулярных систем, обеспечивающих жизнедеятельность клетки. В их составе аппарат репликации ДНК, транскрипции, трансляции, шапероны, ферменты гликолиза и синтеза нуклеотид-трифосфатов.

Идентифицированный набор жизненно важных белков был наложен на опубликованные данные о белковых комплексах в родственном организме – *M. pneumoniae*. Было показано, что белки, относящиеся к белковому ядру, преимущественно образуют комплексы между собой и с другими белками клетки, нежели белки, закодированные в общем геномном ядре, но отсутствующие в протеомном.

МЕХАНИЗМ ДЕГРАДАЦИИ АУТОАНТИГЕНОВ

Габибов А.Г.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: gabibov@mx.ibch.ru

Протеолитическая деградация аутоантигенов имеет важнейшее значение в современной биохимии и иммунологии. Наиболее принципиальным вопросом является функциональная роль образовавшихся пептидов при изменении специфичности расщепления в процессе перехода от нормы к патологии. Идентификация конкретных пептидных фрагментов является в ряде случаев диагностическим и прогностическим критерием развития патологии. Антигены могут подвергаться процессингу под действием ферментов, каталитических антител и протеасомы. Предметом настоящего сообщения является сравнительное исследование особенностей деградации одного из главных нейроантигенов, основного белка миелина, протеиназами, активируемыми при развитии патологического демиелинизирующего процесса, и протеасомой, выделенной из различных источников. Проведенное сравнение специфичности перечисленных биокатализаторов дает в ряде случаев основание судить о резком изменении набора пептидных фрагментов основного белка миелина, способных презентироваться на главном комплексе гистосовместимости первого класса при нейродегенерации, что, по всей видимости, способствует развитию аутоиммунной патологии

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 22 «Нанотехнологии и наноматериалы», «Фундаментальные науки – медицине», РФФИ 10-04-00673-а, ICGEB- CRP/RUS09-01.

ТРИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ДОМЕНА НИКОТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ: ОТ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ К ДИАГНОСТИКЕ И НОВЫМ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ

Цетлин В.И.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: vits@mx.ibch.ru

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (АХР) состоят из экстрацеллюлярного лиганд-связывающего домена (ЛД), трансмембранного домена (ТД) и цитоплазматического домена (ЦД). Ранее мы исследовали ЛД: топография взаимодействия α-нейротоксинов змей и α-конотоксинов с АХР; совместно с голландскими кристаллографами установление первой кристаллической структуры ацетилхолин-связывающего белка (АХБ, прекрасной модели ЛД всех типов АХР) в комплексе с α-конотоксином. В докладе будут представлены исследования структурно-функциональной роли всех трех доменов: разработан надежный метод детекции нейрональных α7 АХР; α-нейротоксины использованы для выяснения роли «не-нейрональных» АХР иммунной системы. В нашем институте получен водорастворимый домен Lynx1 (эндогенного «прототоксина», имеющего тот же трехпетельный фолд, что и α-нейротоксины) и впервые показано, что в зависимости от концентрации наблюдается ингибирующее или потенциирующее действие на различные подтипы АХР. Совместно с зарубежными коллегами установлены кристаллические структуры комплексов АХБ с d-тубокурарином и стрихнином. При этом впервые показано, что в пяти участках связывания пентамерного АХБ эти антагонисты принимают различные ориентации. Эти результаты следует учитывать при моделировании рецепторных комплексов и интерпретации результатов мутагенеза. Поскольку стрихнин является высокоаффинным антагонистом глициновых рецепторов, данная работа выявила и общие принципы организации ЛД в Cys-петельных рецепторах. Общие принципы характерны и для их ТД: совместно с немецкими учеными для глицинового и 5HT3-серотонинового рецепторов установлена роль взаимодействий трансмембранных фрагментов M1 и M3 с M4 в сборке мономерной субъединицы и образовании функционально-активного пентамерного рецепторного комплекса. Работы самого последнего времени касаются ЦД АХР: выяснена важная функциональная роль нейронального α3β4α5 и установлено, что S435 β4-субъединицы важен для уменьшения никотиновой зависимости.

ВРОЖДЕННЫЙ ИММУНИТЕТ, ЦИТОКИНЫ И «ОБРАТНАЯ ГЕНЕТИКА»

Недоспасов С.А.

Учреждение РАН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Toll-подобные рецепторы были первоначально открыты методами прямой генетики («от фенотипа к гену») в контексте программ эмбрионального развития у плодовой мушки. Установление их центральной роли во врожденном иммунном распознавании у млекопитающих произвело революцию в иммунологии. В дальнейшем механизмы передачи внутриклеточного сигнала, а также последующие молекулярные события, связанные с иммунорегуляцией и активацией приобретенного иммунитета, были, в основном, установлены комбинацией методов биохимии и «обратной генетики». В последнем случае анализируется иммунологический фенотип мышей, у которых кандидатные гены отключены во всех или избранных типах клеток организма.

Наша лаборатория использует методы обратной генетики для установления физиологических функций некоторых цитокинов, в частности, Фактора Некроза Опухолей, в иммунологической регуляции и защите организма от инфекций.

ПРИРОДНЫЕ ТОКСИНЫ И ИХ МЕМБРАННЫЕ МИШЕНИ

Гришин Е.В.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: grev@ibch.ru

Природные яды представляют собой сложные смеси многих компонентов различной химической природы. Одними их самых распространенных компонентов являются полипептиды, которые часто образуют своеобразные комбинаторные библиотеки молекул, обладающих направленным действием на мембранные рецепторы и ионные каналы. В настоящее время идентифицированы полипептидные компоненты ядов, взаимодействующие со многими типами ионотропных систем клеточной мембраны. Такие пептиды применяются для направленной регуляции функциональной активности мембранных ионотропных систем и идентификации экспрессированного набора клеточных рецепторов и ионных каналов. Предполагается, что в природных ядах можно найти компоненты, специфичные практически для любого типа нейрональных мембранных рецепторов. Подобные компоненты обладают значительным фармакологическим потенциалом и могут быть использованы для создания новых медицинских препаратов. Проводится поиск компонентов ядов, взаимодействующих с потенциал-зависимыми Na^+- и $Ca2^+$-каналами, ваниллоидным рецептором TRPV1, пуринэргическими P2X-рецепторами, протончувствительными рецепторами ASIC, а также проявляющих антибактериальное действие.

МНОЖЕСТВЕННЫЕ ФОРМЫ ПРОТЕАСОМ И СУДЬБА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

Шарова Н.П.

Учреждение РАН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26

E-mail: npsharova@bk.ru

Исследование механизмов развития злокачественных опухолей и поиск новых мишеней для создания противоопухолевых лекарств до сих пор остаются важнейшими проблемами биологии и медицины. Открытие в 80-х годах прошлого века протеасом, уникальных мультипротеазных структур, выявило новые перспективы в разработке этих проблем. Все клеточные популяции характеризуются строго определенным соотношением множественных форм протеасом, к числу которых относятся 26S- и 20S-протеасомы, конститутивные и иммунные протеасомы. Можно полагать, что нарушение соотношения и функционирования этих форм связано с различными патологическими состояниями, в том числе со злокачественной трансформацией клеток и ростом опухолей. В настоящей работе исследованы изменения активности и экспрессии тотального пула протеасом, экспрессии протеолитических иммунных и конститутивных субъединиц протеасом и 19S-активатора, отражающего содержание 26S-протеасом, при образовании и развитии опухолей. При этом использованы экспериментальная модель образования доброкачественных и злокачественных опухолей печени мышей CBA/Lac x BL/6 F1 под действием дипина и частичной гепатэктомии и послеоперационный опухолевый материал щитовидной железы пациентов на разных стадиях заболевания. Указанные параметры пула протеасом изучены также в асцитной карциноме Krebs-II, перевиваемой мышам линии Balb/c, в спонтанно возникших Т-лимфоме мышей BYRB и карциноме молочной железы мышей BLRB и в регрессирующей карциносаркоме Walker 256, привитой крысам линии Brattleboro. Показано, что при образовании злокачественных (но не доброкачественных) опухолей и при их росте увеличивается экспрессия 19S-активатора протеасом. В процессе регрессии злокачественной опухоли, напротив, происходит резкое уменьшение экспрессии 19S-активатора. Остальные исследованные характеристики протеасом либо не изменяются, либо подвергаются разнонаправленным изменениям в развитии различных опухолей. Таким образом, именно 19S-активатор протеасом можно рассматривать как перспективную мишень для создания новых противоопухолевых лекарств.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (госконтракт № 02.512.12.2047) и РФФИ (грант № 09-04-00077а).

THE ENERGETIC BASIS OF PROTEINS AND THEIR COMPLEXES

Privalov P.L.

Johns Hopkins University, Baltimore, USA

The realization that proteins – molecules consisting of thousands of atoms, all participating in thermal motion – represent individual quazi-macroscopic systems is one of the greatest achievements of modern science. Correspondingly, proteins are usually called «macromolecules». As with other macroscopic systems, understanding an individual protein requires knowledge of its thermodynamics which define its most general properties. The thermodynamics of proteins is expected to be exceptional because of the unusual spatial organization of these objects: every atom in their structure occupies a definite place, as in a crystal, but in contrast to a crystal, there is no symmetry and no periodicity in their arrangement. Such aperiodic macroscopic systems have never been dealt with before in physics. Therefore, one cannot *a priori* predict the thermodynamic properties of a protein. Correspondingly, without knowing their thermodynamics one cannot engineer new proteins. Without knowledge of their energetic basis, all discussion of the principles of organization of these macromolecules, of the mechanism of their formation and the stabilization of their three-dimensional structure, moreover of their functional properties (which assumes certain rearrangements in their structure) is merely speculation. This has become apparent only after many years of unsuccessful attempts to solve these problems by theoretical analysis of the known structure of proteins. This failure has made it obvious that structural information represents only one facet of a protein, while the other facet is its energetic basis. These two fundamental pieces of information cannot be deduced directly, one from the other, they must be separately determined experimentally using very different methods. Here we consider the main achievements of the thermodynamic studies of proteins and their complexes.

РАЗРАБОТКА ОСНОВ СОЗДАНИЯ ПЕПТИДНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Мясоедов Н.Ф.

Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН,
123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2

E-mail: landr@img.ras.ru

Известна роль пептидов в регуляции самых разнообразных функций организма, от простых до сложных, включая функции ЦНС человека. Химия и биология предоставили в наше распоряжение как большое число эндогенных пептидных структур, так и их разнообразные функции.

Все эти обстоятельства уже давно привлекают внимание фармакологов с целью создания на основе природных пептидов новых лекарственных препаратов, которые в силу своего происхождения должны быть лишены побочных эффектов. Однако эти усилия до настоящего времени дали незначительный результат. В основном это связано с полифункциональностью эндогенных пептидов и их быстрым протеолизом, что делает их действие кратковременным. В докладе обсуждаются эти проблемы и пути их решения.

Особое внимание в докладе уделяется механизму действия пептидов, которые, как правило, связаны с основными клеточными функциями. На примере взаимодействия с клеточными структурами пептидов Семакса, Селанка, нейротензинподобных пептидов и других, рассматриваются вопросы их действия на рецепторные системы клетки, изменения транскриптомы, формирование протеомного клеточного ответа. Совокупность этих данных позволяет наметить пути направленного конструирования пептидов, объяснить наблюдаемые клинические эффекты лекарственных препаратов пептидной природы.

Работы выполнены при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», гранта Президента РФ для поддержки ведущих научных школ № НШ-3438.2010.4, ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы, ГК № 14.740.11.0179.

ТЕЗИСЫ СЕКЦИОННЫХ ДОКЛАДОВ

Секция 1

Выделение, очистка, характеризация белков и пептидов. Пептидомика. Протеомика

ПЕПТИДОМИКА ЭКЗОГЕННЫХ ОЛИГОПЕПТИДОВ

Замятнин А.А.[1,2]

[1]*Учреждение РАН Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,*
119071 Москва, Ленинский просп., 33
[2]*Universidad Técnica Federico Santa Maria, El Centro Cientifico Tecnológico de Valparaiso,*
av. España 1680, Valparaiso, Chile

E-mail: aaz@inbi.ras.ru; alexander.zamyatnin@usm.cl

Большинство исследований природных олигопептидов посвящено изучению эндогенных олигопептидных регуляторов, образующихся в живых организмах из специализированных предшественников. Однако к настоящему времени выделено уже несколько сотен пептидных структур, являющихся фрагментами хорошо известных белков. Так, большое число фрагментов гемоглобина было выявлено в мозге и шишковидной железе быка, казеина – в коровьем молоке, экспериментально идентифицированы природные фрагменты и целого ряда других белков. Физиологические функции многих из них неизвестны также как не всегда ясно, являются ли они продуктами естественного протеолиза или образуются в процессе выделения.

В то же время, очевидно, что пищевые белки в пищеварительном тракте под действием протеолитических ферментов (пепсина, трипсина, химотрипсина и других) образуется динамический пул экзогенных белковых фрагментов. Их аминокислотные последовательности могут совпадать с первичными структурами известных физиологически активных олигопептидов, обнаруженных в других источниках.

Это предположение было нами подтверждено при изучении фермента бромелаина ананаса [1], бычьего гемоглобина [2,3] и казеина [4,5]. В результате сравнения аминокислотных последовательностей всех фрагментов выбранного белка (полного фрагментома) с первичными структурами олигопептидов базы данных EROP-Moscow (http://erop.inbi.ras.ru/) было показано, что десятки фрагментов этих белков могут проявлять функции нейропептидов, гормонов, иммуномодуляторов и другие функциональные свойства. Очевидно, что общее число возможных фрагментов этих и других белков существенно больше и их функциональная значимость будет выявляться в ходе дальнейших экспериментальных исследований.

Литература

1. Замятнин А.А., Борчиков А.С. *Нейрохимия*, 24, 21–29, 2007.
2. Замятнин А.А. *Биофизика*, 53, 725–733, 2008.
3. Замятнин А.А. *Биохимия*, 74, 247–256, 2009.
4. Замятнин А.А. *Успехи биологической химии*, 49, 405–428, 2009.
5. Zamyatnin A.A. *Proceedings of the 31st Peptide Symposium*, M.Lebl, M.Meldal, K.J.Yensen, T.Hoeg-Yensen, Eds., European Peptide Society, pp. 32–33, 2010.

ТЕХНОЛОГИИ ПЕПТИДОМИКИ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Зиганшин Р.Х.[1], Арапиди Г.П.[1], Азаркин И.В.[1], Говорун В.М.[1,2], Иванов В.Т.[1]

[1]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
[2]ФГУ НИИ физико-химической медицины ФМБА России, 119992 Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

Пептидомные исследования, направленные на тотальную идентификацию содержащихся в биологических образцах пептидов, а также изучение их свойств является быстро развивающейся областью биологии. Этот подход активно использовался для изучения разнообразных биологических жидкостей, клеток и тканей. Были выявлены сотни новых, часто биологически активных пептидов, а также показано, что составы соответствующих пептидных пулов чувствительны к физиологическому состоянию экспериментальных животных, меняясь под воздействием различных патологий, стресса, генетических модификаций, изменения иммунного статуса и воздействия фармакологических агентов. Развитие протеомных технологий в последние годы привело к созданию мощного инструментария для чувствительного и производительного анализа пептидов, что, в свою очередь, сделало реальными перспективы использования результатов пептидомных исследований в области клинической диагностики.

В докладе будут представлены последние результаты нашей работы по поиску в сыворотке крови пациентов с раком яичников, колоректальным раком и сифилисом пептидных маркеров этих заболеваний. В результате оптимизации условий пробоподготовки образцов сыворотки крови для их дальнейшего анализа методом MALDI-TOF MS были значительно улучшены качество и воспроизводимость получаемых масс-спектрометрических профилей. Сравнительный анализ соответствующих масс-спектрометрических профилей позволил построить классификационные модели, способные детектировать все изученные патологии со специфичностью и чувствительностью близкой к 100%. LC-nanoESI-QTOF MS/MS анализ тех же самых образцов сыворотки крови позволил идентифицировать более 1000 пептидов. Будут обсуждены дальнейшие шаги по верификации полученных результатов.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРОТЕОМА И ПЕПТИДОМА В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ ПРОТОПЛАСТОВ МХА *PHYSCOMITRELLA PATENS*

Скрипников А.Ю.[1,2], Поляков Н.Б.[1], Слижикова Д.К.[1], Галямина М.Ю.[3], Демина И.Ю., Казаков В.С.[1], Козьмин Ю.П., Птушенко В.В[2], Мажейка И.С.[2], Мочалов К.Е.[1], Говорун В.М.[1,3], Иванов В.Т.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*
[2]*МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1*
[3]*ФГУ НИИ физико-химической медицины ФМБА России, 119992 Москва, Малая Пироговская, 1а*

E-mail: a.skripnikov@gmail.com

В последние годы мох *P. patens* стал ведущим модельным объектом, с помощью которого изучаются различные молекулярные механизмы развития растений. Этот интерес обусловлен тем, что мох *P. patens* оказался единственным растительным объектом, к которому применимы с методы обратной генетики и технология генного таргетинга.

После полной расшифровки генома данного организма, стали возможными широкомасштабные исследования его протеома и пептидома, при этом, в качестве объектов протеомного анализа используется не только протонема и гаметофоры мха, но и протопласты, которые являются важными объектами биохимии, биофизики и биологии развития, а также используются как система трансформации при получении трансгенных растений. Регенерация протопластов мхов во многом сходна с прорастанием спор и существенно отличается от регенерации протопластов семенных растений. Из-за отсутствия обычной для регенерации протопластов семенных растений «каллусной фазы», деление протопластов мхов считают «истинной» регенерацией, в процессе которой происходит развитие нового организма, начинающееся у мхов с дифференциации протонемы.

В настоящей работе исследовано динамическое изменение протеома и пептидома в процессе регенерации протопластов через 24, 48 и 72 часа после начала регенерации. Показано, что при получении протопластов из протонемы мха, ряд белков, значительная часть которых участвуют в процессе фотосинтеза, подвергаются протеолизу, формируя пептидные фрагменты разной длины, при этом число определенных пептидов и белковые профили варьируют в течение времени исследования.

ЕСТЬ ЛИ НЕЙРОТОКСИНЫ В ЯДЕ ГАДЮКИ?

Уткин Ю.Н.[1], Вульфиус Е.А.[2], Горбачева Е.В.[2], Старков В.Г.[1], Никитин И.Г.[1], Осипов А.В.[1], Рамазанова А.С.[1], Цетлин В.И.[1]

[1]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
[2]Учреждение РАН Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская обл.

E-mail: utkin@mx.ibch.ru

По своей биологической активности все яды змей могут быть разделены на две основные группы: нейротоксичные, поражающие главным образом нервную систему, и гемотоксичные, воздействующие на различные компоненты крови. Первая группа включает яды змей семейства Elapidae, вторая – яды змей семейства Viperidae. Хотя яды Viperidae в основном гемотоксичны, имеющиеся литературные данные свидетельствуют о том, что они содержат также и нейроактивные компоненты. К таковым относятся, в частности, нейротоксичные фосфолипазы А2, блокирующие синаптическую передачу нервного импульса. Для обнаружения новых нейроактивных соединений в ядах гадюк нами был использован протеомный подход в сочетании с анализом мРНК из ядовитых желез и определением биологической активности идентифицированных соединений. Так, из яда гадюки Никольского *Vipera nikolskii* были выделены две гетеродимерные фосфолипазы А2, влияющие на нервно-мышечную передачу. Полные аминокислотные последовательности всех субъединиц определены на основании последовательностей кДНК. В ядовитых железах гадюк нами была обнаружена экспрессия мРНК, кодирующих белки семейств CRISP и трехпетельных токсинов. Белки этих семейств из ядов других змей являются нейротоксинами, блокирующими ионные каналы различной природы. Для обнаружения новых нейротоксинов в ядах гадюк мы исследовали влияние этих ядов на никотиновые холинорецепторы изолированных нейронов прудовика *Lymnaea stagnalis*. В результате этой работы идентифицирован и выделен ряд новых полипептидов, блокирующих никотиновые холинорецепторы. В частности, из яда шумящей гадюки *Bitis arietans* выделена фосфолипаза А2 нового типа, взаимодействующая с различными подтипами холинорецепторов и ацетилхолин-связывающими белками и представляющая собой белок с молекулярной массой 24,7 кДа, содержащий 14 дисульфидных связей. Это – первый белок, обладающий фосфолипазной активностью и блокирующий никотиновые холинорецепторы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и программ фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Фундаментальные науки – медицине».

НОВЫЕ ГЕМОТОКСИЧНЫЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ ИЗ ЯДОВ ЗМЕЙ

Рамазанова А.С., Осипов А.В., Филькин С.Ю., Старков В.Г., Уткин Ю.Н.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: Lamsi@mail.ru

Болезни системы кровообращения являются одними из наиболее распространенных заболеваний. В частности инфаркт остается наиболее частой причиной смерти людей пожилого и среднего возраста. При постинфарктном состоянии идет длительная гипоксия тканей и как следствие этого недостаточный синтез мембранных защитных белков против собственной системы комплемента. Основными путями решения этих проблем являются своевременная диагностика и эффективная терапия этих заболеваний, в частности снижение активности системы комплемента. Оксиагин, новый репролизин из яда кобры *Naja oxiana*, ингибирует активацию системы комплемента на одной из стадий классического пути, связываясь с иммуноглобулинами в тесной близости от места посадки компонента C4b и вызывая этим стерические или конформационные препятствия для последующего связывания и активации компонента C2. Нами определена полная аминокислотная последовательность оксиагина, который относится к классу PIII металлопротеиназ из ядов змей (SVMPs) и характеризуется трехдоменной организацией белка, включая металлопротеиназный и дезинтегрин-подобный домены, а также домен, богатый остатками цистеина.

Одним из направлений в диагностике и терапии заболеваний системы кровообращения является диагностическое (например, рептилазный тест), профилактическое и лечебное применение ферментов из ядов змей. Сейчас выпускают пять коммерческих препаратов тромбиноподобных ферментов (ТПФ). К наиболее изученным препаратам с прямым дефибринирующим действием относятся анкрод и батроксобин. Для поиска ТПФ с новыми фармакологическими свойствами нами изучены яды змей, обитающих на территории России. Так, в ядовитой железе гадюки Никольского идентифицирован новый ТПФ, названный нами никобином. В последовательности никобина имеется 15 уникальных аминокислотных замен. По результатам молекулярного моделирования структура идентифицированного нами фермента несколько отличается от структур известных ТПФ, что может свидетельствовать о наличии у никобина уникальной биологической активности. В настоящее время проводится выделение никобина из яда.

МЕМБРАНО-АКТИВНЫЕ ПЕПТИДЫ ИЗ ЯДА ПАУКОВ

Василевский А.А., Гришин Е.В.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: avas@ibch.ru

Яды различных пауков содержат разнообразные соединения – от солей до крупных многодоменных белков. При этом для большинства исследованных видов характерно высокое содержание в их яде пептидов. Наиболее исследованными являются пептидные нейротоксины, селективно модулирующие функцию белковых рецепторов в нервной системе организмов-мишеней действия яда. Исследования последних лет показывают, что важное место среди компонентов яда пауков занимают пептиды другого типа, так называемые мембрано-активные пептиды (МАП), взаимодействующие с клеточными мембранами.

Простейшие МАП из яда пауков – короткие линейные катионные пептиды, формирующие при контакте с мембранами амфифильные α-спирали. Обнаружены короткие МАП, не склонные к образованию α-спиралей, а также МАП, содержащие S-S-мостики. Кроме того, некоторые дисульфид-богатые нейротоксины пауков эффективно взаимодействуют с мембранами, при этом структурным элементом, обеспечивающим такое взаимодействие, служит либо амфифильная α-спираль, либо кластер гидрофобных остатков, образованный иным способом. Наиболее любопытными представляются токсины модульного строения, объединяющие в своем составе «модули-домены», соответствующие обычным МАП или нейротоксинам. Большинство МАП из яда пауков проявляют цитолитическую активность. Для одних характерна специфичность действия в отношении бактерий, для других – в отношении насекомых, для третьих, напротив, показан широкий спектр активности. Некоторые МАП проявляют синергизм действия с нейротоксинами. Разнообразие структурной организации и биологических функций МАП обуславливает широкий спектр возможностей их применения – от фундаментальных исследований до разработки лекарственных средств.

Авторы благодарны за финансовую поддержку Президиуму РАН (программа фундаментальных исследований «Молекулярная и клеточная биология»), Минобрнауки РФ (Госконтракт № П1388), РФФИ (гранты №№ 08-04-00454 и 11-04-00706), НАИРИТ (грант № 65348).

ЗАЩИТНЫЕ ПЕПТИДЫ ИММУНИТЕТА РАСТЕНИЙ (ИЛИ ХИМИЯ И ГЕНЕТИКА ЗАЩИТНЫХ ПЕПТИДОВ ИММУНИТЕТА РАСТЕНИЙ)

Егоров Ц.А.[1], Одинцова Т.И.[2]

[1]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*
[2]*Учреждение РАН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва*

E-mail: ego@ibch.ru

Растения образуют множество эффекторных молекул пептидной природы, среди которых выделяют группу защитных пептидов. К ним относятся: (1) антимикробные пептиды (АМП), способные подавлять рост патогенных микроорганизмов и (2) ингибиторы протеиназ насекомых. Известно несколько семейств АМП, различающихся по пространственной структуре и биологическим свойствам. Геномный анализ показал, что в одном растительном геноме содержатся сотни генов, кодирующих АМП.

В докладе обсуждаются результаты собственных исследований АМП дикорастущих видов цветковых растений, таких как звездчатка (*Stellaria media* L), ежовник обыкновенный (*Echinochloa crusgalli* L), одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale* L), а также пшеница *Triticum kiharae* – синтетический аллополиплоид, полученный при скрещивании *Triticum timopheevii* с *Aegilops squarrosa*. В настоящей работе с использованием различных методов хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией и секвенированием из семян и цветков этих растений выделено и изучено строение нескольких десятков новых АМП. Среди них обнаружено новое семейство 4-Cys и 10-Cys пептидов, для которых определены 3D структуры и нуклеотидные последовательности кДНК и генов, кодирующих эти АМП. Показано, что 4-Cys пептиды пшеницы кодируются несколькими генами. При этом в составе препробелков идентифицировано по несколько зрелых пептидов с одинаковым 4-Cys мотивом, различающихся по антимикробной активности. Исследованы биологические свойства новых АМП и начаты работы по изучению механизма их действия. Для получения пептидов в препаративных количествах были использованы методы химического синтеза и гетерологической экспрессии синтетических генов, кодирующих эти пептиды, в прокариотической системе (*E. coli*) с использованием коммерческого вектора. Полученные результаты послужат развитию пептидомики растений и представляют интерес для биотехнологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», ГК № 16.740.11.424, № 16.512.11.2156 и грантами РФФИ №№ 11-04-00190 и 09-04-00250.

БЕЛКИ ВТОРИЧНОЙ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВОЛОКОН

Ибрагимова Н.Н., Мокшина Н.Е., Горшкова Т.А.

Учреждение РАН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111 Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31

E-mail: nibra@yandex.ru

Растительные клеточные стенки – самая распространенная на планете органическая субстанция, однако механизм создания этой структуры является почти не затронутой областью исследования. В связи с этим актуальным становится вопрос исследования основных компонентов клеточной стенки и их роли в формировании ее сложнейшей надмолекулярной структуры. Состав белков клеточной стенки желатинозного типа на сегодняшний день охарактеризован крайне слабо, хотя этот тип вторичной клеточной стенки достаточно широко представлен в растительных волокнах. Показано, что благодаря особенностям состава и структуры желатинозные слои вторичной клеточной стенки обладают существенно иными механическими свойствами, чем ксилановые: у них выше прочность на разрыв и гибкость.

Для изучения формирования вторичной клеточной желатинозного типа удобной моделью являются флоэмные волокна льна, одним из преимуществ которого является наличие на стебле «точки слома» – области, выше которой первичные флоэмные волокна интрузивно удлиняются, а ниже – формируют вторичную клеточную стенку. Был разработан протокол для выделения ионно-связанных белков клеточной стенки индивидуального волокна. Белки разделяли с помощью одномерного электрофореза ввиду неэффективности разделения белков клеточной стенки двумерным электрофорезом. Масс-спектры были получены на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex (Bruker) с возможностью фрагментации ионов. Для идентификации и установления принадлежности выявленных белков к определенному клеточному компартменту использовались разнообразные методы биоинформатики. Всего было идентифицировано 97 белков, многие из которых определялись как предсказанные, предполагаемые или гипотетические. При этом 22 белка были идентифицированы как клеточно-стеночные, среди них такие классические белки клеточной стенки как β-галактозидаза, пероксидаза, арабиногалактановые белки и др. Полученные данные позволяют приблизиться к пониманию механизмов формирования надмолекулярной структуры вторичной клеточной стенки и роли белков в этом процессе.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 09-04-97038 и гранта Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ НШ-6992.2010.4.

ВАРИАБИЛЬНОСТЬ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ПУЛА КАК ОТВЕТНАЯ РЕАКЦИЯ ОРГАНИЗМА РЫБ НА ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Смирнов Л.П., Суховская И.В.

Учреждение РАН Институт биологии КарНЦ РАН,
185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

E-mail: levps@rambler.ru

Существует обоснованное мнение, что пептидный пул клетки может рассматриваться как носитель информационного сигнала о биохимическом статусе ткани и, соответственно, физиологическом состоянии того или иного органа. Следовательно, патологические нарушения в тканях приводят к изменению компонентного состава пулов и изменению суммарного биологического сигнала – количественного и качественного.

Как показали наши исследования, низкомолекулярные экстракты из тканей рыб разделялись методом жидкостной хроматографии на носителе Toyopearl HW-40S в зависимости от типа ткани на 8 – 14 фракций.

Профили хроматограмм были специфичны для той или иной ткани. Видно большое хроматографическое сходство пулов низкомолекулярных пептидов мускулатуры окуней и карасей и их качественное отличие от таковых печени. Ясно, что более разнообразный фракционный состав печени по сравнению с мускулатурой определяется функциональным многообразием ткани.

Необходимо отметить факт качественных отличий между окунями, отловленными в разных регионах. У рыб, взятых из разных озер Дарвинского заповедника, отсутствовали различия по фракционному составу пептидов с молекулярными массами до 10 кДа с мышцами особей того же вида, выловленных из озер Карелии. Это обстоятельство, на наш взгляд, может свидетельствовать о наличии межпопуляционных различий между окунями в условиях значительной географической разобщенности не только по высокомолекулярным белкам, но и по низкомолекулярным компонентам пептидной природы.

Были выявлены различия по количественному распределению пептидов по фракциям в мышечных экстрактах окуней, выловленных из озер с разным уровнем эвтрофикации. Наблюдалось снижение уровня пептидов во фракциях у рыб из темноводного водоема по сравнению с таковыми из светловодного. Выявлены изменения фракционного пептидного состава, в зависимости от пола и возраста.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Программы Президента РФ «Ведущие научные школы России» НШ № 3731.2010.4 и Программы Президиума РАН «Биологическое разнообразие» 2009–2011.

ЛАНТИБИОТИКИ – УНИКАЛЬНЫЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПЕПТИДЫ: РАЗНООБРАЗИЕ СТРУКТУРЫ И МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ

Коробов В.П., Полюдова Т.В., Лемкина Л.М.

Учреждение РАН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, 614081 Пермь, ул. Голева, 13

E-mail: korobov@iegm.ru

Бактерии являются продуцентами огромного количества биологически активных соединений. Особое внимание привлекают небольшие антибактериальные пептиды грамположительных бактерий лантибиотики, содержащие атипичные тиоэфирные аминокислоты – лантионин, 3-метиллантионин и лабионин, благодаря которым в процессах посттрансляционной модификации формируются тиоэфирные связи и прочные внутримолекулярные кольцевые структуры. В составе этих необычных пептидов встречаются также дегидрированные остатки серина и треонина, лизиноаланин, D-аланин, лантионин-сульфоксид, *allo*-изолейцин и другие редкие соединения. Структурные особенности позволяют выделить две группы лантибиотиков: тип А – протяженные спиралеобразные молекулы с массой 2–5 кДа и тип В – молекулы глобулярной формы с массой около 2 кДа. Суммарный положительный заряд позволяет лантибиотикам связываться с анионными группировками клеточных оболочек бактерий. В то же время, избыток анионных зон на цитоплазматических мембранах способствует продвижению пептидов типа А внутрь и сорбции на внешнем слое мембран с внедрением в липидный матрикс и формированием нерегулируемых каналов и пор, что приводит к гибели клеток. По имеющимся данным лантибиотики облегчают поступление в бактерии различных биологически активных агентов, в частности антибиотиков, в результате чего значительно возрастает эффективность их действия на патогенные бактерии, в том числе, и антибиотикорезистентные штаммы. Показано, что лантибиотики типа В, ингибируя ферменты, препятствуют синтезу пептидогликана путем образования комплекса с липидом II (мерсацидин, актагардин) или подавляя активность фосфолипазы (циннамицин).

Таким образом, уникальные антимикробные пептиды лантибиотики являются великолепным материалом для биотехнологического конструирования новых биологически активных соединений широкого спектра действия.

Работа поддержана грантами РФФИ № 10-04-96086-р_урал_а, Программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» № 09-П-4-1019 и УрО РАН № 09-М-14-2002, офи-10-14-12-НАБ.

ПОДХОД К ВЫДЕЛЕНИЮ ИНТАКТНЫХ МОЛЕКУЛ ТАЙТИНА

Шумилина Ю.В., Вихлянцев И.М., Подлубная З.А.

Учреждение РАН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская обл.

E-mail: shjv2000@rambler.ru

Тайтин является гигантским белком скелетных и сердечных мышц позвоночных, молекулы которого перекрывают расстояние от М-линии до Z-диска саркомера, формируя третью филаментную систему. Молекула тайтина на 90% состоит из иммуноглобулин- и фибронектин-подобных доменов, имеющих β-складчатую структуру. В сердечной мышце животных и человека экспрессируются две изоформы тайтина: короткая N2B (~3000 кДа) и длинная N2BA (~3300 кДа). Показано, что тайтин является одним из важнейших компонентов саркомера поперечнополосатых мышц позвоночных, выполняя множество функций: от участия в сборке саркомера и стабилизации его структуры до регуляции процессов внутриклеточной сигнализации в мышце. Однако структурно-функциональные свойства тайтина *in vitro* изучены только для его протеолитического фрагмента T2 (~2000 кДа), поскольку известные методики не позволяли изолировать нативные молекулы тайтина по причине их деградации Ca^{2+}-зависимыми протеазами (кальпаинами) в процессе выделения. Мы применили новый способ получения тайтина на основе разработанной ранее методики (Podlubnaya et al., 1989), снижающей содержание ионов кальция в мышце до начала выделения белка. Ранее эта методика впервые позволила сохранить в миофибриллах сердечной мышцы кролика все минорные белки миозиновых нитей (Podlubnaya et al., 1989). Мы использовали эту методику для выделения тайтина из сердечной мышцы млекопитающих. До гомогенизации полоски мышечной ткани (~20мм×4мм) инкубировались в растворе, удаляющем ионы Ca^{2+} из мышцы (Podlubnaya et al., 1989), в течение 10–14 суток с частой сменой раствора. Затем тайтин выделяли по методу (Soteriou et al., 1993). Методом ДСН-гель-электрофореза показано, что выделенные препараты тайтина содержали до 50% интактной N2B-изоформы (в отличие от 3%-ного её содержания в препаратах белка, выделенных по стандартной методике). Методом кругового дихроизма было выявлено увеличение β-складчатой структуры в препаратах тайтина, полученных по новой методике, что также свидетельствует о бóльшем содержании интактных молекул N2B-изоформы тайтина в препаратах белка. Это первая успешная попытка выделения N2B-изоформы тайтина в количестве, достаточном для дальнейшего исследования её структурно-функциональных свойств.

Работа поддержана грантами РФФИ №№ 09-04-01161, 10-04-00141, грантами ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» Федерального агентства по науке и инновациям, ГК № 02.740.11.0301, ГК № 02.740.11.0710.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ *ESCHERICHIA COLI*

Курилова С.А.[1], Воробьева Н.Н.[2], Родина Е.В.[2], Назарова Т.И.[1]

[1]*НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы*
[2]*Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы*

E-mail: skurilova@mail.ru

Неорганическая пирофосфатаза (PPаза) – один из ключевых ферментов фосфорного обмена. Он катализирует гидролиз пирофосфата до двух фосфат-ионов, тем самым обеспечивая благоприятные термодинамические условия для протекания важнейших биосинтетических процессов. Ранее были идентифицированы около 30 белков, которые могут образовывать комплексы с PPазой в клетке *E. coli*, однако дальнейшего развития эти работы не получили.

В настоящей работе методом металлоаффинной хроматографии с использованием 6His-модифицированной PPазы в качестве наживки из экстракта клеток *E. coli* были выделены белковые комплексы PPазы. Пять белков, взаимодействующих с PPазой, были идентифицированы с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии: молекулярные шапероны DnaK и GroEL; FbaB, фруктозо-1,6-бисфосфатальдолаза класса I; GadA, L-глутаматдекарбоксилаза; и KduI, 5-кето-4-дезоксиуронатизомераза. Три партнера PPазы, не идентифицированные ранее (FbaB, GadA и KduI), были клонированы, экспрессированы и выделены в двух формах (нативной и с 6His-вставкой). Бинарные взаимодействия этих белков с PPазой были подтверждены обратными экспериментами по образованию комплексов в растворе. Белки попарно смешивали с PPазой, при этом PPазу брали в нативной форме, а ее предполагаемые партнеры – в 6His-модифицированной. Смесь наносили на колонку с Ni-хелатирующей смолой и отмывали буфером с увеличивающейся концентрацией имидазола. Немодифицированная PPаза выходила вместе с 6His-модифицированными партнерами на 250 мМ имидазола, что подтверждает образование бинарных комплексов.

Чтобы выяснить возможную роль обнаруженных взаимодействий в метаболизме *E.coli*, было исследовано влияние PPазы на физико-химические свойства FbaB и GadA. Полученные результаты показывают, что PPаза, помимо каталитической функции, может выполнять в клетке *E. coli* дополнительную роль, стабилизируя эти белки в стрессовых условиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 09-04-00596).

Секция 2

Химия белков и пептидов.
Методы синтеза, химическая модификация

ТВЕРДОФАЗНЫЙ ИЗОТОПНЫЙ ОБМЕН СО СПИЛЛОВЕР-ВОДОРОДОМ В ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЯХ

Золотарев Ю.А.[1], Дадаян А.К.[1], Борисов Ю.А.[2], Козик В.С.[1], Мясоедов Н.Ф.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН,*
123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2
[2]*Учреждение РАН* Институт элементоорганической химии им. *А.Н. Несмеянова* РАН*,*
Москва

E-mail: zolya@img.ras.ru

В докладе обобщены данные, посвященные теоретическому и экспериментальному исследованию реакции высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена (ВТКИО) происходящей в органических соединениях под действием спилловер-водорода (СВ). Реакция ВТКИО происходит по одноцентровому синхронному механизму на кислотных центрах бренстедовского типа твердой фазы, образованной органическим веществом, нанесенным неорганический носитель, и высокодисперсным металлом платиновой группы[1]. ВТКИО является универсальной реакцией, позволяющей получать кратно меченные тритием соединения различных классов. Реакция ВТКИО происходит с практически полным отсутствием рацемизации, что делает эту реакцию ценным препаративным методом. Обсуждается получение многократно меченных тритием селективных лигандов для рецепторов, пептидов и белков с использованием реакцией ВТКИО. Эти препараты полностью сохраняют физиологическую активность и в течение ряда лет успешно используются в биологических исследованиях в России и за рубежом.

Для реакции ВТКИО с аминокислотами впервые проведен анализ изотопных эффектов реакции с дейтерием и тритием. Было показано, что кинетический изотопный эффект этой реакции составляет 1.2–1.4, что в несколько раз ниже чем для жидкостных реакций переноса протия и дейтерия, составляющий от 3 до 30. Наблюдается хорошее соответствие между экспериментальными данными и результатами квантово-химического расчета.

В области контакта полипептидных субъединиц происходит значительное снижение способности к обмену водорода на СВ, что делает перспективным использование реакции ВТКИО для анализа пептид-пептидных взаимодействий при образовании комплексов в белках. Для меченных тритием и дейтерием органических соединений впервые обнаружены и теоретически исследованы изотопные эффекты в электронных спектрах УФ-поглощения и флюоресценции, что может быть использовано в исследованиях по образованию комплексов с ионами металлов.

Литература

1. Yu.A. Zolotarev, A.K. Dadayan, Yu.A. Borisov, V.S. Kozik, *Chemical Reviews*, 2010, 110, 5425–5446

ТВЕРДОФАЗНЫЙ ИЗОТОПНЫЙ ОБМЕН ВОДОРОДА В ПЕПТИДАХ И БЕЛКАХ, ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Дадаян А.К.[1], Золотарев Ю.А.[1], Козик В.С.[1], Васьковский Б.В.[2], Назимов И.В.[2], Мясоедов Н.Ф.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2*
[2]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

E-mail: dadayan@mail.ru

Исследовалась реакция высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена (ВТКИО) происходящая в пептидах и белках под действием спилловер-водорода (СВ). Реакция ВТКИО происходит в твердой смеси, образованной органическим веществом, нанесенным на неорганический носитель, дисперсным металлом платиновой группы и газообразным тритием или дейтерием, при температуре 140–200°C. Изотопный обмен происходит в твердой фазе по одноцентровому синхронному механизму на кислотных центрах бренстедовского типа [1].

Объектами исследования были выбраны пептиды, являющиеся потенциальными лекарственными средствами, такие как гептапептид Семакс, пептидный нейролептик WPYF, брадикинин и циклические пептиды (MW 699-1219). Реакция может быть использована для получения меченых пептидов, содержащих неприродные аминокислоты и гликозилированные фрагменты. Тетрапептид [^{2H}]WPYF, [^{2H}]брадикинин и гормон [^{2H}]мелатонин содержали в среднем 6.8, 5,2 и 10 атомов дейтерия; соответственно. Получены масс спектры равномерно меченных дейтерием пептидов и их пептидных фрагментов. В равномерно меченных дейтерием пептидах изотопная метка распределена по всей молекуле, что открывает возможность создания высоко чувствительного количественного MS-анализа равномерно меченных дейтерием пептидов и всех фрагментов, образующихся при их биотрансформации *in vivo* и *in vitro*.

Реакцию ВТКИО изучали в белках на примере гемоглобина, интерферона и человеческого генно-инженерного инсулина. Получили меченный дейтерием инсулин, содержащий в среднем 6 изотопных атомов, для его анализа использовали восстановление S-S-связей, ферментативный гидролиз глутамилэндопептидазой из *Bacillus intermedius* и ВЭЖХ. Определено распределение изотопной метки в полипептидах белка.

Литература

1. Yu.A. Zolotarev, A.K. Dadayan, Yu.A. Borisov, V.S. Kozik, *Chemical Reviews*, 2010, 110, 5425–5446

СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ КАРДИОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ АПЕЛИНА-12 И ЕГО СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ

Сидорова М.В., Азьмуко А.А., Палькеева М.Е, Молокоедов А.С., Бушуев В.Н., Шульженко В.С., Пелогейкина Ю.А., Писаренко О.И., Беспалова Ж.Д.

Институт экспериментальной кардиологии ФГУ
Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздравсоцразвития РФ, 121552 Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

E-mail: peptide@cardio.ru

Актуальной задачей экспериментальной кардиологии является разработка препаратов, снижающих нарушения функции и метаболизма сердца при ишемии и реперфузии. В этой связи большой интерес представляют короткие вазоактивные пептиды – фрагменты адипокина апелина, т.к. система апелин – APJ-рецептор играет важную роль в сердечно-сосудистом гомеостазе. Наша работа посвящена синтезу и изучению кардиопротекторной активности наименее изученного апелина-12

H-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe-OH (**I**)

и его аналогов:

H-(N^{α}Me)Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-OH (**II**),

H-(N^{α}Me)Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-NH_2 (**III**),

H-Arg($NGNO_2$)-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-NH_2 (**IV**),

обладающих более высокой протеолитической устойчивостью. Пептиды (**I – IV**) получали твердофазным методом с использованием Fmoc-технологии, очищали с помощью ВЭЖХ, структуру подтверждали данными ^{1}H-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Нами было установлено, что в процессе заключительного деблокирования апелина-12 (**I**) и его аналогов происходит сульфатирование гидроксильной группы остатка Ser с образованием соответствующего сложного эфира. При этом донором сульфогруппы служит сульфо-фрагмент отщепляющихся Pmc-защит остатков Arg. Количество побочного продукта зависит от наличия воды в составе деблокирующей смеси. Кроме того, при синтезе амидов апелина (**III, IV**) заключительное отщепление защит сопровождается образованием побочного 4-гидроксибензиламида, содержание которого в реакционной смеси колеблется от 20 до 8% (по ВЭЖХ) и также зависит от состава деблокирующей смеси.

Для исследования кардиопротекторных свойств пептидов использована модель тотальной ишемии и реперфузии изолированного перфузируемого сердца крыс. Показано, что введение любого из пептидов в сердце до ишемии достоверно улучшало восстановление интенсивности сократительной функции и показателей насосной функции сердца по сравнению с контролем. Эффективность защиты функции сердца от ишемического и реперфузионного повреждения под действием пептидов увеличивалась в ряду **I<IV<II<III**.

Секция 3

Биотехнология (конструирование и получение рекомбинантных белков и пептидов)

ЭКСПРЕССИОННЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ИНТЕИНОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ. ПРИМЕНЕНИЕ И ОГРАНИЧЕНИЯ

Есипов Р.С., Степаненко В.Н., Мирошников А.И.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: esipov@ibch.ru

Открытие белкового сплайсинга и понимание молекулярных основ этого процесса существенно расширило возможности белковой инженерии. Особенно актуально применение систем на основе интеинов в получении малых белков и полипептидов медицинского назначения, для которых N-концевая аминокислота является критичной, поскольку полностью решается проблема N-концевого формилметионина. В своей работе мы использовали несколько коммерчески доступных векторов, включающих последовательности интеинов для получения целого ряда фармакологически значимых рекомбинантных полипептидов. В результате проделанной работы были созданы лабораторные регламенты и получены опытные образцы следующих полипептидов медицинского назначения: э**кстендина-4, глюкагона человека, оксинтомодулина человека, гирудина и его аналогов, эпидермального фактора роста человека**

При всей универсальности, интеиновые системы обладают рядом существенных ограничений: частичное или полное автокаталитическое расщепление, в зависимости от первых аминокислот целевого белка, происходит непосредственно на стадии культивирования штамм продуцента, узкая область pH (6.5–7.3), в которой эффективность автокаталитического расщепления высокая. В ряде случаев такие факторы, как температура и солевой состав не только влияют на эффективность автокаталитического процесса, но и на его специфичность, что приводит к образованию побочных трудноотделимых от целевого полипептида продуктов. Отдельные сложности, в виде химических модификаций, могут возникнуть при масштабировании биотехнологии интеин-опосредованного отделения целевого продукта от гибридного белка.

Резюмируя вышесказанное, можно сделать вывод, что потенциал применения экспрессионных систем на основе интеинов в промышленной биотехнологии высокий, но пока находится на стадии внедрения.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ГЛИКОМОДИФИКАЦИИ ПОЛИМЕРОМ СИАЛОВОЙ КИСЛОТЫ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНКАЗЫ I ЧЕЛОВЕКА, ЭКСПРЕССИРОВАННОЙ В *PICHIA PASTORIS*

Бобик Т.В.[1], Смирнов И.В.[1,2], Пономаренко Н.А.[1], Генкин Д.Д., Габибов А.Г.[1,2,3]

[1]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва*
[2]*Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва*
[3]*Учреждение РАН Институт биологии гена РАН, 119334 Москва*

E-mail: bobik_tanya@mail.ru

Муковисцидоз (кистозный фиброз) – системное наследственное заболевание, характеризующееся поражением желез внутренней секреции, тяжёлыми нарушениями функций органов дыхания и желудочно-кишечного тракта. Для улучшения функции дыхания у больных муковисцидозом в настоящее время применяют лекарственный препарат Пульмозим, действующим веществом которого является рекомбинантная дезоксирибонуклеаза I человека, полученная в системе СНО.

Для создания импортозамещающего лекарственного средства Пульмозим нами была получена генетическая конструкция для экспрессии ДНКазы I человека в системе *Pichia pastoris*, содержащая нуклеотидную последовательность кДНК целевого белка вместе с последовательностью собственного лидерного пептида. В результате селекции рекомбинантных клонов нами был получен штамм-продуцент, эффективно секретирующий рекомбинантную ДНКазу I человека в культуральную среду. Препарат ДНКазы I человека был хроматографически очищен и проведен анализ его ДНК-гидролизующей активности.

Основными недостатками пульмозима является его ограниченная эффективность, являющаяся следствием быстрой энзиматической инактивации препарата в мукоальвеолярном секрете больных. Следствием этого является необходимость частой (ежедневной) ингаляции высоких доз препарата. Показано, что белки, связанные с полимером сиаловой кислоты (ПСК) обладают существенно пониженной иммуногенностью и пониженной чувствительностью к протеолитической деградации, что обуславливает пролонгированный фармакологический эффект. В данной работе были подобраны условия модификации рекомбинатной ДНКазы I с ПСК различной молекулярной массой. Для полученных конъюгатов была разработана система хроматографической очистки. Функциональная активность созданных препаратов оказалось сравнимой с образцом немодифицированной ДНКазы I человека.

НОВЫЕ БИОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ГЕМОСОРБЕНТЫ ДЛЯ ЭФФРЕНТНОЙ МЕДИЦИНЫ

Макаревич Д.А.[1], Федоров А.А.[1], Голубович В.П.[1], Голубович Д.В.[2], Кирковский В.В.[3]

[1]Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», 220041 Минск, ул. Купревича, 5/2, Беларусь
[2]ООО «Современные знания», 230023 Гродно, Скидельское шоссе, 18, Беларусь
[3]Белорусский государственный медицинский университет, 220116 Минск, пр. Дзержинского, 83, Беларусь

E-mail: golubovich@iboch.bas-net.by

В настоящее время в СНГ достаточно широко используются биоспецифические гемосорбенты, например «Овосорб», для проведения гемосорбции при целом ряде тяжелых заболеваний. В Институте биоорганической химии НАН Беларуси в последнее время создан целый ряд новых биоспецифических сорбентов, обладающих высокой степенью совместимости с цельной кровью и другими биологическим жидкостями. Созданные сорбенты используют в качестве матрицы модифицированные полимерные соединения – полиэтилен и полипропилен. В качестве лигандов на матрицы иммобилизованы низкомолекулярные синтетические пептиды, аминокислоты и другие вещества. Гемосорбенты получили название «Полимер-Овосорб – ПААГ», «Полимер-Липосорб-ПААГ», «Полимер-Антиглобулин-ПААГ», «Полимер-Овосорб – ПЭ», «Полимер-Липосорб-ПЭ», «Полимер-Антиглобулин-ПЭ», «Полимер-Овосорб – ПП», «Полимер-Липосорб-ПП», «Полимер-Антиглобулин-ПП». Указанные гемосорбенты можно применяться с целью детоксикации организма при патологических состояниях:

- Сепсис
- Общий гнойный перитонит
- Острый деструктивный панкреатит
- Обширные гнойно-некротические процессы мягких тканей
- Гипотония, обусловленная бактеремическим шоком
- Ожоговая болезнь
- Синдром сдавления
- Синдром включения после реплантации крупных сегментов
- Синдром отторжения после трансплантации органов и тканей
- Лучевая болезнь
- Острые отравления в стадии эндотоксемии
- Аллергические реакции (отек Квинке, синдром Лайелла)
- Посттрансфузионные реакции, переливание несовместимой крови и ее компонентов
- Острая печеночная недостаточность
- Острая и хроническая почечная недостаточность
- Бронхиальная астма
- Системный васкулит
- Распространенный псориаз
- Острые и хронические дерматиты

АФФИННЫЙ СОРБЕНТ НА ОСНОВЕ ТРИПТОФИЛТРЕОНИЛТИРОЗИНА ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА G. АСПЕКТЫ МЕДИЦИНСКОГО И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Левашов П.А., Овчинникова Е.Д., Афанасьева М.И., Фрид Д.А., Азьмуко А.А., Беспалова Ж.Д., Адамова И.Ю., Афанасьева О.И., Покровский С.Н.

ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздравсоцразвития РФ, 121552 Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а

E-mail: levashov@yahoo.com

Аффинные сорбенты для выделения иммуноглобулинов, в частности иммуноглобулинов класса G, из биологических жидкостей широко востребованы в медицине, биотехнологии и биохимии. Данные хроматографические материалы применяются в процедурах терапевтического афереза при лечении ряда аутоиммунных заболеваний. В биотехнологии и биохимии подобные сорбенты необходимы для выделения и очистки различных антител. На сегодняшний день наиболее распространёно использование полисахаридных матриц с иммобилизованными антителами, а также белками A и G из стафилококков и стрептококков. В литературе описаны отдельные попытки создания сорбентов для иммуноглобулинов на основе ароматических аминокислот, ковалентно связанных с нерастворимой матрицей. Также имеются данные о создании аффинных сорбентов на основе различных разветвлённых органических соединений с двумя и тремя ароматическими кольцами в составе. Ранее нами была предложена конструкция «клешневидных» лигандов с двумя ароматическими кольцами и свободной карбоксильной группой на основе коротких пептидов. Была создана линейка ди- и трипептидов, которые были использованы в качестве лигандов для создания аффинных сорбентов. Полученные сорбенты эффективно и селективно связывали иммуноглобулины G человека и других животных из биологических жидкостей. Оптимизация методов ковалентного присоединения лиганда к нерастворимой матрице через молекулярные мостики различной геометрии позволили достичь высокой сорбционной ёмкости (15–25мг иммуноглобулинов G на мл сорбента) и стабильности сорбентов в условиях использования и хранения согласно современным требованиям медицины и биотехнологии. Среди полученных сорбентов оптимальные сорбционные характеристики были продемонстрированы для материала на основе триптофилтреонилтирозина, детальному описанию которого посвящена данная работа.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного контракта Федерального агентства по науке и инновациям РФ 02.512.11.2100 от 09.04.2007.

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО ПРЕДШЕСТВЕННИКА НЕЙРОТРОФИНА NT-3 ЧЕЛОВЕКА

Сафина Д.Р.[1], Шамонов Н.А.[1], Сурин А.М.[2], Пинелис В.Г.[2], Костров С.В.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2*
[2]*Научный центр здоровья детей РАМН, 117296 Москва, Ломоносовский просп., 2/62*

E-mail: nauruz@mail.ru

Нейротрофины – гуморальные факторы, отвечающие за рост, развитие и дифференцировку нейронов, а также участвующие в регуляции их апоптоза. Нейротрофины синтезируются в виде пронейротрофинов – протяженных предшественников, содержащих дополнительную пропоследовательность. Роль пропоследовательностей нейротрофинов на настоящий момент не установлена, однако показано, что пронейротрофины функционально активны, а их действие во многих случаях альтернативно действию зрелого белка.

На основе штамма *E. coli* нами были созданы рекомбинантные продуценты предшественника нейротрофина NT-3 – proNT-3, а также был сконструирован продуцент пронейротрофина с модифицированным сайтом процессинга – proNT-3*. Разработаны методы выделения, очистки и фолдинга рекомбинантных нейротрофинов.

Проведен анализ биологической активности полученных нами рекомбинантных предшественников нейротрофина человека с использованием модельной системы диссоциированной культуры спинномозговых ганглиев (СМГ) куриных эмбрионов. Показано, что proNT-3 и proNT-3* не оказывают дифференцирующего действия. В тоже время proNT-3, обработанный трипсином, вызывает образование отростков нейронов в культуре СМГ. Исследовано влияние пронейротрофина proNT-3* на выживаемость нейронов в системе глутаматной эксайтотоксичности, моделирующей ситуацию механического или ишемического повреждения центральной нервной системы. Показано, что пронейротрофин человека proNT-3* снижает выживаемость нейрональных клеток в данной модельной системе.

Работа поддержана Программами фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Фундаментальные науки – медицине», а также РФФИ (грант № 09-04-00870).

НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ КОМПОНЕНТОВ ЭКЗОТОКСИНА *BACILLUS ANTHRACIS*

Панина А.А.[1], Алиев Т.К.[2], Топорова В.А.[1], Шемчукова О.Б.[3], Бикетов С.Ф.[4], Долгих Д.А.[1], Свешников П.Г.[3]

[1]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
[2]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва
[3]АО Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва
[4]ФГУП Государственный научный центр прикладной микробиологии, Оболенск, Московская обл.

E-mail: panina@mx.ibch.ru

Среди широкого спектра различных инфекционных заболеваний особое место занимает сибирская язва. Данное заболевание, вызываемое возбудителем *Bacillus anthracis*, широко распространено во многих странах Азии, Африки и Южной Америки. Очаги сибирской язвы есть и на территории России. Кроме того, по оценкам экспертов в области биобезопасности, сибирская язва, наряду с чумой и оспой, также является наиболее мощным и доступным инфекционным агентом для биотерроризма.

Системная токсемия является основной причиной смертности при данном заболевании. Высокая степень морбидности при поражении бациллами сибирской язвы во многом вызвана тем фактом, что элиминация болезнетворных микробов при помощи терапии антибиотиками не способна значительно понизить уровень интоксикации организма человека. Эффективная терапия при заболевании сибирской язвой должна сочетать антибиотикотерапию и нейтрализацию сибиреязвенных токсинов.

Создана панель гибридом, продуцирующих высокоэффективные нейтрализующие моноклональные антитела против протективного антигена (ПА) и летального фактора (ЛФ) *B. anthracis.* В тестах на мышах было показано, что введение антител против ПА и ЛФ способствуют повышению выживаемости до 80–90 процентов. Из гибридомных линий, продуцирующих моноклональные мышиные антитела, выделена тотальная РНК, на основе которой создана кДНК. С помощью специфичных праймеров амплифицированы вариабельные домены легких и тяжелых цепей антител, определена их первичная структура. Создан ряд искусственных генов, кодирующих химерные антитела в форме Fab-фрагментов, с использованием константных участков человеческих иммуноглобулинов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России».

МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ВЕЧНОЙ МЕРЗЛОТЫ КАК ИСТОЧНИК НОВЫХ ГЕНОВ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

Петровская Л.Е.[1], Лукашев Е.П.[2], Новотоцкая-Власова К.А.[3], Крюкова Е.А.[1], Сычев С.В.[1], Спирина Е.В.[3], Ривкина Е.М.[3], Гиличинский Д.А.[3], Долгих Д.А.[1], Кирпичников М.П.[1,2]

[1]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*
[2]*Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*
[3]*Учреждение РАН Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пущино, Московская обл.*

E-mail: lpetr65@yahoo.com

Вечная мерзлота занимает более 50% территории России и представляет собой породы, находящиеся в мерзлом состоянии десятки и сотни тысяч лет. Обитающие в ней бактерии, археи и низшие эукариоты адаптированы к различным неблагоприятным факторам, включая пониженную температуру, низкую активность воды, ограниченную доступность питательных веществ и другие. Идентификация и изучение белков представителей микробных сообществ вечной мерзлоты способствует исследованию механизмов адаптации на молекулярном уровне, а также получению материалов с новыми характеристиками для биотехнологического использования.

Нами проведено клонирование гена бактериородопсина *Exiguobacterium sibiricum* (ESR) и проведено исследование функциональных свойств рекомбинантного белка. Установлено, что при поглощении света в суспензии ESR-содержащих липосом наблюдается выброс протонов в среду, таким образом, полученный нами белок является новым представителем семейства протонных насосов.

Ферменты, выделенные из микроорганизмов-экстремофилов, представляют значительный интерес для биотехнологии, поскольку обладают активностью в различных диапазонах температуры, pH и т.д. Нами проведено исследование липолитической системы *Psychrobacter cryohalolentis*, в геноме которого обнаружен ряд генов, кодирующих липазы и эстеразы. Для трех из них сконструированы системы экспрессии в *E. coli.* Характеристика свойств полученных белков демонстрирует наличие высокой каталитической активности при низкой температуре, а также относительно широкого диапазона температурной стабильности.

Работа проводится при финансовой поддержке гранта РФФИ № 10-05-00079, программ РАН «Молекулярная и клеточная биология», «Происхождение биосферы и эволюция геобиологических систем» и Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 г.

Секция 4

Физико-химические и компьютерные методы исследования. Пространственная структура и динамика. Биоинформатика

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ ДВУХДОМЕННОГО N-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА АРХЕЙНОГО РИБОСОМНОГО БЕЛКА L10(P0) И УТОЧНЕНИЕ КРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ АРХЕЙНОЙ РИБОСОМЫ

Гарбер М.Б.[1], Кравченко О.В.[1], Митрошин И.В.[1], Пиндл В.[2], Никонов С.В.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт белка РАН,*
142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 4
[2]*Biocenter, Division of Medical Biochemistry, Innsbruck Medical University,*
Fritz-Pregl-Strasse 3, 6020, Австрия

Рибосомный белок L10 в бактериях и его аналог белок P0 в археях и эукариотах формируют основание функционально-важного бокового выступа большой рибосомной субчастицы. Этот рибосомный выступ (L12-выступ у бактерий, P1-выступ в археях и P1/P2-выступ у эукариот) обладает большой подвижностью, и по этой причине его структура не определяется в кристаллах интактных рибосомных частиц. Белки, формирующие данный выступ, существенно различаются по своей структуре в разных доменах жизни: белки архей и эукариот гомологичны между собой, но отличаются от своих бактериальных аналогов. Эти белки определяют специфическое узнавание факторов элонгации, которые у бактерий отличаются по структуре от аналогичных факторов архей и эукариот. Нами недавно была определена структура двухдоменного N-концевого фрагмента белка L10(P0) из археи *Methanococcus jannaschii* с разрешением 1,6 Å [1]. Встраивание определенной нами структуры в модель архейной рибосомы уточняет структуру основания P1-выступа этой рибосомы и показывает каким образом второй домен белка L10(P0), который отсутствует в бактериальном белке L10, может дискриминировать связывание бактериальных факторов элонгации к рибосоме.

Продолжением этих исследований является работа по кристаллизации и определению структуры комплекса между вышеописанным двухдоменным фрагментом белка P0 (P0NTF) и специфическим участком 23S рРНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук, Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 11-04-00327а) и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Литература

1. O. Kravchenko, I. Mitroshin, S. Nikonov, W. Piendl and M. Garber. (2010). Structure of a two-domain N-terminal fragment of ribosomal protein L10 from *Methanococcus jannaschii* reveals a specific piece of the archaeal ribosomal stalk. *J. Mol. Biol*., 399: 214–220.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ПЕПТИДОВ НА ИХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИШЕНИ В РАСТВОРЕ И В МЕМБРАНЕ: ВОЗМОЖНОСТИ КОМПЬЮТЕРНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

Волынский П.Е.[1], Полянский А.А.[1], Логинов П.А.[2], Озеров И.В.[3], Балицкая Е.Д.[3], Ефремов Р.Г.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*
[2]*Московский физико-технический институт (государственный университет), 141700 Долгопрудный, Московская обл., Институтский пер., 9*
[3]*МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы*

E-mail: efremov@nmr.ru

Цель работы – установление факторов, определяющих взаимодействие пептидов с водорастворимыми и мембранными белками, а также с липидным бислоем клеточных мембран. Методы компьютерного моделирования применены к поиску белков -потенциальных мишеней действия коротких регуляторных пептидов (на примере глипролинов) – и к анализу молекулярных механизмов связывания мембрано-активных и трансмембранных пептидов с липидными и белковыми компонентами мембран клеток бактерий и эукариот. Результаты используются для рационального компьютерного конструирования биологически активных молекул с заданными свойствами. Для решения указанных задач разработан информационно-вычислительный комплекс, реализующий согласованное применение современных методов молекулярного моделирования [1–4]. Создан ряд мутантных форм изучаемых пептидов, обладающих «улучшенными» характеристиками биологической активности. Предложен вычислительный подход, позволяющий повысить эффективность молекулярного докинга белок-лиганд. Метод основан на концепции комплементарности гидрофобных свойств взаимодействующих молекул и реализован в виде пакета программ PLATINUM с веб-интерфейсом [4] *(http://model.nmr.ru/platinum).*

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований, программы Президиума РАН «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов», Министерства образования и науки РФ, гранта Президента МК-8439.2010.4.

Литература

1. Efremov R.G., *et al.* (2007). *Curr. Med. Chem.* 14, 393–415.
2. Volynsky P.E., *et al.* (2010). *Physical Biology* 7, 1–15.
3. Polyansky A.A., *et al.* (2011). *Adv. Prot. Chem. Struct. Biol.* 83, 129–161.
4. Pyrkov T.V., *et al.* (2009). *Bioinformatics.* 25, 1201–1202.

ВЫРАЩИВАНИЕ КРИСТАЛЛОВ БЕЛКОВ НА МЕЖДУНАРОДНОЙ КОСМИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ МЕТОДОМ ВСТРЕЧНОЙ ДИФФУЗИИ

Куранова И.П., Ковальчук М.В.

Учреждение РАН Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН, 119333 Москва, Ленинский просп., 59

E-mail: inna@ns.crys,ras.ru; koval@ns.crys.ras.ru

Для рентгеновского исследования пространственной структуры белков при высоком разрешении необходимы кристаллы высокого дифракционного качества. Степень совершенства кристалла в значительной степени зависит от условий роста, в том числе от характера транспорта вещества к растущему кристаллу. При единичной гравитации транспорт молекул к растущему кристаллу осуществляется посредством конвекционных потоков, в то время как более совершенные кристаллы белков вырастают в условиях диффузионного транспорта, который преобладает в микрогравитации. Поэтому выращивание кристаллов белков в невесомости используется, чтобы улучшить дифракционное качество кристаллов.

Ряд экспериментов по выращиванию кристаллов белков проведен на Международной космической станции в кристаллизационном боксе Kibo японского космического агентства JAXA методом встречной диффузии, описанным в [1].

Предварительные наземные эксперименты по первоначальному подбору и оптимизации условий также проведены методом встречной диффузии в капиллярах. Осадитель вводили в заполненный раствором белка капилляр через слой геля, в результате чего по длине капилляра устанавливались градиент концентрации белка и градиент концентрации осадителя. Кристаллы, появлявшиеся на разных расстояниях от начала капилляра, росли в разных условиях и отличались по размеру и качеству.

Методом встречной диффузии в невесомости были выращены кристаллы фосфопантетеин аденилилтрансферазы *Mycobacterium tuberculosis* и ее комплексов с функциональными лигандами, тимидинфосфорилазы *E. coli* в комплексе с ингибиторами, ряд мутантных форм карбоксипептидазы T из *Thermoactinomyces vulgaris*. От выращенных кристаллов на синхротроне SPring8 собраны дифракционные наборы. Выращенные в невесомости кристаллы дифрагировали до более высокого разрешения, чем кристаллы, полученные в наземных условиях.

Эксперименты проведены при участии представителей японского космического агентства JAXA.

Работа выполнена при финансовой поддержке ЦНИИМаш Роскосмоса.

Литература

1. Tanaka, H., Inaka, K., Sugiyama, S., Takahashi, S., Sano, S., Sato, M., Yoshitomi, S. *J. Synchrotron. Rad*. (2004). 11, 45–48

НОВЫЕ ПОДХОДЫ В РЕШЕНИИ ЗАДАЧ ПРОТЕОМИКИ, ОСНОВАННЫЕ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ НАНОКРИСТАЛЛОВ (КВАНТОВЫХ ТОЧЕК)

Олейников В.А.[1], Генералова А.Н.[1], Мочалов К.Е.[1], Артемьев М.В.[2], Сизова С.В.[1], Зубов В.П.[1], Набиев И.Р.[3]

[1]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*
[2]*Институт физико-химических проблем, Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*
[3]*Университет города Реймс, Шампань-Арден, Реймс, Франция*

Использование уникальных свойств полупроводниковых флуоресцентных нанокристаллов (квантовых точек) позволяет реализовать новые подходы к созданию аналитических систем для одновременной детекции множества объектов. Благодаря высокой яркости, нанокристаллы легко регистрируются как индивидуальные объекты с помощью обычного микроскопического оборудования; они чрезвычайно устойчивы к фототушению; обладают уникальными возможностями для мультиплексирования. В случае выбора в качестве объектов белков и пептидов, это позволяет создать новую инструментальную базу для решения задач протеомики и пептидомики. Основой нового подхода является формирование конъюгатов (гибридов), включающих одну или несколько квантовых точек и присоединенных с ними распознающих молекул.

К настоящему времени, нами разработаны и синтезируются три типа конъюгатов.

(1) Единичные нанокристаллы с присоединенными к ним распознающими молекулами, в качестве которых использованы полноразмерные антитела или их фрагменты.

(2) Полимерные микрочастицы, содержащие один или несколько нанокристаллов. Заключение нанокристаллов в полимерную матрицу позволяет более надежно изолировать нанокристаллы от окружающей среды и применять более простые способы присоединения распознающих молекул к поверхности микрочастиц.

(3) Полимерные микрочастицы, спектрально кодированные флуоресцентными нанокристаллами, являющиеся основой создания «жидких биочипов» для мультиплексной детекции белков.

Продемонстрировано использование эффекта FRET (Ферстеровский резонансный перенос энергии) в аналитических системах, содержащих квантовые точки.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и ФЦП Министерства образования и науки РФ.

СВОЙСТВА ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ АЦИЛОВ ФОСФОЛИПИДОВ И ЛИПИД-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ (КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ)

Рабинович А.Л., Рипатти П.О.

Учреждение РАН Институт биологии КарНЦ РАН,
185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

E-mail: rabinov@krc.karelia.ru

В состав биологических мембран входит множество компонентов. Одна из фундаментальных проблем – установление на молекулярном уровне связей между структурой, свойствами и функционированием столь сложной системы. Частью общей проблемы является изучение этих вопросов для молекул липидов, которые, образуя «матрицу» мембраны, выполняют и множество других функций. Так, полиненасыщенными цепями обогащены липидные молекулы, непосредственно связанные с интегральными белками. В данной работе методами компьютерного моделирования проведено изучение и сравнение свойств углеводородных цепей разной степени ненасыщенности. Показано, что внедрение в насыщенную углеводородную цепь одной двойной связи *cis* и последующее увеличение количества таких связей постепенно меняет свойства цепи. При максимально возможной степени ненасыщенности, когда количество атомов углерода фиксировано и все двойные связи являются метиленпрерывающимися, цепь обладает особенными, уникальными физическими свойствами: в ней наиболее велика степень ориентационного разупорядочения простых связей C–C, соседних с двойными C=C; наиболее велики угловые флуктуации связей C–H во всех CH_2-группах вдоль по цепи, и пространственные флуктуации атомов углерода двойных связей. При изменении температуры среды характеристики полиненасыщенной цепи в целом и каждого ее сегмента в отдельности остаются наиболее стабильными по сравнению с характеристиками цепей иного строения. Если липиды с полиненасыщенными цепями в биомембранах преимущественно расположены в аннулярных слоях разных белков, то специфические свойства полиеновых цепей могут обеспечивать поддержание надлежащей конформационной подвижности этих белков. Этим фундаментальным механизмом можно объяснить тот факт, что докозагексаеновая кислота и другие полиненасыщенные ацилы оказывают эффективное влияние на биохимические процессы и разнообразные болезни, которые кажутся не связанными между собой.

Работа поддержана РФФИ (проект № 10-03-00201а), программой Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-3731.2010.4 и Swedish Institute Visby programme 00961/2008, 00675/2009.

ЦИКЛИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ И ИХ РОЛЬ В СВОРАЧИВАНИИ БЕЛКОВ

Ефимов А.В.

Учреждение РАН Институт белка РАН, 142290 Пущино, ул. Институтская, 4, Московская обл.

E-mail: efimov@protres.ru

Замкнутые структуры различного типа широко распространены в белках на всех уровнях структурной организации. По-видимому, высокая частота встречаемости замкнутых структур является следствием их более высокой стабильности и большей кооперативности по сравнению с открытыми аналогами. На уровне супервторичных структур замыкание происходит тремя основными способами – с помощью суперспиралей, расщепленных β-шпилек и SS-мостиков. Вторичное замыкание β-шпилек, трехтяжевых β-листов и βαβ-единиц представляет особый интерес, поскольку приводит к образованию структурных мотивов с уникальными укладками цепи и определенной хиральностью. Структурные мотивы с уникальными укладками могут быть зародышами при сворачивании или стартовыми структурами при моделировании белков. Моделирование сворачивания белков с помощью структурных деревьев показывает, что рост структур идет преимущественно по тем путям, которые ведут к образованию замкнутых структур.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 10-04-00727) и Федерального агентства по науке и инновациям (№ 02.740.11.0295).

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ОБОЛОЧЕЧНЫХ ВИРУСОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ПРОТЕОЛИЗА, MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ И МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Кордюкова Л.В.[1], Серебрякова М.В.[2], Полянский А.А.[3], Veit M.[4]

[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1-40
[2]ГУ НИИ физико-химической медицины Росздрава, 119992 Москва, ул. Малая Пироговская, 1а
[3]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
[4]Immunology and Molecular Biology, Veterinary Medicine Faculty, Free University, Philippstr. 13, 10115 Berlin, Germany

E-mail: kord@belozersky.msu.ru

Структурное исследование мембранных белков и пептидов методом РСА затруднено. Мы разработали альтернативный подход для изучения структурных особенностей гемагглютинина (НА) вируса гриппа и сливающих белков других оболочечных вирусов, включающий протеолиз гликопротеинов в составе вирионов или мицелл, экстракцию заякоревающих сегментов в органическую фазу и анализ полученных гидрофобных сегментов методом MALDI-TOF MS анализа.

НА вируса гриппа – белок I типа, включает 1 трансмембранный (ТМ) домен и организован в мембране в виде гомотримеров. Три высоко консервативных остатка цистеина в С-концевой области НА вируса гриппа А ацилированы высшими жирными кислотами. Различают 16 антигенных подтипов вируса гриппа А, которые эволюционно разделены на 2 группы: группу 1 и группу 2.

Мы обнаружили: 1) НА вируса гриппа А ацилирован не только пальмитатами, но и стеаратами, которые связаны исключительно с остатком цистеина, расположенном на границе ТМ и цитоплазматического доменов. Данные подтверждены MS/MS и анализом серии мутантов с одиночными заменами сайтов ацилирования; 2) та же приоритетная локализация стеарата на ТМ-цистеине обнаружена у НА вируса гриппа В, HEF-белке вируса гриппа С, G-белке вируса везикулярного стоматита, F-белке вируса болезни Ньюкасла, E1 и E2 белках вируса леса Семлики; 3) обнаружена разная степень ассоциации ТМ-доменов в составе гомотримеров у представителей групп 1 и 2 НА вируса гриппа А. Отсутствие гидролиза ферментами ТМ-доменов в составе мицелл НА из группы 2 согласуется с их более плотной гомотримерной ассоциацией в моделях, полученных методами молекулярного моделирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 09-04-01160-а, РФФИ-ННИО 10-04-91333-а, гранта Президента РФ МК-8439.2010.4.

ВЛИЯНИЕ АКТИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ НА ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ МОНОМЕРНОГО G-АКТИНА

Левицкий Д.И.[1,2], Пивоварова А.В.[1], Чеботарева Н.А.[1]

[1]Учреждение РАН Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва, Ленинский просп., 33
[2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

E-mail: Levitsky@inbi.ras.ru

Используя метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), мы исследовали влияние актин-связывающих белков (кофилина, твинфилина и профилина) на характер тепловой денатурации мономерного G-актина. Цель этих экспериментов состояла в том, чтобы выяснить роль нуклеотид-связывающей щели между двумя доменами актина в стабилизации его молекулы. Ранее на основании результатов многочисленных исследований методом ДСК нами было высказано предположение о том, что стабильность G-актина во многом определяется именно состоянием его междоменной нуклеотид-связывающей щели (Levitsky *et al.,* (2008) *FEBS J.* 275, 4280–4295; Pivovarova *et al*. (2010) *FEBS J.* 277, 4280–4295): переход ее в более «открытое» состояние снижает термостабильность актина, а переход в более «закрытое» состояние – увеличивает термостабильность. Из литературы было известно, что актин-связывающие белки могут оказывать совершенно противоположное влияние на состояние нуклеотид-связывающей междоменной щели молекулы актина (например, кофилин и твинфилин «закрывают» щель, а профилин, напротив, «открывает» ее). Используя метод ДСК, мы показали, что кофилин и твинфилин заметно увеличивают термостабильность мономерного G-актина. При этом обнаружена и заметная разница между этими белками: кофилин стабилизирует G-актин в разных его состояниях (как ATP-актин, так и ADP-актин), значительно смещая кривую теплопоглощения в сторону более высокой температуры, тогда как твинфилин образует прочные комплексы с ATP-G-актином, не оказывая существенного влияния на его термостабильность, но при этом заметно стабилизирует ADP-G-актин. Напротив, профилин заметно дестабилизирует G-актин, то есть значительно снижает его термостабильность, сдвигая кривую теплопоглощения в сторону более низкой температуры (на 3–9°C в зависимости от молярного отношения профилин/актин). Таким образом, нам удалось подтвердить высказанное ранее предположение о том, стабильность (термостабильность) актина в значительной степени определяется состоянием нуклеотид-связывающей щели – более: «открытым» или более «закрытым».

Работа выполнена при поддержке РФФИ и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ВЛИЯНИЕ ТОЛЩИНЫ МЕМБРАНЫ НА СТРУКТУРУ ДИМЕРА ТРАНСМЕМБРАННЫХ ФРАГМЕНТОВ FGFR3

Волынский П.Е., Фахрутдинова Г.Н., Полянский А.А., Ефремов Р.Г.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: volynski@yandex.ru

Рецепторные тирозин киназы (РТК) играют большую роль в метаболизме клеток, отвечая за их пролиферацию и дифференциацию. Эти белки состоят из трех доменов: внеклеточного, цитоплазматического и трансмембранного домена, который представляет собой трансмембранную альфа-спираль. Активация РТК происходит при связывании лигандов в димерном состоянии рецептора. Трансмембранные домены РТК определяют структурную организацию димеров и регулируют их стабильность. Более того, для ряда РТК показано, что их трансмембранные фрагменты имеют различную структуру на разных этапах функционирования белка (например, активная и пассивная формы). Одним их важных факторов, который влияет на структуру и заселенность различных форм димера является липидный состав мембраны. К примеру, показано, что некоторые РТК образуют активные димеры только в составе липидных микродоменов (рафтов).

Эта работа посвящена компьютерному моделированию и характеризации возможных моделей димера трансмембранных фрагментов рецептора FGFR3. Комбинированное использование различных подходов молекулярного моделирования позволило выделить ограниченное число моделей, которые могут рассматриваться как возможные структуры димера в различных состояниях белка (активая, пассивная промежуточная формы). Ранжирование предсказанных моделей и исследование влияния состава мембраны на структурные предпочтения было осуществлено посредством расчета свободной энергии димеризации в различных модельных мембранах. Согласно проведенным исследованиям, липидный состав влияет на структурные предпочтения димера трансмембранных фрагментов FGFR3: одни модели предпочтительно формируются в толстых бислоях, в то время как другие реализуются в тонких мембранах. Таким образом, проведенные исследования позволяют получить важную информацию, которая способствует пониманию функционирования РТК.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и грантов РФФИ. При проведении расчетов использовались вычислительные ресурсы суперкомпьютера СКИФ МГУ «Чебышёв» и МСЦ РАН.

СТРУКТУРНЫЕ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ КАНАЛОВ ЧЕЛОВЕКА С ЛИГАНДАМИ (БЛОКАТОРАМИ)

Шайтан К.В., Соколова О.С., Кирпичников М.П.

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

E-mail: shaytan49@yandex.ru

Мембранные белки составляют около 30% всех белков организма, при этом около половины из них – это белки-переносчики и ионные каналы. Ионные каналы контролируют движение ионов через клеточную мембрану, таким образом, создавая и регулируя электрическую активность клетки. Потенциал-зависимые калиевые каналы (Kv) представляют собой наиболее обширную и разнообразную группу ионных каналов. Мутации в генах, связанные с активностью этих каналов, проводят к тяжелым наследственным заболеваниям. Структурные исследования Kv каналов представляют большой интерес, так как каналы могут быть потенциально использованы в качестве мишеней для лекарственных агентов.

В данной работе методами электронной микроскопии белковых молекул впервые получены трехмерные структуры каналов K10.2wt, Kv2.1ΔCTA и Kv2.1ΔC с разрешением 25Å. Для интерпретации полученных структур было использовано моделирование мембранной части канала Kv2.1 по гомологии с Kv1.2 в открытой и закрытой конформации. Показано, что модель открытого канала хорошо соответствует трехмерной структуре канала Kv2.1ΔC, в то время как модель закрытого канала сходна с трехмерной структурой канала Kv2.1ΔCTA. Эти результаты подтверждают ранее высказанную гипотезу о том, что видимая перегруппировка субдоменов каналов Kv2.1ΔC и Kv2.1ΔCTA может являться следствием изменения активационного состояния канала при удалении C-концевых доменов, что также согласуется с данными других авторов.

Методами молекулярной динамики исследованы взаимодействия ряда лигандов с ионными каналами, помещенными в липидный бислой, а также ионная проводимость потенциал-зависимого калиевого канала в полноатомной модели на траекториях более 100нс. Продемонстрированы эффекты межионного взаимодействия в канале на его проводимость.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Минобрнауки.

ПОИСК НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДНЫХ АНАЛОГОВ ФАКТОРОВ РОСТА И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Голубович В.П.[1], Шутова И.В.[1], Голубович Д.В.[2], Грибовская О.В.[1], Коваленко А.П.[3]

[1]Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», 220041 Минск, ул. Купревича, 5/2, Беларусь
[2]ООО «Современные знания», 230023 Гродно, Скидельское шоссе, 18, Беларусь
[3]ООО Научно-исследовательский лечебно-реабилитационный центр «Институт биологической медицины», 109147 Москва, ул. Марксистская, 34/7

E-mail: golubovich@iboch.bas-net.by

Ранее нами разработана математическая модель, на основании которой создан прогностический комплекс для осуществления конструирования функциональных сайтов глобулярных белков, реализованный в виде компьютерной программы. Данный комплекс позволяет проводить анализ поверхности исследуемых белков и давать сведения о местоположении на поверхности исследуемой глобулы структур. Исходными данными для работы комплекса служат сведения о первичной и пространственной структуре, исследуемых белков. Компьютерное моделирование позволяет идентифицировать участки, находящиеся на поверхности глобулы белка и взаимодействующие с соответствующими рецепторами на оболочке стволовых клеток. На основе полученных данных осуществлялся прогноз аналогов функциональных сайтов в виде олигопептидных соединений размером от 4 до 6 аминокислотных остатков.

С помощью комплекса были изучены некоторые факторы роста и дифференцировки стволовых клеток (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, фактор роста гепатоцитов HGF, фактор роста сосудистого эндотелия VEGF и основной фактор роста фибробластов bFGF, фактор стволовых клеток SCF и другие). Дан прогноз низкомолекулярных пептидных аналогов этих факторов, полностью сохраняющих дифференцирующую активность исследуемых белков. Полученные результаты подтверждены последующим синтезом и сравнительным испытанием на искомую биологическую активность аналогов с сопоставлением с природными факторами роста.

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОИСК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ В ТРАНСКРИПТОМАХ

Козлов С.А.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: serg@ibch.ru

Анализ expressed sequence tags (ESTs) является современным эффективным методом, применяемым в различных областях молекулярной биологии. Особенностью метода является получение и секвенирование большого числа отдельных клонов, количество которых может варьироваться в пределах от нескольких сотен до десятков тысяч. Стандартный процесс работы с EST включает этапы обработки биоматериала, получение клонов, создание библиотеки и несколько этапов ее анализа от группировки в контиги до аннотации и опубликования результатов. Использование контигов снижает эффективность поиска закодированных в банке структур коротких биологически активных полипептидов, так как эффективность их сравнения заметно ниже чем поиск гомологии между белками. При этом такие молекулы представляют огромный практический интерес для генерации лекарственных средств нового поколения.

В EST банках ядовитых животных содержатся целые комбинаторные библиотеки, где компоненты могут отличаться друг от друга точечной мутацией или делецией всего одного аминокислотного остатка, приводящей к значительному изменению специфичности биологического действия. Для обнаружения активных полипептидов вместо аннотации всего банка предлагается доставать только необходимую структурную информацию соответствующую поисковому критерию. Предполагаемый критерий для выборки нужных последовательностей, в каждом отдельном случае формируется на основе структурных особенностей искомых полипептидов.

Для формирования запросов в базу EST и поиска структурного родства предлагается использовать single residue distribution analysis. С помощью которого при анализе банка EST морской анемоны *Anemonia viridis*, используя 14 различных поисковых критериев, было обнаружено 89 биологически активных полипептидов с предположительно антимикробной функцией и модулирующей активностью на различные типы ионных каналов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Президиума РАН (программа «Молекулярная и клеточная биология») и РФФИ (грант № 11-04-00706-а).

РОЛЬ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ И ФАЗОВЫХ СОСТОЯНИЙ РАСТВОРА В РЕГУЛЯЦИИ СТРУКТУРНОЙ ДИНАМИКИ БЕЛКОВ

Рожков С.П., Горюнов А.С.

Учреждение РАН Институт биологии КарНЦ РАН,
185610 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

E-mail: rozhkov@krc.karelia.ru

Повышенное внимание, которое уделяется в последнее время исследованию феномена и механизмов неспецифического взаимодействия заряженных белков, приводящего к фазовому переходу типа жидкость-жидкость и образованию метастабильных белковых кластеров [1], обусловлено их ролью в механизмах биологических процессов от кристаллизации белков до фибриллогенеза белков и амилоидных патологий. В то же время, влияние образования кластеров и связанной с этим специфики растворимости белков на динамическое и функциональное состоянии макромолекул до сих пор не рассматривалось. Методом ЭПР спиновых меток и зондов исследовались структурно-динамические изменения молекул лизоцима и альбумина в широком диапазоне изменения концентрации солей и температуры. Сопоставление этих изменений с фазовыми диаграммами растворов белка показало, что области закритических фазовых переходов на фазовой диаграмме соответствуют состояния белка с повышенной гибкостью структуры и увеличенной доступностью центров сорбции для ионов электролита в белковой глобуле. Это позволяет предположить возможный механизм формирования амилоидных фибрилл, который основан на том, что в области бинодали фазовой диаграммы, где существует квазиравновесие метастабильных белковых кластеров плотной фазы и разбавленной фазы раствора белка, должна наблюдаться десорбция ионов электролита с молекул белка, формирующих кластер. В противном случае значительный рост электростатической свободной энергии белковой глобулы может приводить к ее денатурационным изменениям с последующим развитием полимеризационных и/или агрегационных процессов. Показано, что гомогенная нуклеация полимеров амилоидных или прионных белков является двухступенчатым процессом [2]. Первым шагом является обратимый фазовый переход типа жидкость-жидкость, создающий высококонцентрированного аморфного предшественника для последующих процессов полимеризации.

Литература

1. Rozhkov S.P., Goryunov A.S. *Biophys.Chem.* (2010) 151 (1-2). P.22-28.
2. Galkin et al. *Biophys.J.* (2007) 93. P.902

КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ZN-ТФП В ХЛОРОФОРМЕ КАК МОДЕЛЬ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ С УЧАСТИЕМ МЕТАЛЛОПОРФИРИНОВ В ВОДНЫХ И ОРГАНИЧЕСКИХ СРЕДАХ

Андреев В.П.[1], Соболев П.С.[1], Зайцев Д.О.[1], Романова М.И.[1], Ларкина Е.А.[2], Ткачевская Е.П.[2]

[1]Петрозаводский государственный университет, 185910 Петрозаводск, пр. Ленина, 33
[2]Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, 119571 Москва, просп. Вернадского, 86

E-mail: andreev@psu.karelia.ru
E-mail: elenatkachevskaya@yandex.ru

Нами обнаружено, что на основании кинетических и термодинамических параметров, характеризующих процессы экстракоординации металлопорфиринов (МП) с различными типами лигандов можно прогнозировать константы скоростей, ΔH и ΔS нуклеофильных и ферментативных реакций, поведение которых описывается уравнениями Гамете и Тафта. Это объясняется тем, что комплекс МП, переходное состояние в реакциях SN и фермент-субстратный комплекс с одним и тем же лигандом/нуклеофилом/субстратом имеют много общего.

В качестве параметров, характеризующих их реакционную способность, нами рекомендуется использовать константы устойчивости (К) комплексов цинк(II)тетрафенилпорфина (Zn-ТФП) и величины смещения (Δλ) его максимумов полос поглощения в электронных спектрах (ЭСП) при координации с различными типами лигандов в хлороформе. К настоящему времени спектрофотометрическим методом исследованы процессы комплексообразования Zn-ТФП с пиридинами, анилинами и N-оксидами пиридинов, хинолинов, акридинов, а также аминами и спиртами. В отсутствие стерических факторов между lgK комплексов Zn-ТФП и Δλ, с одной стороны, а также величинами $pKBH_+$ лигандов в воде и σ-константами Гаммета заместителей в ароматическом кольце, с другой стороны, существуют линейные корреляции. Между константами скоростей реакций нуклеофильного замещения и количественными характеристиками процесса комплексообразования Zn-ТФП с участием пиридинов, анилинов, N-оксидов выявлены линейные зависимости (уравнение Гаммета). Для описания поведения аминов и спиртов требуется использование расширенного уравнения Тафта/Литвиненко.

Установлено, что термодинамические параметры образования (ΔH0, ΔS0, ΔG0) комплексов Zn-ТФП с пиридинами и аминами линейно коррелируют с lgK, Δλ, $pKBH_+$, σ-константами Гаммета заместителей в пиридиновом кольце и активационными параметрами реакций нуклеофильного замещения. Вычислено значение изоравновесной температуры ($T_{изо}$=196 К), при которой изменение энергии Гиббса не должно зависеть от природы первичных аминов и пиридинов с заместителями в положениях 3 и 4. Процессы координации Zn-ТФП с анилинами и N-оксидами пиридинов и хинолинов, замещенными в 3-м и 4-м положениях ароматического кольца (в отличие от аминов и пиридинов) являются изоэнтальпийными.

Многие важнейшие биологические процессы (фотосинтез, дыхание, ферментативный катализ) протекают с участием металлопорфиринов благодаря их способ-

ности к экстракоординации с разнообразными по своей природе электронодонорными лигандами. Мы предположили, что и при образовании фермент-субстратных комплексов момент взаимодействия между металлопорфирином (простетической группой фермента) и лигандом (субстратом) может существенным образом сказываться как на направлении, так и на скорости ферментативного превращения на данном этапе реакции или даже процесса в целом. Действительно, между логарифмами констант скоростей различных стадий взаимодействия пероксидазы хрена (lg k) с мета- и пара-замещенными анилинами и lgK, $pKBH_+$, $\Delta\lambda$ и σ-константами выполняются линейные корреляции.

МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ ФИЛАМЕНТОВ ИЗ ПЕПТИДА H-(RADA)$_4$-OH

Удовиченко И.П.[1], Данилкович А.В.[1], Липкин В.М.[1,2]

[1]*Филиал Учреждения РАН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290 Пущино, Московская обл., пр. Науки, 6*
[2]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

E-mail: iudovichenko@rambler.ru

Самоформирующиеся пептиды способны образовывать из мономеров сложные упорядоченные олигомерные структуры, имеющие потенциал использования в технике и медицине. Так, филаменты, образуемые пептидом H-(RADA)$_4$-OH могут найти применение в качестве среды для пролиферации клеток в тканевой инженерии, в частности, при лечении сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с ишемией.

Процесс образования филаментов из H-(RADA)$_4$-OH был исследован *in silico* моделированием молекулярной динамики в Amber11 в явном водном окружении и силовом поле ff03 пептидных мономеров, димеров, тетрамеров, октамеров и додекамеров с использованием докинга в HEX6.1 в режиме учета геометрии модели и поверхностных зарядов, а также GRAMM-X.

Анализ энергии образования комплексов ΔG, $\Delta\mu^{GBSA}$, E^{MM} демонстрирует тенденцию к образованию олигомерных структур. Данные по RMSd и RMSf, а также карты Рамачандрана доказывают уверенную стабилизацию структур, начиная с тетрамера.

Показано, что ядром образования филамента можно считать тетрамер, в котором β-антипараллельные структуры димеров стабилизируются гидрофобными взаимодействиями остатков Ala между димерами, а сам филамент представляет собой двухслойную структуру, где внутри каждого слоя присутствуют β-антипараллельные структуры, а слои связаны между собой гидрофобными взаимодействиями.

Настоящая работа поддержана грантами № 02.740.11.5224, № 14.740.11.0170 и № 16.512.11.2066 Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Федеральных целевых программ «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы» и «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы».

Секция 5

Биологическая активность. Методы тестирования

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ПОИСКА И ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Гривенников И.А.[1], Антонов С.А.[1], Арсеньева Е.Л.[1], Долотов О.В.[1], Иноземцева Л.С.[1], Кобылянский А.Г.[1], Лагарькова М.А.[2], Лебедева О.С.[1], Мануилова Е.С.[1], Новосадова Е.В.[1]

[1]Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2
[2]Учреждение РАН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

E-mail: igorag@img.ras.ru

В результате проведенных исследований создана перспективная тест-система, основанная на использовании первичных культур нервных и глиальных клеток из мозга млекопитающих. Данная тест-система была использована для поиска соединений, обладающих нейропротекторной активности. Отличительной особенностью разработанной тест-системы являлась возможность оценивать синтезированные соединения не только по их влиянию на пролиферативную активность глиальных клеток и жизнеспособность нейронов различных популяций, но и по их способности стимулировать экспрессию ряда генов, кодирующих нейротрофические факторы, необходимых для роста, дифференцировки и нормального функционирования клеток нервной системы. Другой перспективной моделью, разрабатываемой в настоящее время, являются линии индуцированных плюрипотентных стволовых (ИПС) клеток, полученные как от нормальных людей, так и от пациентов страдающих различными нейродегенеративными заболеваниями. Такие клетки пригодны для использования в системах скрининга потенциальных лекарственных препаратов с нейропротекторной активностью, а также для изучения молекулярных и клеточных основ тяжелых болезней человека. В результате ряда экспериментов из фибробластов кожи больных, страдающих наследственными формами болезни Паркинсона и болезни Хантингтона, получены и охарактеризованы несколько линий ИПС клеток. Показано, что эти клетки способны к дифференцировке в клетки нейроглиального ряда под действием ряда специфических факторов. Такой подход позволяет индивидуализировать как процесс подбора соответствующих лекарственных препаратов, так и исследования молекулярных основ различных тяжелых патологий человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (ГК № 16.512.11.2103) и Российского фонда фундаментальных исследований (№ 11-04-01337-а).

МАТРИКИНЫ И ДРУГИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ПЕПТИДЫ, ОБРАЗУЮЩИЕСЯ ИЗ БЕЛКОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

Шрам С.И., Мясоедов Н.Ф.

Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН,
123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2

E-mail: shram@img.ras.ru

Белки внеклеточного матрикса (ВКМ) непосредственно вовлечены в формирование соединительной ткани; они также осуществляют механическую поддержку и регуляцию активности клеток через взаимодействие с рецепторами клеточной адгезии. Кроме того, было обнаружено, что образующиеся из белков ВКМ под действием специфических протеаз небольшие пептиды, так называемые *матрикины,* участвуют в регуляции процессов пролиферации, роста, миграции и апоптоза клеток. Ряд биологически активных пептидов образуется из белков ВКМ в процессе пищеварения, и затем всасывается в кровь. Доклад посвящен обсуждению вопросов, связанных с образованием, метаболизмом и биологической активностью пептидов из ВКМ, а также с изучением фармакологических свойств их синтетических аналогов.

В докладе будут представлены результаты исследования действия коротких пептидов, состоящих преимущественно из остатков Gly, Pro и Hyp (*глипролинов*), на процессы нейродегенерации в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Показано, что пептид *H*-Pro-Gly-Pro-*OH* и целый ряд его аналогов способны увеличивать выживаемость нейрональных клеток в культуре при действии цитотоксических агентов. При этом установлена строгая зависимость цитопротективной активности от *C*-концевой последовательности в молекуле глипролинов. Защитное действие этих пептидов также продемонстрировано в экспериментах на моделях нейродегенерации *in vivo*. Были выяснены основные пути метаболизма глипролинов в организме и выявлены ферменты, которые могут осуществлять их деградацию. Наконец будет обсужден вопрос о перспективности разработки на основе пептидов из ВКМ и их синтетических аналогов новых лекарственных препаратов.

Работа выполнена при частичной поддержке проектов РФФИ № 08-04-01760-а и № 09-04-13813-офи_ц.

ФОФСОЛИПАЗЫ ИЗ ЯДА ЗМЕЙ СПОСОБНЫ БЛОКИРОВАТЬ НИКОТИНОВЫЕ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРЫ

Вульфиус Е.А.[1], Горбачева Е.В.[1], Старков В.Г.[2], Осипов А.В.[2], Никитин И.Г.[2], Кашеверов И.Е.[2], Андреева Т.В.[2], Цетлин В.И.[2], Уткин Ю.Н.[2]

[1]Учреждение РАН Институт биофизики клетки РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Институтская ул., 3
[2]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

E-mail: vulfius@gmail.com

Яды змей являются богатым источником высокоактивных соединений полипептидной природы, направленных на поражение жертвы. Среди них особого внимания заслуживают токсины, взаимодействующие с никотиновыми холинорецепторами (нХР) и фосфолипазы (PLA2), нарушающие процесс выделения медиатора из нервного окончания.

В ходе поиска в ядах змей семейства *Viperidae* полипептидов, способных блокировать нХР мы показали, что цельные яды 6 видов, некоторые фракции ядов, а также полипептиды, выделенные из ядов с помощью различных методов жидкостной хроматографии, подавляют ток, вызванный ацетилхолином (АХ) в идентифицированных нейронах прудовика *Lymnaea stagnalis*. В частности, из высокомолекулярной фракции яда африканской шумящей гадюки *Bitis arietans* нами был выделен новый индивидуальный белок битанарин, который блокировал ответ нейронов на АХ с IC_{50} 11,4 мкМ. Битанарин ингибировал также связывание ^{125I}-α-бунгаротоксина с нХР мышечного типа в мембранах электрического органа *Torpedo californica*, с α7 нХР человека, экспрессированными в клетках линии GH4C1, и с АХ-связывающим белком (IC_{50} соответственно 4,3, 20 и 10,6 мкМ). Анализ N-концевой аминокислотной последовательности битанарина и некоторых триптических фрагментов выявил его большое сходство с PLA2 других змей. Фосфолипазная активность битанарина – 1,95 ммоль/мин/мкмоль, оказалась сопоставимой с активностью PLA_2 из яда других змей. PLA2 из яда *Vipera renardi, Naja kaouthia* и *Bungarus fasciatus* также уменьшали ответ нейронов на АХ (IC_{50} около 50 мкМ). Полученные результаты позволяют предположить наличие в молекуле PLA2 структурных элементов, имеющих сродство к нХР.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 09-04-01061, 10-04-00737 и 10-04-00708), Министерства образования и науки Российской Федерации (контракт № 02.740.11.0865) и программы FP7 Европейского Сообщества (грант № 202088).

ПЕРИНАТАЛЬНОЕ «ПРОГРАММИРОВАНИЕ» ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПЕПТИДАМИ ГИПОТАЛАМУСА

Захарова Л.А., Мельникова В.И.

Учреждение РАН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119991 Москва, ул. Вавилова, 26

E-mail: zakharova-l@mail.ru

Согласно современным представлениям, функции пептидов и гормонов гипоталамо-гипофизарной системы различны на разных этапах онтогенеза. В перинатальном онтогенезе они контролируют процессы роста и дифференцировки тканей плода и осуществляют не только регуляторные, но и морфогенетические функции. В постнатальный период они участвуют, в основном, в поддержании гомеостаза иммунной системы в ответ на изменения окружающей среды. Важной сигнальной молекулой, программирующей развитие и функционирование нейроэндокринной и иммунной систем, является декапептид гонадотропин-рилизинг гормон (ГРГ), который первоначально рассматривали в качестве гормона, контролирующего репродуктивную функцию организма. В результате блокады синтеза ГРГ или его рецепторов в ранний период онтогенеза подавляется морфофункциональное развитие тимуса. Наблюдается снижение массы тимуса, количества тимоцитов и эпителиальных клеток, и как следствие, снижение лимфоцитов в селезенке и периферической крови, подавление клеточного и гуморального иммунитета. Эти нарушения сохраняются длительное время. Наряду с гипоталамусом, синтез ГРГ обнаружен в тимусе плодов, уровень которого снижается вдвое после внутриутробного удаления гипоталамуса. Дефицит нанопептида аргинин-вазопрессина (АВП) в раннем онтогенезе также приводит к необратимым изменениям в иммунной и эндокринной системах. В качестве экспериментальной модели для изучения функциональных свойств АВП часто используют крыс *Brattleboro* с наследственным дефектом синтеза гипоталамического АВП. Они характеризуются выраженным несахарным диабетом с высоким уровнем потребления и выведения воды. Отсутствие циркулирующего АВП приводит к функциональным отклонениям в иммунной системе половозрелых особей: ранней инволюции тимуса и селезенки, подавлению активности макрофагов, клеточного и гуморального иммунитета, усилению противоопухолевого иммунитета. Длительное компенсаторное введение АВП половозрелым крысам нормализует у них водно-солевой баланс, но не влияет на иммунитет и функцию надпочечников. Таким образом, изменение содержания гипоталамических пептидов ГРГ и АВП вызывает нарушения в центральных органах иммунной системы, что в последствии приводит к нарушениям во вторичных лимфоидных органах.

КАРДИОПРОТЕКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ЭНКЕФАЛИНОВ

Мурашев А.Н.[1,2,3], Шайхутдинова Э.Р.[1,2], Боброва И.А.[4], Хохлова О.Н.[1], Слащева Г.А.[1], Берчатова А.А.[1,3], Крапф Г.[4], Биссессар Э.[4]

[1]Филиал Учреждения РАН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290 Пущино, Московская обл., пр. Науки, 6
[2]Пущинский государственный университет, 142290 Пущино, Московская обл., пр. Науки, 3
[3]Филиал МГУ им. М.В. Ломоносова, 142290 Пущино, Московская обл., мкр-н «В», 20А
[4]Eribis Pharmaceuticals AB, Uppsala, Sweden

E-mail shai78@rambler.ru

Известно, что ишемическое прекондиционирование уменьшает размеры инфаркта миокарда и сопровождается увеличением концентрации энкефалинов в плазме крови, что указывает на их возможное участие в реализации кардиопротективного действия ишемического прекондиционирования. Время полужизни природных энкефалинов в плазме крови не превышает нескольких минут, поэтому целью данного исследования было изучение кардиопротективных эффектов синтетических аналогов энкефалинов. И.В.Бобровой предложены аналоги энкефалинов, имеющие тетрапептидную структуру (Tyr–A–Gly–Phe) [Pat. 12310193 PCT/SE2007/000731], пять пептидов были синтезированы, они получили кодовые названия как EP91, EP92, EP93, EP94 и EP95. У крыс CD при искусственной вентиляции легких моделировали острый инфаркт миокарда окклюзией левой коронарной артерии в течение 25 минут с последующей реперфузией в течение 120 минут. Для оценки кардиопротективного эффекта пептиды вводили внутривенно за 5 минут до окклюзии. Контролем служили животные, которые получали физиологический раствор. Для определения зоны риска по окончании реперфузии вновь вызывали окклюзию и вводили метиленовую синьку для определения зоны риска. Зону инфаркта миокарда выявляли окрашиванием срезов сердца толщиной 2 мм 2,3,5-трифенилтетразолием хлоридом. Измеряли площадь зоны инфаркта, площадь зоны риска с помощью программы *Image TOOL* и рассчитывали отношение, выраженное в процентах, зоны инфаркта к зоне риска. У контрольных животных отношение зоны инфаркта к зоне риска составило 42,9±2,7%. Из пяти изученных пептидов, только EP91 и EP94 уменьшали отношение зоны инфаркта к зоне риска до 27,5±2,4% и 26,0±3,5% по сравнению с контрольными животными с наибольшим эффектом в дозах 5 и 1 мкг/кг, соответственно. Таким образом, синтетические аналоги энкефалинов можно рассматривать как перспективные молекулы для создания новых кардиопротективных препаратов.

К ПРОБЛЕМЕ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ

Толпыго С.М., Певцова Е.И., Котов А.В.

Учреждение РАМН НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8

E-mail: lab_motiv@mail.ru

При анализе биологической активности свободных регуляторных пептидов (РП) и их искусственно синтезированных комплексов с белками-носителями (на примере вазоактивных и опиоидных пептидов) обнаружено, что белково-пептидные комплексы (БПК) по сравнению с нативными РП характеризуются расширением и интерференцией спектров активности, пролонгированными и интенсивными физиологическими эффектами, селективно влияют на врожденное и приобретенное поведение. Ранее нами выдвинута гипотеза о том, что эндогенные БПК являются особым классом сигнальных молекул, опосредующих полифункциональность свободных РП и их дифференцированное включение в интегративные регуляторные процессы в ходе онтогенетического развития организма.

При изучении ангиотензинов – вазоактивных РП, проявляющих отчетливую плейотропность физиологического действия в регуляции центральных и периферических функций (водно-солевой обмен, гемодинамика, эмоциональный стресс, воспаление, гуморальный и клеточный иммунитет и др.) показано, что физиологическая активность БПК отчетливо модулируется функционально различными белками, входящими в их состав (транспортный белок плазмы крови – бычий сывороточный альбумин – БСА и Са+2-связывающий нейроспецифический белок S100b). Продемонстрированы эффекты введения свободных и связанных с белками ангиотензинов – I – IV (A-I, A-II, A-III и A-IV) на врожденное и приобретенное питьевое поведение, а также показатели гемодинамики у крыс. Выявлено, что БПК A-II и A-IV с БСА участвуют в фиксации, стабилизации и извлечении памятных следов приобретенных навыков удовлетворения жажды, тогда как БПК A-I и A-III с БСА вовлечены в обеспечение преимущественно врожденного питьевого поведения. Периферические механизмы питьевого поведения включаются за счет БПК ангиотензинов с S100b, обеспечивая функции гемодинамики и поддержания водно-солевого баланса.

Представляется, что комплексы РП с функционально различными белками обеспечивают дивергенцию путей сигнальной трансдукции, вызывая адекватные клеточные ответы с их участием в рамках целого организма.

Работа поддержана РГНФ (проект № 11-06-00847а).

БЕЛОК HLDF И АУТОАНТИТЕЛА К НЕМУ – БИОМАРКЕРЫ СОПРЯЖЕННЫХ ПОРАЖЕНИЙ НЕРВНОЙ, СОСУДИСТОЙ И ИММУННОЙ СИСТЕМ У ЧЕЛОВЕКА

Грудень М.А.[1], Костанян И.А.[2]

[1]*Учреждение РАМН НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН, 125009 Москва, ул. Моховая, 11, стр.4*
[2]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

E-mail: mgruden@mail.ru

Согласно современным представлениям в механизмах развития гипертонической болезни и ее церебральных осложнений важную роль играют нарушения процессов клеточного гомеостаза, микроциркуляции, трофического обеспечения, а также развитие аутоиммунных реакций с направленностью к факторам-регуляторам развития и гибели клеток. Одним их таких факторов может служить выделенный из клеток HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека фактор дифференцировки HLDF (Human Leukemia Differentiation Factor), обнаруженный недавно в мозгу и крови животных и человека и имеющий в своей структуре пептидные фрагменты, обладающие гемодинамическими и нейротропными свойствами. Проведенные комплексные клинико-иммунобиохимические исследования, в частности, по изучению концентрации HLDF, уровня идиотипических и антиидиотипических антител к HLDF в сыворотке крови пациентов возрастной нормы (n=30), гипертонической болезнью (n=35), гипертоническим кризом (n=38), ишемическим инсультом (n=45), энцефалопатией (n=45), начальными нарушениями мозгового кровообращения (n=25) в динамике в критические периоды развития заболеваний выявили корреляционные взаимосвязи с функциональным состоянием нервной, сосудистой, а также иммунной систем при изучаемых патологиях и в нормальных условиях. Обнаружена также взаимосвязь изменений содержания фактора HLDF и системы аутоантител к HLDF с развитием когнитивного дефицита при острых и хронических цереброваскулярных осложнениях гипертонической болезни. Показана прогностическая значимость выявленных закономерностей в специфических концентрациях HLDF и соотношений в уровне аутоантител к нему для ранней диагностики поражений мозга гипертонического генеза.

HLDF-6 – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПЕПТИДНЫЙ ПРЕПАРАТ С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ, НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫМ И НООТРОПНЫМ ДЕЙСТВИЕМ

Богачук А.П., Липкин В.М., Сурина Е.А., Костанян И.А.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: apbog@mx.ibch.ru

В России, где число больных с впервые установленным диагнозом злокачественных новообразований увеличивается ежегодно на 2–3% и к настоящему моменту достигает 550–600 тыс. человек за год, остро стоит вопрос о разработке отечественных противоопухолевых препаратов. Поскольку патогенез ряда злокачественных новообразований связан с нарушениями процесса дифференцировки, одним из многообещающих подходов к лечению является создание противоопухолевых препаратов на основе факторов клеточной дифференцировки. Достоинством данного подхода является то, что эти вещества способны вызывать регрессию опухоли через активацию естественного механизма ингибирования роста клеток в результате активации их дифференцировки.

Лейкоцитарный фактор дифференцировки – HLDF был впервые открыт и выделен в лаборатории белков гормональной регуляции ИБХ РАН из культуральной среды клеток линии HL-60, обработанных ретиноевой кислотой. Белок вызывает дифференцировку клеток исходной линии по гранулоцитарному пути, а также играет важную роль в индукции апоптоза в клетках HL-60. В белке присутствует два активных центра. В состав первого центра входит шестичленный пептид HLDF-6, который отвечает за дифференцирующую и протекторную активности фактора. Пептид HLDF-6 полностью воспроизводит дифференцирующую активность полноразмерного фактора дифференцировки и обладает широким спектром ноотропной и нейропротективной активностей.

Нами получены прямые свидетельства нейропротекторного эффекта HLDF-6 в экспериментах на первичной культуре нейрональных клеток гиппокампа, мозжечка, а также иммунокомпетентных клеток. В нашей лаборатории ведется активное исследование препарата на основе пептида, действие которого приводит к регрессии опухоли через активацию естественного механизма ингибирования роста клеток в результате активации их дифференцировки, и при этом проявляет нейропротекторные свойства.

Перспективе применения пептида в качестве противоопухолевого препарата способствуют его высокая селективность действия, минимальные побочные эффекты, высокая стабильность per os, растворимость в водных средах, низкая токсичность, отсутствие иммуногенности. Кроме того, пептид потенцирует действие химиотерапевтических средств, при этом поддерживает качество жизни и снижает динамику опухолевой прогрессии.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и ГК№ 16.512.11.2044 Министерства образования и науки Российской Федерации.

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ ГАПОНИНА С ПОМОЩЬЮ ПАНЕЛИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ С ИЗМЕНЁННЫМИ УРОВНЯМИ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА

Ракитина Т.В.[1,2], Смирнова Е.В.[1], Воробьёва Е.Е.[1], Иванова Д.Л.[1], Богатова О.В.[1], Поздеев В.И.[1], Юдкина О.В.[2], Костанян И.А.[1], Липкин В.М.[1]

[1]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
[2]НИЦ «Курчатовский институт», 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 1

E-mail: taniarakitina@yahoo.com

Белки, биологическая роль которых ещё не до конца изучена, составляют не менее 30–40% протеома человека. Именно к таким белкам относится гапонин (haponin, **H**LDF-**a**like **p**rotein), первоначально выделенный из клеток линии промиелоцитарного лейкоза человека HL-60. С целью функционального изучения этого белка нами была разработана методика наработки 6хГис-гапонина в бакуловирусной и бактериальной системах экспрессии. Очищенный рекомбинантный гапонин был использован для получения поликлональных антител и поиска его потенциальных клеточных партнёров. В результате проведённых исследований было установлено, что одним из партнёров гапонина является глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (GAPDH) – фермент, который помимо своей основной гликолитической функции обладает широким спектром дополнительных активностей, включая участие в клеточном ответе на окислительный стресс.

Для дальнейшего изучения биологической роли гапонина, была создана панель генетически-модифицированных клеточных линий с измененными уровнями экспрессии гапонина, включая линии, сверхэкспрессирующие гапонин дикого типа и химерный GFP-гапонин, а также линии, уровень экспрессии гапонина в которых был снижен путём введения киРНК. Основные ростовые характеристики данных линий были изучены в норме и в условиях окислительного стресса, индуцированного пероксидом водорода. В результате было установлена, что чувствительность клеток к окислительному стрессу зависит от уровня экспрессии гапонина, а именно, увеличивается при сверхэкспрессии гапонина дикого типа и снижается при введении в клетки киРНК к гапонину.

Работа выполняется при поддержке программы Президиума Российской академии наук «Молекулярная и клеточная биология».

ПЕПТИДЫ ИММУНОГЛОБУЛИНОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ: МИФЫ И РЕАЛЬНОСТЬ

Наволоцкая Е.В.[1], Костанян И.А.[2]

[1]*Филиал Учреждения РАН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290 Пущино, Московская обл., пр. Науки, 6*
[2]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

E-mail: navolotskaya@fibkh.serpukhov.su

В 1970 г. Найяр и Нишиока обнаружили, что при ферментативном расщеплении IgG образуется пептид, способный стимулировать фагоцитарную функцию макрофагов. Они назвали пептид тафтсином, определили структуру – TKPR, а спустя два года осуществили его химический синтез. Оказалось, что эндогенный и синтетичесикий тафтсин в одинаковой степени стимулируют такие функции полиморфонуклеарных лейкоцитов, как миграция, фагоцитоз бактерий и латекса, противоопухолевая активность. На основании этих результатов была выдвинута идея о том, что функциональные белки могут содержать потенциально биологически активные аминокислотные последовательности. Открытие Брантлом и соавт. в середине 1980-х годов опиоидподобных пептидов, образующихся в результате ферментативного гидролиза β-казеина и гемоглобина подтвердило эту гипотезу. В настоящее время биологически активные пептиды обнаружены в IgG: тафцин (Najar and Nishioka, 1970) и p23 (Morgan and Weigle, 1980); гемоглобине: геморфины и киоторфины (Ivanov et al., 1997; Zhao et al., 1997); казеине: казоморфины (Meizel, 1997; Teschemacher et al., 1997); альбумине: кинетензин (Carraway, 1984) и др. Первоначально ставилась под сомнение образования таких пептидов *in vivo*, однако последующие исследования подтвердили наличие в организме млекопитающих эндогенного тафсина и геморфинов. В 1990 г. Чипенс и соавт. предложили гипотезу о новой системе биорегуляции, в которой ключевую роль играют пептиды, образующиеся в результате ограниченного протеолиза белков-предшественников (иммуноглобулинов, цитокинов и др.). Такие биологически активные соединения отнесли к новому классу клеточных гормонов – тетинов. Их функцией является передача информации на клеточном уровне. В докладе проанализированы литературные данные (тафтсин, ригин, p23) и результаты собственных исследований (иммунорфин, иммунокортин) с целью получить ответы на следующие вопросы: 1). Где и под действием каких ферментов происходит процессинг IgG в организме? 2). Если этот процесс запрограммирован, то каков биологический смысл одновременного освобождения и действия нескольких пептидов?

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ БЕЛКОВ ЗРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ БЛИЗОРУКОСТИ (МИОПИИ)

Липкин В.М.[1], Богачук А.П.[1], Минкевич Н.И.[1], Иомдина Е.Н.[2], Курылева И.М.[3], Бабиченко И.И.[4], Костанян И.А.[1]

[1]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
[2]Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва
[3]Московский государственный медико-стоматологический университет, Москва
[4]ГОУ ВПО Российский университет дружбы народов, Москва

E-mail: vmlipkin@mx.ibch.ru

Миопия или близорукость одно из самых распространенных заболеваний глаз. При миопии происходят изменения биомеханических и биохимических свойств склеры глаз. Нарушение метаболизма склеральной ткани взаимосвязано с патологическими изменениями в пигментном эпителии сетчатки. Индикатором этих процессов является PEDF (Pigment Epithelium-Derived Factor – фактор, выделенный из пигментного эпителия). Проведенные нами исследования показали, что в тканях близоруких глаз PEDF выявляется как внутри клеток, так и в виде экстраклеточного ореола. Причем при миопии секретируемый PEDF устойчив, в то время как в норме подвергается протеолизу по серпиновой петле с отщеплением С-концевого фрагмента. Было также показано, что вокруг фибробластов склеры в случае миопии наблюдается образование фибрилл. При этом локализация фибрилл и секретируемого PEDF совпадает. Нами была осуществлена экспрессия в бакуловирусной системе как полноразмерного PEDF, так и PEDF с усеченным С-концевым фрагментом и было установлено, что полноразмерный PEDF способен образовывать амилоидные фибриллы, в то время как PEDF с усеченным С-концом такой способностью не обладает. Наиболее доступным биологическим объектом для биохимических исследований, характеризующих локальные изменения обмена веществ в тканях глаза, является слезная жидкость (СЖ). Нами изучено содержание в СЖ белков, отражающих её секреторную и метаболическую активность (лизоцим, лактоферрин). Установлено, что у подростков с прогрессирующей миопией отношение концентрации лактоферрина к концентрации лизоцима в СЖ достоверно меньше, чем у подростков с эмметропией. Определение данного показателя, вероятно, может быть использовано в качестве диагностического критерия в клинике прогрессирующей близорукости.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и ГК № 16.512.11.2044 Министерства образования и науки Российской Федерации.

Секция 6

Взаимосвязь структура – функция. Механизмы действия

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ НООТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКИХ МЕЛАНОКОРТИНОВ ОТ СТРУКТУРЫ

Левицкая Н.Г.[1], Глазова Н.Ю.[1], Атанов М.С.[2], Манченко Д.М.[2], Андреева Л.А.[1], Каменский А.А.[2], Мясоедов Н.Ф.[1]

[1]Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН,
123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, д.2
[2]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Ленинские горы, д. 1/12

E-mail: nglevitskaya@gmail.com

Меланокортины (АКТГ/МСГ-подобные пептиды) являются одним из активно исследуемых классов эндогенных пептидных регуляторов. Предполагается, что последовательность АКТГ включает в себя несколько сайтов, которые могут активировать различные рецепторы, вызывая при этом широкий спектр физиологических эффектов. Проведенные ранее исследования позволяют предположить, что присоединение обогащенной пролином последовательности PGP к различным фрагментам АКТГ приведет к увеличению выраженности их эффектов.

Осуществлен синтез пептидов, структура которых включает в себя природный фрагмент АКТГ и трипептид PGP – АКТГ(6-9)PGP, АКТГ(7-10)PGP и АКТГ(4-10)PGP. Исследовалось влияние этих пептидов на способность к обучению и эмоциональное состояние белых крыс. В качестве вещества сравнения использовали ранее исследованный препарат семакс – АКТГ(4-7)PGP. Пептиды вводили интраназально в дозе 62 мкмоль в объеме 0.1 мл/кг за 15 мин или за 20 часов до тестирования.

Показано, что все исследованные пептиды обладают ноотропной активностью. При введении за 15 мин до обучения эффекты пептида АКТГ(6-9)PGP сопоставимы с эффектами семакса, эффекты АКТГ(7-10)PGP менее выражены, декапептид АКТГ(4-10)PGP улучшает обучение животных более эффективно, чем семакс. При введении за 20 час до тестирования АКТГ(6-9)PGP и АКТГ(7-10)PGP, в отличие от семакса, не влияли на обучение животных. В условиях, провоцирующих реакцию тревоги и страха, все исследованные пептиды оказывают анксиолитическое действие.

Можно заключить, что новые аналоги фрагментов АКТГ обладают ноотропной активностью. При этом только один из исследованных препаратов – декапептид АКТГ(4-10)PGP более эффективно улучшает обучение животных, чем семакс.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (ГК № 14.740.11.0179 и ГК № П1057), Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» и РФФИ (гранты № 09-04-12202 офи-м и № 11-04-01329).

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТИВНЫХ ВЛИЯНИЙ ПЕПТИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ И МЕЖПОЛУШАРНУЮ АСИММЕТРИЮ МОЗГА ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ И ОРГАНИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Соллертинская Т.Н.[1], Шорохов М.В.[1], Мясоедов Н.Ф.[2]

[1]Учреждение РАН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194233 С.-Петербург, просп. М. Тореза, 44
[2]Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2

E-mail: tns-peptidus@mail.ru

Нейрохимические механизмы компенсации нарушений высших нервных функций (ВНФ) при функциональной и органической патологии изучены недостаточно; в эволюционном плане отсутствуют. Нейропептидная регуляция функциональной асимметрии мозга не исследована. Цель работы – сравнительное изучение церебропротективных влияний пептидных препаратов: Семакса (Сем) и Селанка (Сел) в когнитивных процессах и межполушарной асимметрии мозга при функциональной (стресс) и органической (деструкция гиппокампа – Hipp и амигдалы – АМ) патологии в восходящем ряду млекопитающих. Сем и Сел вводили в дозах 0,1–5 мкг/кг и 0,25–100 мкг/кг соответственно. У ежей компенсаторные эффекты препаратов при функциональной патологии однонаправленны, неспециализированны, неотчётливы; при органической они значительны и длительны. Сем и Сел различно меняют межполушарные взаимоотношения; эффекты кратковременны (1–2 дня). У ежей «правшей» Сем приводит к чередованию реакций выбора; Сел – изменяет профиль поведения на левую сторону. На фоне деструкции Hipp Сем восстановливает нарушенные межполушарные взаимоотношения. У крыс возрастает роль препаратов в восстановлении ВНФ и проявляется отчётливая тенденция к дифференциации их действия при функциональной патологии. На фоне разрушения Hipp Сем и Сел осуществляют выраженное компенсаторное влияние на ВНФ. Эффекты Сем и Сел на межполушарную асимметрию мозга дифференцированы. Сел приводит к длительному изменению профиля поведения и «рукости» у крыс «амбидектров». На фоне деструкции Hipp эффекты Сел на межполушарные отношения более выражены и длительны по сравнению с АМ. Сем изменяет профиль поведения у крыс «правшей», особенно на начальных этапах после разрушения Hipp и АМ. У обезьян действие препаратов на ВНФ при функциональной патологии возрастает и преобретает специфический характер. Роль Сем и Сел в межполушарной асимметрии мозга носит дозозависимый характер, различный по выраженности ЭЭГ показателей новой коры.

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Дудков А.В., Трофимов А.В.

Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, 197110 С.-Петербург, пр. Динамо, 3

E-mail: miayy@yandex.ru

Разработанная в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии концепция пептидной регуляции старения свидетельствует, что короткие пептиды способны изменять уровень экспрессии более 150 генов, 15 из которых относится к категории генов клеточного деления и 17 – к генам клеточного цикла. В связи с этим изучение воздействия синтетических пептидов на пролиферативную активность мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека может открыть новые подходы к использованию имеющегося в организме ресурса стволовых клеток в лечении заболеваний, связанных со старением. Целью исследования явилась оценка пролиферативной активности культуры МСК человека при введении различных коротких пептидов.

В исследовании использовали тетрапептид H-Ala-Glu-Asp-Gly-OH, трипептид H-Lys-Glu-Asp-OH и дипептид H-Lys-Glu-OH. МСК культивировали в среде, содержащей α-МЕМ (Биолот, Россия) с добавлением фетальной телячьей сыворотки (Gibco BRL, США), 2 мМ L-глутамина (Gibco BRL, США) и гентамицина (100 ед/мл) при 37°С и 5% CO_2. В исследовании использовали 13 образцов культур – 3 контрольных и 10 опытных (5 пассаж, 20 000 клеток в образце), в которые добавляли один из пептидов (20 нг/мл). В контрольных образцах культуры вместо пептида добавляли фосфатно-солевой буфер. На 3 и 5 сутки культивирования клетки подсчитывали в камере Горяева.

В контрольных образцах культур МСК на 3 и 5 сутки количество клеток составило соответственно 50000±5600 и 65000±6200 клеток. Под действием трипептида на 3 и 5 сутки количество клеток в культуре достоверно возрастало в 1.7 и 2 раза по сравнению с контролем и составило 85000±9900 и 125000±11500 клеток. Под влиянием пептидов дипептида и тетрапептида на 3 сутки количество МСК имело тенденцию к снижению и составило соответственно 50000±3200 и 40000±34000 клеток. На 5 сутки после введения дипептида и тетрапептида в культуру МСК количество клеток достоверно снижалось соответственно в 1.9 и 1.6 раза и составило 35000±3000 и 40000±2900 клеток. В зависимости от структуры пептида наблюдалось разнонаправленное действие пептидов на пролиферативную способность МСК. Трипептид стимулировал рост МСК, тогда как ди- и тетрапептиды оказывали ингибирующее действие на пролиферацию МСК.

СВОЙСТВА И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ИММУНОРФИНА – АГОНИСТА НЕОПИОИДНОГО РЕЦЕПТОРА БЕТА-ЭНДОРФИНА

Ковалицкая Ю.А.[1], Чернов А.С.[2], Катаев А.А.[3], Садовников В.Б.[1], Наволоцкая Е.В.[1]

[1]Филиал Учреждения РАН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290 Пущино, Московская обл., пр-т Науки, 6
[2]Учреждение РАН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская обл.
[3]Учреждение РАН Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская обл.

E-mail: kovalitskaya@inbox.ru

В лаборатории пептидных биорегуляторов ФИБХ разработана уникальная модель для изучения неопиоидного (нечувствительного к блокатору опиоидных рецепторов налоксону) рецептора β-эндорфина. Нами синтезирован пептид иммунорфин, селективный агонист неопиоидного рецептора β-эндорфина, представляющий собой фрагмент 364-373 тяжелой цепи IgG, подобный центральной части молекулы β-эндорфина. β-Эндорфин обеспечивает взаимосвязь нервной, иммунной и эндокринной систем, выполняя ряд важных функций в организме, взаимодействуя с этим типом рецепторов. Однако о механизмах действия данного типа рецепторов до настоящего времени ничего не известно. Используя иммунорфин в качестве инструмента, мы изучили биохимические и электрофизиологические составляющие механизмов действия неопиоидного рецептора β-эндорфина.

Используя метод флуоресцентной микроскопии, мы установили, что иммунорфин (6-10) (1 мкМ) инициирует медленный (35–40 мин) выход ионов $Ca2^{+}$ в цитоплазму из внутриклеточных депо у 2- и 8-клеточных эмбрионов мыши. Используя блокатор активности аденилатциклазы ($SQ22_{,536}$, Sigma), мы установили, что стимулирующее действие пептида на ранние эмбрионы осуществляется при активации аденилатциклазной сигнальной системы.

Методом фиксации напряжения мы исследовали изменение свойств ионных каналов плазмалеммы клеток *Chara corallina* в присутствии 1 нМ иммунорфина. Было установлено, что в ответ на деполяризацию мембраны изменялась амплитуда $Ca2^{+}$-компоненты тока и значительное увеличение $Ca2^{+}$-зависимого Cl^{-}тока. Амплитуда Cl^{-}тока возрастала в два раза, по сравнению с контрольными токами. Мы предполагаем, что увеличение концентрации ионов кальция влияет на состояние $Ca2^{+}$-зависимых Cl^{-}каналов. Это приводит к стабилизации осмотического давления клетки, кроме того, в концентрации 1мкМ иммунорфин увеличивает сопротивляемость мембраны клеток *Chara corallina*.

Таким образом, с помощью иммунорфина впервые показано, что в механизмах действия неопиоидного рецептора β-эндорфина задействованы ионы $Ca2^{+}$, $Ca2^{+}$-зависимые Cl^{-}каналы, аденилатциклазная сигнальная система.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА РАЗВИТИЕ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ НА МОДЕЛИ *DANIO RERIO*

Рафиева Л.М., Гасанов Е.В., Костров С.В.

Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Ак.Курчатова, 2

E-mail: rafievalm@gmail.com

Нейротрофины (НТФ) – семейство факторов роста, определяющих развитие и функционирование нервной системы (НС). Эти белки синтезируются в виде предшественников – пронейротрофинов (проНТФ), имеющих в своем составе пропептид и зрелую часть, определяющую нейротрофическую активность этих факторов роста. Биологические функции пропептидов, а также проНТФ на сегодня изучены недостаточно. Существуют данные, что проНТФ способны оказывать противоположные зрелым НТФ эффекты, в т.ч. запускать механизм программируемой клеточной смерти. Большая часть исследований действия зрелых НТФ и их предшественников выполнена на моделях *in vitro* и незначительная – *ex vivo*. В связи с этим поиск удобных моделей для исследования влияния нейротрофических факторов на развитие и функционирование нервной системы *in vivo* весьма актуален. Костистая рыба *Danio rerio* является одним из наиболее перспективных биологических объектов, моделирующих развитие и функционирование НС. Среди преимуществ *D. rerio* как модели: внеутробное развитие эмбриона, его доступность для различных манипуляций и наблюдений, возможность генноинженерных модификаций. Используя *D. rerio*, мы планируем изучить действие НТФ на развитие и функционирование мозга и периферической НС *in vivo*.

Ранее нами были получены различные формы нейротрофических факторов NGF и BDNF. Исследован фолдинг этих факторов в системе *in vitro,* с использованием различных клеточных линий была проанализирована биологическая активность различных форм NGF и BDNF, в том числе пропептидов, в системе *ex vivo*. Было показано, что про-часть является внутримолекулярным шапероном для NGF, в то время как для нейротрофина BDNF, она, по-видимому, подобную роль не выполняет. Используя пропептиды обоих факторов, мы показали, что в случае NGF про-часть способна моделировать биологическую активность этого фактора роста. При этом собственной биологической активностью пропептид не обладает. Также была получена мРНК, кодирующая различные варианты BDFN, включая пропептид и предшественник. Полученная мРНК будет введена в эмбрионы *D. rerio* и, используя флуоресцентные маркерные элементы, предполагается оценить изменения в развитии популяций нервных клеток, экспрессирующих рецепторы к данным нейротрофическим факторам.

С-КОНЦЕВОЙ СЕГМЕНТ КАК ВСТРОЕННЫЙ МОДУЛЯТОР ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА НЕЙРОНАЛЬНЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ СЕНСОРОВ

Зерний Е.Ю.[1], Колпакова Т.В.[1], Пермяков С.Е.[2], Назипова А.А.[2], Зинченко Д.В.[3], Комолов К.Е.[1,4], Шольтен А.[4], Григорьев И.И.[1], Пермяков Е.А.[2], Кох К.-В.[4], Филиппов П.П.[1], Сенин И.И.[1]

[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.40
[2]Учреждение РАН Институт биологического приборостроения РАН, Пущино, Московская обл.
[3]Филиал Учреждения РАН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Московская обл.
[4]Университет Ольденбурга имени Карла фон Осецкого, Ольденбург, Германия

E-mail: kolpakovatatiana@mail.ru

Нейрональные $Ca2^+$-сенсоры (НКС) – семейство EF-hand содержащих Ca^{2+}-связывающих белков, способных в ответ на изменения концентрации внутриклеточного $Ca2^+$ с высокой специфичностью регулировать белки мишени, принимая участие в передаче различных сигналов. В пределах семейства НКС обладают высокой степенью структурного сходства, однако при этом проявляют различные чувствительности к $Ca2^+$, а диапазон мишеней, индивидуальных для каждого НКС, достаточно широк. Ранее нами было показано, что С-концевой сегмент, вариабельная в пределах семейства С-концевая последовательность, в случае фоторецепторного НКС рековерина отвечает за регуляцию функциональных свойств этого белка, таких как сродство к Ca^{2+}, способность связываться с мембранами, а также способность модулировать активность мишени – родопсинкиназы. В настоящей работе высказано предположение о том, что такая регуляторная функция С-концевого сегмента является универсальным свойством белков НКС. Для проверки этого предположения сконструированы два химерных белка на основе НКС рековерина и GCAP2: в каждом таком белке С-концевой сегмент заменен на аналогичную последовательность из другого НКС. Показано, что обмен последовательностями С-концевых сегментов не оказывает существенного влияния на структурные особенности и термостабильность исходных белков. Однако замена С-концевого сегмента сказывается на функциональных свойствах каждого НКС. Так, в случае рековерина замена вызывает снижение аффинности белка к Ca^{2+} с одновременным повышением его сродства к мембранам при низких концентрациях катиона, а также нарушение его способности взаимодействовать с родопсинкиназой. Однако такая замена не придает рековерину способность активировать мишень GCAP2 – гуанилатциклазу. При этом в случае GCAP2 замена С-концевого сегмента ухудшает способность белка активировать гуанилатциклазу. Таким образом, наличие в структуре НКС определенного С-концевого сегмента является необходимым, но недостаточным условием для выполнения им соответствующих функциональных свойств.

ПРИМЕНЕНИЕ ПЕПТИДНОЙ СТРАТЕГИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ И РЕГУЛЯЦИИ ГОРМОНАЛЬНЫХ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ

Шпаков А.О.

Учреждение РАН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223 С.-Петербург, пр. М. Тореза, 44

E-mail: alex_shpakov@list.ru

Пептидная стратегия – одно из наиболее динамично развивающихся направлений в современной биохимии и молекулярной эндокринологии. Она включает синтез, изучение и использование в фундаментальной биологии и медицине сравнительно коротких пептидов, которые по первичной структуре соответствуют функционально важным участкам белков, компонентов гормональных сигнальных систем. Основными точками приложения пептидной стратегии являются рецепторы серпантинного и тирозинкиназного типа, гетеротримерные G-белки, ферменты, катализирующие образование вторичных посредников. Пептиды взаимодействуют с сигнальными белками, которые сопряжены с гомологичным им белком, а также с комплементарными участками белка, производными структуры которого они являются, и влияют на их функциональную активность. Поскольку действие пептидов реализуется только в отношении гомологичных белков, их можно применять в качестве функциональных зондов для расшифровки молекулярных механизмов передачи в клетку гормональных сигналов и для селективной регуляции сигнальных каскадов, включающих эти белки. Многие пептиды, производные сигнальных белков, активны не только в условиях *in vitro*, но и *in vivo*, что позволяет рассматривать их в качестве прототипов для создания лекарственных препаратов нового поколения, обладающих направленным действием на клетки-мишени. Нами на модели гормоночувствительной аденилатциклазной сигнальной системы изучена биологическая активность широкого спектра пептидов, соответствующих участкам третьей цитоплазматической петли рецепторов серпантинного типа, которая в большинстве рецепторов ответственна за связывание и активацию гетеротримерных G-белков. Наряду с немодифицированными пептидами, исследовали их разветвленные аналоги, а также пептиды, модифицированные мембрано-активными гидрофобными радикалами. На основе анализа полученных данных предложены три наиболее вероятных молекулярных механизма действия пептидов, производных рецепторных белков.

Работа поддержана РФФИ (проект № 09-04-00746) и Программой «Фундаментальные науки – медицине» (2009–2011 гг.).

ЭФФЕКТИВНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В МОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМАХ

Некрасов А.Н., Зинченко А.А.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ГСП-7, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: alexei_nekrasov@mail.ru

В работе обсуждается вопрос об эффективности взаимодействия полипептидных цепей в различных молекулярных комплексах. Эффективность взаимодействия между полипептидными цепями обусловлена не только наличием взаимодействующих функциональных групп, но и способностью этих групп располагаться на расстояниях, оптимальных для данного конкретного взаимодействия. Возможность аминокислотных остатков, несущих взаимодействующие функциональные группы, обеспечивать такие оптимальные расстояния определяется в первую очередь влиянием на них соседних по цепи остатков. Взаимодействие остатков с ближайшими соседями в полипептидной цепи может ограничивать их способность к адаптивным конформационным перестройкам. Нами предложен критерий, позволяющий оценить способность аминокислотных остатков к адаптивным конформационным перестройкам, основанный на локальных статистических характеристиках полипептидной цепи.

Использование данного критерия позволило дать новую интерпретацию экспериментальных данных по стадийности тепловой денатурации дрожжевой алкогольдегидрогеназы, описанной в работе [1]. Проведенный анализ различных межмолекулярных белковых комплексов с известной пространственной структурой позволил объяснить механизм функционирования комплексов гидролаза-ингибитор [2], белков, формирующих «чехол» вируса φKZ, комплексов рецепторов с сигнальными белками.

Литература

1. Markossian K.A., Golub N.V., Khanova H.A., Levitsky D.I., Poliansky N.B., Muranov K.O., Kurganov B.I. *Biochimica et Biophysica Acta* (2008) 1784, 1286–1293.
2. Nekrasov A.N., Zinchenko A.A. *J. Biomol. Struct. Dyn*. (2010) 28(1), 85–96.

ОБРАТИМАЯ АГРЕГАЦИЯ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ *VIBRIO CHOLERAE* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Родина Е.В.[1], Курилова С.А.[2], Воробьева Н.Н.[1], Тарасова Е.А.[1], Назарова Т.И.[2]

[1]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы
[2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы

E-mail: rodina@belozersky.msu.ru

Агрегация белков под действием ионов тяжелых металлов представляет интерес для медицинских и биотехнологических исследований. У млекопитающих агрегация амилоидных пептидов под действием $Cu2^+$, $Zn2^+$ и $Fe2^+$ связана с развитием нейропатологий. У бактерий обратимая агрегация некоторых белков под действием $Cu2^+$ или $Cd2^+$ служит одним из способов снижения внутриклеточной концентрации этих токсичных ионов. Кроме того, образование агрегатов под действием ионов металлов используется в пищевой промышленности для зажеления белковых продуктов.

В настоящей работе исследована агрегация под действием ионов тяжелых металлов бактериального белка неорганической пирофосфатазы из *Vibrio cholerae* (V-PPазы). Это металлозависимый белок, способный связывать ионы металла в активном центре, межсубъединичном центре и на поверхности. Агрегация V-PPазы обратима и является следствием образования межбелкового мостика из иона металла. Физиологические активаторы PPазы, $Mg2^+$ или $Mn2^+$, не вызывают агрегацию. Из двузарядных катионов наиболее эффективным индуктором агрегации является $Cd2^+$. Показано, что агрегацию вызывает связывание кадмия на поверхности глобулы. Добавление $Ca2^+$, который сам по себе агрегацию PPазы *V. cholerae* не вызывает, потенцирует агрегацию под действием $Cd2^+$. Этот результат можно объяснить тем, что центр связывания, отвечающий за агрегацию, состоит из двух подцентров, в одном из которых связывается $Ca2^+$, а во втором – $Cd2^+$. С использованием второй производной УФ-спектров определены константы диссоциации центров связывания $Ca2^+$ и $Cd2^+$, которые участвуют в агрегации. Структура агрегатов была исследована методами динамического светорассеяния, скоростной седиментации и атомно-силовой микроскопии. Показано, что агрегаты в форме «лепешки» образуются из интактных гексамеров. На основании кристаллической структуры V-PPазы предложена модель образования агрегатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 09-04-00596).

РОЛЬ ЛИГАНДОВ И ВНЕШНИХ УСЛОВИЙ В ПРОЦЕССАХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ И САМООРГАНИЗАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНОГО ШАПЕРОНА GROEL *IN VITRO*

Семисотнов Г.В., Марченков В.В., Марченко Н.Ю., Котова Н.В., Кашпаров И.А., Кашпарова Н.Я., Рябова Н.А.

Учреждение РАН Институт белка РАН,
142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 4

E-mail: nina@vega.protres.ru

Молекулярный шаперон GroEL является представителем семейства белков теплового шока клеток *Escherichia coli* (Hsp 60) и состоит из 14-ти идентичных субъединиц (м.в. 57.5 кДа каждая), объединенных в 2 взаимодействующие торцами кольцевые структуры по 7 субъединиц каждая. Он участвует в процессах правильного сворачивания и олигомеризации большого количества как вновь синтезированных белков, так и белков, денатурированных в результате различных клеточных стрессов или *in vitro*. Механизмы функционирования GroEL как молекулярного шаперона и его самоорганизации самого по себе до конца не выяснены, но установлено, что в обоих этих процессах важную роль играют лиганды белка (ионы Mg^{2+}, АТФ, АДФ и белковый ко-шаперонин GroES). В настоящей работе проведены исследования роли лигандов и внешних условий (ионной силы) в процессах функционирования и самоорганизации GroEL *in vitro*. Во-первых, показано, что лиганды белка (Mg-АДФ, Mg-АТФ и GroES) с различной эффективностью ослабляют взаимодействие GroEL с денатурированными белками. Кроме того, установлено, что наряду с гидрофобными взаимодействиями в формировании комплекса GroEL с денатурированными белками большую роль играют электростатические взаимодействия. На основании полученных результатов предложена модель функционирования GroEL как молекулярного шаперона. Во-вторых, с помощью методов электрофореза в поперечном градиенте мочевины и электрофореза в неденатурирующих условиях исследованы процессы денатурации и ренатурации олигомерной и мономерной форм GroEL и влияние лигандов белка на эффективность его олигомеризации. Показано, что сворачивание мономерной формы GroEL не зависит от присутствия лигандов, а эффективность ее олигомеризации определяется природой лигандов и ионной силы раствора.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 09-04-00768-а), при поддержке Российской академии наук (программы «Молекулярная и клеточная биология»), Федерального агентства по науке и инновациям (02.740.11.0295).

ВИРУСНЫЕ ШАПЕРОНИНЫ: СТРУКТУРА, СВОЙСТВА И МЕХАНИЗМ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ

Курочкина Л.П.[1], Семенюк П.И.[2], Орлов В.Н.[2], Амарантов С.В.[3], Сыкилинда Н.Н.[1]

[1]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
[2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва
[3]Учреждение РАН Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН, Москва

E-mail: lpk@ibch.ru

Шаперонины являются одним из классов молекулярных шаперонов и помогают правильно сворачиваться как новосинтезированным полипептидным цепям, так и денатурированным под воздействием стресса белкам. Шаперонины имеются у представителей всех царств живой природы, и любые нарушения функций этих консервативных белков приводят к многочисленным болезням. Их делят на две группы: I – шаперонины бактерий, митохондрий и хлоропластов, II – шаперонины архей и эукариот. При анализе геномов родственных бактериофагов EL и RU *Pseudomonas aeruginosa* нами впервые были идентифицированы вирусные шаперонины, которые, вероятнее всего, представляют новую группу этого класса белков. Нами разработаны система экспрессии генов, кодирующих фаговые шаперонины, в клетках *E. coli*, а также метод очистки рекомбинантных белков. Показано, что размножение фагов EL и RU в бактериальных клетках сопровождается синтезом собственных шаперонинов.

Рекомбинантный шаперонин фага EL охарактеризован с помощью электронной микроскопии, седиментационного анализа, дифференциальной сканирующей калориметрии, изотермического калориметрического титрования и малоуглового рассеяния рентгеновских лучей. Установлено, что фаговый шаперонин подобно бактериальному GroEL состоит из 14 идентичных субъединиц, формирующих два уложенных стопкой гептамерных кольца с полостью внутри. Однако, в отличие от GroEL, который функционирует в паре с GroES, фаговому шаперонину не требуется кофактор. Для выполнения своих функций фаговому шаперонину, как и всем известным шаперонинам, необходима энергия гидролиза АТФ. При физиологических условиях шаперонин имеет асимметричную структуру: одно его кольцо находится в открытой конформации, а другое – в закрытой. Для понимания механизма функционирования вирусного шаперонина мы исследуем структуру его комплексов с низкомолекулярными лигандами в различных конформационных состояниях.

Работа поддержана грантом РФФИ № 11-04-00935-а.

Секция 7

Химия и биология протеолитических ферментов

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА КЛЕТОЧНОГО ПРОТЕОМА: ЭНЕРГОЗАВИСИМЫЕ ПЕПТИДГИДРОЛАЗЫ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ШАПЕРОНЫ

Ротанова Т.В.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: tatyana.rotanova@ibch.ru

Сохранность клеточного протеома во всех природных царствах обеспечивается функционированием системы контроля качества (СКК) белков, объединяющей молекулярные шапероны и энергозависимые пептидгидролазы. Компоненты СКК играют решающую роль в процессах сворачивания (фолдинга) белков, сборки-разборки белковых комплексов, предотвращения образования белковых агрегатов, а также осуществляют быструю деградацию регуляторных, аномальных и поврежденных белков.

Пептидгидролазы СКК – это комплексные бифункциональные ферменты, сформированные протеолитическими и АТР-азными составляющими, которые могут быть представлены либо индивидуальными субъединицами, либо доменами единой полипептидной цепи. Протеолитические компоненты АТР-зависимых протеиназ относятся к пептидгидролазам разных классов, а АТР-азные являются членами единого суперсемейства AAA^+-белков (**A**ТР-аз, **a**ссоциированных с различными клеточными **a**ктивностями). Уникальной характеристикой АТР-зависимых протеиназ служит процессивный характер гидролиза ими белковых субстратов (без высвобождения промежуточных высокомолекулярных продуктов), обусловленный особенностями мультимерной организации этих ферментов.

Молекулярные шапероны СКК преимущественно являются белками теплового шока (**h**eat **s**hock **p**roteins, Hsps) пяти различных семейств. Шапероны семейств Hsp100, Hsp90, Hsp70 и Hsp60 (цифры – усредненные значения Мм в кДа) обладают АТР-азной активностью, при этом только шапероны Hsp100 относятся к AAA^+-белкам. Семейство sHsps (**s**mall Hsps, Мм 12–43 кДа) включает не-АТР-азные малые белки теплового шока.

Выявлено топологическое сходство между АТР-азными составляющими Lon-протеиназ подсемейства А и шаперонами ClpB (Hsp100). Обсуждается роль компонентов СКК в поддержании функционального состояния внутриклеточных белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 11-04-01015).

ДЕСТАБИЛАЗА-ЛИЗОЦИМ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ВЗАИМОСВЯЗЬ

Завалова Л.Л.[1], Антипова Н.В.[1], Фадеева Ю.И.[2], Павлюков М.С.[1], Плетнева Н.В.[1], Плетнев В.З.[1], Баскова И.П.[2]

[1]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякинаи Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
[2]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва

E-mail: lz@ibch.ru
E-mail: Saliva1@yandex.ru

Дестабилаза-лизоцим (Дест-Лиз) секрета слюнных клеток медицинской пиявки – полифункциональный фермент, обладающий эндо-ε-(γ-Glu)-Lys-изопептидазной, лизоцимной и антимикробной функциями. Нами была установлена его полная аминокислотная последовательность и идентифицированы три гена, кодирующие изоформы фермента Действие фермента направлено на растворение стабилизированного фибрина и расщепление продукта его деградации – Д-димера в процессе тромболизиса, где реализуется изопептидазная функция Дест-Лиз. Лизоцимная функция проявляется в способности фермента разрушать клеточные стенки *M. lysodeikticus* и гидролизовать гексамер N-ацетил-глюкозамина. Нами разработан метод получения высокоочищенного рекомбинантного препарата рек. Дест-Лиз из «телец включения», образующихся в клетках *E.coli,*при экспрессии вектора pQE30, содержащего ген Дест-Лиз**,** и показано, что такой фермент обладает всеми функциями, свойственными нативному ферменту. Задачей настоящего исследования является идентификация двух активных центров фермента путем выделения группы наиболее вероятных остатков на основе стереохимического анализа структурной модели фермента. Оценка функциональной роли выбранных аминокислотных остатков проводилась точечными заменами их на аланин методом сайт-направленного мутагенеза с последующим определением мурамидазной (гликозидазной/лизоцимной) и изопептидазной активностей полученных мутированных форм рек. Дест-Лиз. Полученные результаты находятся в соответствии с гипотезой о том, что гликозидазный активный центр Дест-Лиз включает каталитические остатки Glu14 и Asp26, а изопептидазный центр фермента работает как Ser/Lys каталитическая диада, представленная каталитическими остатками Ser29 и Lys38. Таким образом, в группе лизоцимов беспозвоночных Дест-Лиз является первым бифункциональным ферментом, в котором предварительно установлено положение изопептидазного активного центра с локализацией соответствующих каталитических остатков.

ПРОБЛЕМЫ ОРГАНИЗАЦИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ПРОТЕИНАЗ ВЫСОКОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ. ВИДОВАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЭНТЕРОПЕПТИДАЗЫ

Михайлова А.Г., Румш Л.Д.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: anna.mikhailova@.ibch.ru

Высокоспецифические протеиназы, такие, как энтеропептидаза и олигопептидаза В из различных источников, представляют большой интерес как с точки зрения фундаментальных, так и прикладных исследований. Наши исследования продемонстрировали тонкую регуляциию их каталитической эффективности как с помощью дистальных участков этих белковых молекул, так и дополнительных эффекторов – ионов кальция и высоких концентраций субстратов. Так, установлено, что уникальные свойства энтеропептидазы обусловлены существованием трех субстрат-связывающих центров. Легкая цепь энтеропептидазы содержит классический трипсиноподобный первичный субстрат-связывающий центр (S1) и вторичный субстрат-связывающий центр (S2), придающий ферменту присущую ему высокую специфичность. Вторичный субстрат-связывающий центр (SII), расположенный на удаленном от каталитического центра участке 118-465 тяжелой цепи, обеспечивает высокую эффективность энтеропептидазы по отношению к ее природному субстрату – трипсиногену. Ион кальция при этом выступает в роли дополнительного эффектора.

Такая тонкая дополнительная регуляция гидролиза субстратов разного типа с помощью как ионов кальция, так и субстратного ингибирования в высокой степени характерна и для олигопептидаз В, в том числе для обнаруженного нами нового представителя этих ферментов – олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans.*

Проведен сравнительный кинетический анализ эффективности четырех вариантов энтеропептидазы: природной энтеропептидазы быка, ее рекомбинантной легкой цепи, а также полноразмерной энтеропептидазы человека и ее легкой цепи по отношению к модельным пептидным субстратам, в том числе фрагментам PAR1 и PAR4, а также к природному субстрату этого фермента – трипсиногену. Полученные нами результаты демонстрируют ярко выраженный видовой характер специфичности энтеропептидаз из разных источников.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 08-04-00886-а и № 10-04-01381-а).

МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ – ММП-1,-2,-9 И ИХ ЭНДОГЕННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЕ ШЕЙКИ МАТКИ

Соловьева Н.И.[1], Рыжакова О.С.[1], Андреева Ю.Ю.[2], Завалишина Л.Э.[2]

[1]*Учреждение РАМН НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121 Москва, ул. Погодинская, 10, корп.Б*
[2]*ФГУ Московский НИ онкологический институт им. П.А. Герцена, Росздрав, Москва*

E-mail: Nina.Solovyeva@ibmc.msk.ru

Матриксным металлопротеиназам (ММП) отводится ключевая роль в развитии процессов инвазии и метастазирования, которые являются главными проявлениями прогрессии опухоли. К таким ММП в первую очередь относятся коллагеназы, отвечающие за развитие инвазивного процесса, и желатиназы, которые считаются маркером метастатического потенциала опухолей. Цель настоящего исследования – выяснение особенностей экспрессии интерстициальной коллагеназы (ММП-1), желатиназ А и Б – ММП-2 и ММП-9, а также эндогенных регуляторов их активности: тканевых ингибиторов ММП – ТИМП-1 и ТИМП-2, активатора плазминогена урокиназного типа – уАП (активатор ММП-1 через плазмин) и индуктора экспрессии ММП – EMMPRIN, как факторов инвазии и метастазирования, в плоскоклеточных карциномах шейки матки. Исследования проводились на послеоперационных образцах карцином и образцах морфологически нормальных тканей, прилегающих к опухоли и находящихся в плоскости операционного поля. Работа проводилась с использованием четырех методов: RT-PCR, иммуногистохимии, зимографии и определения коллагенолитической активности. В большей части опухолевых образцов экспрессия ММП, уАП и EMMPRIN была повышена, а экспрессия ингибиторов ММП снижена по сравнению с нормальной тканью.

Полученные данные свидетельствуют о том, что основной вклад в деструктивный (инвазивный) и метастатический потенциал карцином шейки матки вносят увеличение экспрессии ММП-1 и ММП-9 и индуктора экспрессии ММП – EMMPRIN, а также снижение экспрессии ингибиторов – ТИМП-1 и ТИМП-2, и в меньшей степени экспрессия ММП-2 и уАП. В морфологически нормальной ткани обнаружена существенная экспрессия ММП-1, ММП-2, ММП-9 и индуктора экспрессии ММП – EMMPRIN, которые вносят свой дополнительный вклад в увеличение деструктивного потенциала опухоли. Данные важны для понимания механизма деструкции матрикса и развития процессов инвазии и метастазирования, имеют прогностическое значение и определяют мишени для разработки фармакологических средств.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 10-04-01573а.

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ И ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ ПРИ МЕТАСТАЗИРОВАНИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Кондакова И.В.[1], Клишо Е.В.[1], Спирина Л.В.[1], Какурина Г.В.[1], Малахова Е.В.[1], Савенкова О.В.[1], Шишкин Д.А.[1], Чойнзонов Е.Л.[1], Шарова Н.П.[2]

[1]*НИИ онкологии СО РАМН, Томск*
[2]*Учреждение РАН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва*

E-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru

Исследование молекулярных механизмов метастазирования является одной из приоритетных задач биохимии, в процессе решения которой возможно найти новые биомаркеры, позволяющие прогнозировать развитие метастазов и разработать новые мишени для таргетной антиметастатической терапии. Известно, что развитие злокачественных новообразований тесно связано с протеолитическими ферментами, которые могут наделять опухолевые клетки способностью к инвазии и метастазированию.

В представленной работе изучали экспрессию компонентов системы внеклеточных матриксных металлопротеиназ (ММП), их генов, активность и субъединичный состав протеасом, осуществляющих внутриклеточный селективный гидролиз белков, в опухолях, различающихся по способности к метастазированию. Иммуногистохимическое определение ММП-1,-2,-9 и их тканевых ингибиторов (ТИМП) в тканях плоскоклеточного рака головы и шеи показало значительное снижение экспрессии ингибитора ТИМП-2 в тканях метастазирующих карцином по сравнению с опухолями, не образующими лимфогенные метастазы. Кроме того, наблюдалось уменьшение экспрессии гена ТИМП-2 при увеличении распространенности опухоли на лимфатические узлы. В опухолях, образующих метастазы, было зарегистрировано возрастание тотальной химотрипсиноподобной активности протеасом и пула 26S протеасом, а также увеличение содержания иммунных субъединиц LMP7 в 2 раза по сравнению с неметастазирующими опухолями, что свидетельствует о вероятном участии протеасом в метастазировании злокачественных новообразований. Таким образом, компоненты системы ММП и протеасомы играют важную роль в патогенезе злокачественных новообразований. Значительное снижение экспрессии ТИМП-2 и его гена, повышение активности протеасом и содержания в них субъединиц LMP7 при появлении метастазов позволяет рассматривать эти показатели как возможные маркеры метастазирования и потенциальные избирательные мишени для антиметастатической терапии.

Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (ГК № П320).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИНВАЗИИ БАКТЕРИЙ, СИНТЕЗИРУЮЩИХ ГРИМЕЛИЗИН И ПРОТЕАЛИЗИН, В ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ

Хайтлина С.Ю.[1], Божокина Е.С.[1], Демидюк И.В.[2], Цаплина О.А.[1], Ефремова Т.Н.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт цитологии РАН, 194064 С.-Петербург, Тихорецкий просп., 4*
[2]*Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН,*
123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2

E-mail: skhspb@yahoo.com

Исследуя функциональные свойства открытого нами фермента, бактериальной металлопротеиназы ECP32/гримелизин (Matveyev et al., 1996; Bozhokina et al., 2008) и ее гомолога протеализина (Demidyuk et al., 2006), мы обнаружили, что продуценты протеиназы, непатогенные бактерии рода *Serratia*, способны проникать в эукариотические клетки и вызывать реорганизацию их цитоскелета (Efremova et al., 2001; Bozhokina et al., 2011). Трансформация *E.coli* плазмидной ДНК, несущей ген гримелизина или протеализина, приводит к появлению в бактериях инвазивного фенотипа. Эти результаты явились прямым экспериментальным подтверждением нашего предположения об активном участии фермента в процессе инвазии.

При инвазии бактерий-продуцентов протеализина в клетки 3T3-SV40 фермент обнаруживается как в цитоплазме инвазированных клеток, так и в культуральной среде. Кроме того, протеализин расщепляет предшественник матриксной металло протеиназы ММП-2 с образованием белка с М.м. 66 кДа, что указывает на возможность активации ММП-2 протеализином. Однако добавление протеализина в клеточную среду не приводит к проникновению неинвазивных бактерий *E. coli* внутрь эукариотических клеток. Эти данные позволяют предположить, что процесс инвазии включает перенос фермента в цитоплазму клетки-хозяина.

Субстратная специфичность гримелизина/протеализина ограничена небольшим кругом нативных белков. Кроме MMP2, это актин (Khaitlina et al., 1988, Цаплина и др., 2009), гистоны (Matveyev et al., 1996) и белок теплового шока бактерий DnaK (Морозова и др., 2011). При этом наиболее вероятной мишенью для внутриклеточного действия протеализина является актин. Расщепление как глобулярного, так и фибриллярного актина существенно влияет на физиологические функции актина, в том числе, усиливает динамику полимеров актина, значительно ускоряя их деполимеризацию. Это означает, что расщепление протеиназой изменяет свойства актина в направлении, благоприятном для инвазии, и таким образом может способствовать интернализации бактерий, синтезирующих этот фермент. Кроме того, мы предполагаем, что мишенью фермента является не только актин эукариотической клетки, но и собственные гистоноподобные белки бактерии и DnaK.

ПРОТЕИНАЗЫ СЕМЕЙСТВА КАЛЬПАИНОВ У ВОДНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И РЫБ

Лысенко Л.А., Канцерова Н.П., Немова Н.Н.

Учреждение РАН Институт биологии КарНЦ РАН,
185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

E-mail: l-lysenko@yandex.ru

Кальпаины – кальций-зависимые протеиназы, ответственные за селективную деградацию белков в цитозоле клеток эукариот и ряда прокариот. К настоящему времени наиболее полно изучены два белка этого семейства из тканей позвоночных – μ(микро)- и m(милли)-кальпаины, различающиеся необходимым для активации уровнем кальция, а также их эндогенный ингибитор кальпастатин. Сведения о кальпаин-кальпастатиновой системе у рыб и беспозвоночных фрагментарны, между тем, такая информация крайне важна для установления хода молекулярной эволюции белков семейства. Несмотря на ограниченность структурных исследований кальций-зависимых протеиназ и кодирующих их генов у беспозвоночных и рыб, продемонстрирована роль этой внутриклеточной протеолитической системы во многих клеточных процессах (перестройке цитоскелета, слиянии, клеточной гибели, оплодотворении и др.), включая патологические, а также в развитии ответных реакций на изменяющиеся условия окружающей среды.

В работе приводятся результаты исследования уровня активности, структурных и энзиматических характеристик кальпаинов у некоторых водных беспозвоночных, принадлежащих к классам малощетинковых червей, пиявок, ракообразных, насекомых, брюхоногих и двустворчатых моллюсков, а также костистых рыб. Установлены особенности протеиназ беспозвоночных, отличающие их от типичных μ- и m-кальпаинов позвоночных животных: более низкая чувствительность к активатору (Ca^{2+}), отсутствие малой субъединицы, олигомерная структура, чувствительность (в ряде случаев) к ингибиторам протеиназ нецистеинового типа, повышение селективности действия, отсутствие эндогенного регулятора их активности (кальпастатина). Вероятно, выявленные отличия отражают как усиление пространственно-временного контроля активности кальций-зависимых протеиназ в эволюционном ряду, так и изменение функционального назначения этой протеолитической системы в метаболизме клетки.

Работа выполнена при поддержке проекта ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (ГК №14.740.11.1034), программы президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-3731.2010.4), гранта РФФИ № 11-04-00167-а и проекта Программы Президиума РАН «Биологическое разнообразие».

ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА IgA1 ПРОТЕИНАЗЫ *N. MENINGITIDIS*

Жигис Л.С.[1], Ягудаева Е.Ю.[1], Серова О.В.[1], Бичучер А.М.[2], Дрожжина Е.Ю.[1], Зуева В.С.[1], Козлов Л.В.[2], Котельникова О.В.[1], Разгуляева О.А.[1], Аваков А.Э.[4], Аллилуев А.П.[3], Румш Л.Д.[1], Зинченко А.А.[1]

[1]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
[2]ФГУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва
[3]ГОУ ВПО Российский университет дружбы народов (медицинский факультет), Москва
[4]Филиал ФГУН (НПО «Микроген») предприятие по производству бактерийных препаратов им. Г.Н.Габричевского, Москва

E-mail: zhigis@ibch.ru

IgA1 протеиназа, впервые обнаруженная в клетках рода *Neisseria* (менингококка и гонококка), обладает уникальной субстратной специфичностью к иммуноглобулинам A1, которые являются первым защитным барьером организмов человека и высших приматов на пути целого ряда патогенов.

Настоящая работа посвящена получению, очистке и характеристике ферментативной, иммуногенной и протективной активности IgA1 протеиназы, выделенной из культуры *N. meningitidis* серогрупп A и B.

Нативную IgA1 протеиназу серогруппы A выделяли из промежуточных продуктов, получаемых на разных этапах производства менингококковой полисахаридной вакцины.

Для получения IgA1 протеиназы серогруппы B были использованы новая рекомбинантная плазмидная ДНК pBIGAPS1, кодирующая секретируемую форму IgA1 протеиназы, несущую гистидиновую метку на C-конце, и штамм бактерий *E. coli* BL21(DE3)/pBIGAPS1, продуцент функционально активного фермента. Чистоту полученных препаратов анализировали методом электрофореза в ПААГ-ДСН, активность полученных ферментов определяли модифицированным методом ИФА, иммуногенную и протективную активность препаратов изучали на модели лабораторных животных.

В результате работы получены препараты нативной IgA1 протеиназы серогруппы A и рекомбинантной IgA1 протеиназы серогруппы B. Оба препарата обладали специфической ферментативной активностью и защищали мышей от заражения менингококком трех основных серогрупп A, B и C.

Работа поддержана госконтрактом № 16.512.11.2110.

ЭНДОГЕННЫЙ ИНГИБИТОР ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА *PARALITHODES CAMCHATICUS*

Руденская Г.Н.

Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы

E-mail: gnruden@genebee.msu.ru

Серпины – суперсемейство белковых ингибиторов сериновых и цистеиновых протеиназ представляют собой α-β мономерные белки из 350–500 аминокислотных остатков. Серпины, как ингибиторы протеиназ, вовлечены в такие важные биологические процессы, как коагуляция, фибринолиз, активация комплемента, воспалительные процессы различного рода, метастазирование опухолей, формирование внеклеточного матрикса. Новый эндогенный ингибитор выделен аффинной хроматографией на грамицидин-силохроме и гельфильтрацией на Сефадексе G-100 из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camchaticus*. Ингибитор подавляет активность трипсина, химотрипсина, субтилизина, тромбина, сериновой коллагенолитической протеиназы камчатского краба и папаина, но не действует на плазмин и глутамилэндопептидазу. Белок с Mr 67 kDa, имеет оптимум активности -15–20°C, стабилен от 4 до 40oC, при нагревании до 50°C и выше полностью инактивируется. Для проявления ингибиторного действия нуждается в 0,5–2 M NaCl. Первичная структура ингибитора краба в определенной степени гомологична серпинам членистоногих. Методом тромбоэластографии установлено, что при инкубации с ингибитором плазмы крови наблюдается выраженная гипокоагуляция, удлиняется время тромбопластино- и тромбинообразования, уменьшается индекс коагуляции и плотность сгустка. Помимо замедления начала свертывания, значительно растягивается во времени процесс формирования фибриновых нитей, что доказывает выраженное торможение гемокоагуляции в присутствии ингибитора и зависимость этого процесса от времени взаимодействия компонентов плазмы с ингибитором. Увеличение времени инкубации до 60 минут и добавление гепарина полностью блокирует процесс тромбообразования. Активирующая ингибитор роль гепарина подтверждена и в эксперименте с использованием хромогенного субстрата Gly-Arg-pNA. Если ингибитор инактивирует только 14% тромбина, то в присутствии гепарина – 89% Методом иммуноферментного анализа было показано, что ингибитор краба способен взаимодействовать с ключевым белком системы комплемента C1s аналогично серпину C1 плазмы крови человека. Серпин краба тормозит рост культур клеток рабдосаркомы, HeLa, мышиных иммортализованных фибробластов NIH 3T3 в системе *in vitro*.

ИНГИБИРОВАНИЕ ПРОТЕАСОМЫ И ИММУНОПРОТЕАСОМЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЕЩЕСТВ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ

Бачева А.В.[1], Кузина Е.С.[1], Белогуров А.А.[2], Пономаренко Н.А.[2], Габибов А.Г.[1,2]

[1]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.3
[2]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

E-mail: anbach@genebee.msu.ru

Протеасома играет ключевую роль в регуляции уровня специфических белков, поддерживая гомеостаз внутри клеток. Она катализирует деградацию белков, участвующих в управлении жизненным циклом клеток, регулируя их концентрации, а также избирательно уничтожает потенциально вредоносные аномальные или денатурированных белки, образующиеся при различных патологических процессах. Кроме того, протеасома участвует в процессах, связанных с работой иммунной системы, а именно в деградации белков с образованием антигенных пептидов, которые затем презентируются на молекулах MHC. В организме животных содержится два типа протеасомы – стандартная и иммунопротеасома. Под действием провоспалительных цитокинов в клетках начинается биосинтез каталитических иммуносубъединиц. Они обладают другой субстратной специфичностью, встраиваясь во вновь собирающиеся частицы протеасомы вместо конститутивных субъединиц. Для регуляции активности протеасомы разработаны ингибиторы нескольких классов. Среди них пептидоборонаты, в том числе бортезомиб, являются сильными ингибиторами, с Ki около нескольких нмоль. Однако эти вещества действуют как на конститутивную, так и на иммунопротеасому, на любые клетки, что приводит к остановке протеолиза и к смерти клеток через апоптоз. Предполагается, что пептидилэпоксикетоны, другой класс ингибиторов, обладают большей селективностью к иммунопротеасоме. Активность протеасомы, выделенной из различных источников (эукариотические клетки линий CHO и NSO, обработанные и не обработанные гамма-интерфероном, и мозг мышей линий BALB/c и SJL), была изучена в присутствии ряда ингибиторов. Использованы ингибиторы четырех классов, а именно пептидоборонат бортезомиб, пептидоальдегид MG132, лактамный ингибитор лактацистин, а также пептидилэпоксикетоны эпоксомицин, MG132ek, LMP2- и LMP7-специфические ингибиторы. Были получены значения IC50 для всех перечисленных ингибиторов и в некоторых случаях рассчитаны Ki. Показано, что эпоксикетоны в субмикромолярных концентрациях селективно ингибируют образцы протеасомы с высоким содержанием иммуносубъединиц. Это создает предпосылки для возможного использования ингибиторов данного класса в качестве лекарств направленного действия.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 09-04-01546.

МЕХАНИЗМЫ КОРРЕКЦИИ ОШИБОК ТРАНСКРИПЦИ И БАКТЕРИАЛЬНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ

Кульбачинский А.В.[1,2], Пупов Д.В.[1], Есюнина Д.М.[1,2]

[1]*Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН,*
123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2
[2]*Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,*
119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.12

E-mail: akulb@img.ras.ru

Высокая точность транскрипции необходима для правильной экспрессии генетического материала. Ошибки транскрипции могут приводить к появлению нефункциональных молекул РНК и мутантных вариантов белков и снижать жизнеспособность клеток. Основным механизмом исправления ошибок транскрипции служит удаление неправильно включенных нуклеотидов за счет реакции гидролитического расщепления РНК. Эта реакция происходит в том же активном центре РНКП, что и синтез РНК, при участии двух ионов магния. Расщепление РНК происходит после смещения элонгационного комплекса назад по матрице ДНК и регулируется специализированными белковыми факторами (Gre-факторами у бактерий). Точный молекулярный механизм реакции расщепления, а также механизмы действия Gre-факторов, во многом остаются непонятны.

В нашей работе мы исследовали механизмы расщепления РНК РНКП *Escherichia coli* и *Deinococcus radiodurans*, которые обладают сходными скоростями синтеза РНК, но значительно различаются по скоростям расщепления. Это позволило выявить факторы, влияющие на реакцию расщепления. Показано, что скорость реакции во многом определяется особенностями структуры участков РНКП, взаимодействующих с 3′-концом РНК, в частности, G-петли в активном центре фермента. Эти районы, вероятно, принимают непосредственное участие в реакции расщепления. Впервые клонированы и охарактеризованы Gre-факторы *D. radiodurans* и показано, что они способны значительно стимулировать реакцию расщепления РНК на транскрипционных матрицах разной структуры. Выявлены участки Gre-факторов, необходимые для их связывания с РНКП и стимуляции расщепления РНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 10-04-00925 и гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых ученых (МД-618.2011.4).

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕСИИ ГЕНОВ ПРОБЕЛОК-КОНВЕРТАЗ ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО

Демидюк И.В.[1], Шубин А.В.[1], Гасанов Е.В.[1], Куринов А.М.[1], Демкин В.В.[1], Виноградова Т.В.[2], Зиновьева М.В.[2], Сасс А.В.[2], Зборовская И.Б.[3], Костров С.В.[1]

[1]Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2
[2]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
[3]Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

E-mail: duk@img.ras.ru

Пробелок-конвертазы (ПК) – субтилизинподобные сериновые протеиназы млекопитающих, осуществляющие специфический процессинг неактивных предшественников белков и пептидов. Многие известные субстраты ПК, такие как факторы роста, их рецепторы, интегрины и матриксные металлопротеиназы, вовлечены в развитие и прогрессию злокачественных опухолей. Показано, что изменение экспрессии ПК влияет на пролиферацию, подвижность, адгезивную и инвазивную способность раковых клеток, поэтому ПК рассматриваются как потенциальные мишени противораковой терапии и маркеры онкологических заболеваний.

В данной работе впервые была проведена количественная оценка экспрессии генов всех девяти ПК на уровне мРНК в опухолевых тканях лёгкого человека с помощью обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени. Образцы злокачественных и прилежащих нормальных тканей были взяты у 30 пациентов с диагнозом «карцинома лёгкого». Были обнаружены значимые повышение экспрессии в опухоли по сравнению с нормальной тканью для гена фурина ($p<0,0001$) и снижение для генов *PCSK2* ($p<0,01$), *PCSK5* ($p<0,001$), *PCSK7* ($p<0,01$) и *MBTPS1* ($p<0,0001$). Однако выявить статистически значимых различий между уровнями экспрессии проанализированных генов или их паттернами экспрессии для групп образцов, отличающихся клиническими характеристиками, не удалось.

Кластерный анализ данных об изменении экспрессии ПК в опухоли относительно нормальной ткани показал, что исследованные образцы формируют четыре группы. Основной характеристикой каждой из них является максимальное увеличение или минимальное снижение экспрессии в опухоли одного из генов ПК (*FURIN, PCSK1, PCSK6* или *PCSK5*).

Полученные результаты показывают, что изменение экспрессии генов системы ПК при раке легкого происходит по нескольким сценариям, что может быть связано с различными механизмами возникновения опухолей.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ИММУННЫХ ПРОТЕАСОМ В ЦНС МЫШЕЙ, НОКАУТНЫХ ПО B_2-МИКРОГЛОБУЛИНУ

Люпина Ю.В.[1], Богатырев М.Е.[1], Астахова Т.М.[1], Абатурова С.Б.[1], Марюхнич Е.В.[2], Казанский Д.Б.[2], Шарова Н.П.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, Вавилова, 26*
[2]*Институт канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва*

E-mail: yulial@bk.ru

Присутствие главного комплекса гистосовместимости класса I (ГКГ I) установлено в клетках ЦНС, в том числе и в нейронах. В нейронах ГКГ I локализован постсинаптически и совместно с иммунными протеасомами регулирует функцию синаптической структуры в ответ на изменение нейрональной активности. Исследование особенностей пула протеасом в ЦНС при нарушенной экспрессии ГКГ I важно для понимания механизмов пластичности ЦНС. Исследованы содержание иммунных и конститутивных субъединиц протеасом, общий уровень протеасом, химотрипсин-подобная активность (ХПА) и каспаза-подобная активность (КПА) в различных отделах ЦНС мышей, нокаутных по β_2-микроглобулину ГКГ I (β2м), и мышей контрольной группы: во фронтальной коре (кора), стриатуме, медиабазальном гипоталамусе, мозжечке и стволе мозга. Показано, что количество иммунных субъединиц LMP2 и LMP7 в коре увеличивается, а в стриатуме уменьшается у нокаутных β2м животных. В стриатуме нокаутных β2м мышей снижен уровень конститутивных субъединиц протеасом β1 и β2. Обнаружено уменьшение содержания субъединицы PA28α активатора PA28 и тотального пула протеасом в стриатуме, стволе мозга и увеличение содержания PA28α в коре нокаутных β2м мышей. ХПА снижена в медиабазальном гипоталамусе и мозжечке, а в стволе мозга нокаутных β2м мышей наблюдалось снижение ХПА и КПА. В коре, мозжечке и стволе мозга нокаутных β2м мышей снижена экспрессия NeuN (нейронального ядерного белка). В каудальных отделах мозга снижена, а в коре отмечено достоверное увеличение экспрессии gFAP (глиального фибриллярного кислого белка). Выявлены возможные регуляторные пути изменения содержания иммунных протеасом. Показано, что количество белка теплового шока 70 – активатора экспрессии иммунных протеасом, и количество nNO-синтазы, запускающей этот сигнальный путь, увеличивается в коре нокаутных животных. Изменение соотношения иммунных протеасом, NeuN и gFAP в ЦНС связано с процессами нейрогенеза и дифференцировки, а также с компенсацией отсутствия ГКГ I у нокаутных β2м мышей.

Работа поддержана РФФИ (грант № 09-04-00077а).

ВЛИЯНИЕ АНТАГОНИСТА РЕЦЕПТОРА-1, АКТИВИРУЕМОГО ПРОТЕИНАЗОЙ (иПАР1-II), НА ВЫЗВАННУЮ ТРОМБИНОМ ГИБЕЛЬ НЕЙРОНОВ

Горбачева Л.Р.[1], Румш Л.Д.[2], Беспалова Ж.Д.[3], Фельдман Б.М.[4], Ворожцов Г.Н.[4], Струкова С.М.[1]

[1]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/12
[2]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
[3]Институт экспериментальной кардиологии Российского кардиологического научно-производственного комплекса Росмедтехнологий, Москва
[4]ФГУП «Государственный научный центр «НИОПИК», Москва

E-mail: LyubovGorbacheva@gmail.com

Увеличение проницаемости ГЭБ при травме, воспалении и других патологических состояниях приводит к появлению в нервной ткани сериновых протеиназ системы свертывания крови, в том числе тромбина. Известно, что тромбин регулирует функции клеток через рецепторы, активируемые протеиназами (ПАР) 1 и 4 типа, экспрессия которых обнаружена в разных областях мозга. Тромбин может вызывать отек мозга и гибель нейронов в очаге повреждения мозга, где обнаруживают высокие концентрации тромбина, которые отвечают за развитие тромбообразования и системного воспаления. Таким образом, исследование антагонистов ПАР как возможных цитопротекторных препаратов, препятствующих гибели нейронов, вызванной высокими концентрациями тромбина, при тяжелых патологических состояниях представляется весьма перспективным.

В настоящей работе на первичной культуре гиппокампальных нейронов крысы было исследовано влияние тромбина в высокой концентрации на выживаемость клеток, а также влияние разных концентраций нового синтетического пептида – антагониста ПАР1(иПАР1-II) на гибель нейронов в условиях действия тромбина. В ходе исследования выявлено, что тромбин в высокой (100 нМ) концентрации приводит к гибели до 30% нейронов. Мы исследовали влияние иПАР1 в разных концентрациях (1 нМ, 10 нМ и 100 нМ) на гибель гиппокампальных нейронов и действие иПАР1 в присутствии цитотоксической концентрации тромбина. Выявлено, что предварительная инкубация нейронов с низкими (1 и 10 нМ) концентрациями иПАР1 защищала клетки от токсического действия 100 нМ тромбина, стабилизируя выживаемость нейронов на уровне контроля. Вместе с тем, в отличие от низких концентраций, иПАР1 в высокой (100 нМ) концентрации вызывал гибель более 40% нейронов. Полученные данные позволяют предполагать, что в низких концентрациях иПАР1-II может защищать нейроны от цитотоксического действия высоких концентраций тромбина.

Работа выполнена при поддержке НТП «Разработка и практическое освоение в здравоохранении новых методов и средств профилактики, диагностики и лечения атеросклероза и его осложнений» на 2009–2011 гг.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТЕИНАЗЫ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА И ЕЕ МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНОГО МУТАНТА СО СПЕЦИФИЧЕСКИМИ ИНГИБИТОРАМИ МЕТОДОМ ОСТАНОВЛЕННОГО ПОТОКА

Дронина М.А.[3], Кузнецов Н.А.[1], Захарова М.Ю.[3], Смирнов И.В.[3], Козырь А.В.[2], Колесников А.В.[2], Калиберда Е.Н.[3], Румш Л.Д.[3], Федорова О.С.[1], Габибов А.Г.[3]

[1]*Учреждение РАН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2]*Институт инженерной иммунологии, Любучаны, Московская обл.*
[3]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

E-mail: mdronina@mail.ru

СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита – в течение последних лет привлекает к себе внимание как тяжелое, приводящее к гибели, заболевание человека, имеющее тенденцию к пандемическому распространению и до настоящего времени являющееся неизлечимым. Одним из подходов к терапии СПИДа является поиск и разработка ингибиторов вирусных ферментов. Эти ингибиторы прерывают жизненный цикл патогена и способны на годы отсрочить развитие заболевания. Среди лекарственных форм, применяющихся на сегодняшний день, можно отметить ингибиторы вирусной протеиназы – ампренавир, ритонавир, саквинавир, индинавир, дарунавир и др. Однако серьезной проблемой является возникновение мутантных форм фермента, резистентных к ингибиторам. Поэтому для селекции новых ингибиторов требуется изучение кинетических параметров действия протеиназы СПИДа, позволяющее наблюдать динамику этого процесса.

В данном исследовании мы сравнивали между собой рекомбинантные белки-ферменты: дикого типа протеиназы ВИЧ-1 (WT1) и ее мультирезистентного мутанта (mut 1) (L10I/L31I/M46I/I54V/L63I/V82A/I84V/L90M) методом остановленного потока («stopped-flow»). Гены протеиназы мутантного белка и дикого типа получали методом ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров, встраивали в экспрессионный вектор pET15, проводили экспрессию и очистку ферментов.

Нами было проанализированы элементарные стадии гидролиза FRET – субстрата (Arg-Glu(EDANS)-Ser-Gln-Tyr-Pro-Ile-Val-Gln-Lys(DABCYL)-Arg) протеиназой дикого типа и мультирезистентной протеиназой в присутствии специфических ингибиторов I (саквинавир, индинавир) и II (дарунавир) поколений.

Анализ динамики формирования комплексов протеиназа-ингибитор методом остановленного потока позволил выявить фундаментальное отличие между связыванием протеиназы ВИЧ с ингибиторами I и II поколений, что будет способствовать разработке новых высокоэффективных ингибиторов протеиназы ВИЧ.

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МАЛДИ МАСС-СПЕКТРОВ ПРОДУКТОВ ПРОТЕОЛИЗА КАК МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПРОТЕИНАЗ

Еремеев Н.Л., Борзенкова А.В., Драчевская М.И.

Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.3

Определение первичной специфичности является обязательным этапом характеристики любой новой протеиназы (под первичной специфичностью подразумевают избирательность фермента по отношению к аминокислоте, образующей гидролизуемую амидную связь своей карбоксильной группой – по классификации Шехтера-Бергера это положение P1 субстрата).

В настоящее время первичную специфичность протеолитических ферментов выявляют двумя основными методами – определение констант гидролиза в сериях гомологичных субстратов или разделение продуктов протеолиза белковых субстратов с известной аминокислотной последовательностью и определение их структуры (N-концевой сиквенс или тандемная масс-спектрометрия), что позволяет выявлять гидролизованные пептидные связи. Оба этих подхода весьма трудоемки.

Нами предлагается метод изучения первичной специфичности протеолитических ферментов статистическим анализом масс продуктов протеолиза белковых субстратов, не требующий прямого определения аминокислотной последовательности этих продуктов.

Идея метода заключается в следующем. Проводят гель-электрофорез в восстанавливающих и денатурирующих условиях белка-субстрата с известной аминокислотной последовательностью. Полосу субстрата подвергают протеолизу изучаемой протеиназой. МАЛДИ масс-спектр реакционной смеси дает набор масс продуктов протеолиза. С помощью программы FindPept теоретически находят все пептиды белкового субстрата, обладающие конкретной массой в пределах той или иной ошибки измерения. Месторасположение этих пептидов в первичной аминокислотной последовательности субстрата позволяет выделить для каждого из них две аминокислоты, после которых потенциально произошел гидролиз. Подобную процедуру проводят для каждой массы в масс-спектре, в результате чего получают набор произошедших событий. Первичная специфичность протеиназы должна проявляться в максимальной частоте встречаемости той или иной аминокислоты при статистическом анализе полученного набора.

Секция 8

Создание новых лекарственных средств

АНТИЭПИЛЕПТИЧЕСКОЕ И НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ КОРТЕКСИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СУДОРОЖНОЙ АКТИВНОСТИ, ВЫЗВАННОЙ ВВЕДЕНИЕМ ПЕНТИЛЕНТЕТРАЗОЛА, У КРЫС

Аниол В.А.[1], Новицкая Ю.А.[2], Лазарева Н.А.[1], Моисеева Ю.В.[1], Онуфриев М.В.[1], Попова М.С.[1], Степаничев М.Ю.[1], Тишкина А.О.[1], Яковлев А.А.[1], Гранстрем О.К.[2], Гуляева Н.В.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва*
[2]*ООО «Герофарм», С.-Петербург*

E-mail: aniviktor@narod.ru

Современная терапия эпилепсии является главным образом симптоматической, направленной на купирование пароксизмальных состояний, поэтому актуальна разработка лекарств, которые позволяют управлять течением заболевания (антиэпилептический потенциал) и повышать устойчивость тканей мозга к повреждающему действию судорожной активности (нейропротекторные свойства). Возможным перспективным направлением является разработка пептидных препаратов, чье действие основано на модулировании нейрональной пластичности и нормализации метаболизма поврежденных тканей. Целью данной работы было изучение противосудорожных, антиэпилептических и нейропротекторных свойств препарата кортексин, представляющего собой комплекс водорастворимых полипептидных фракций мозга крупного рогатого скота.

В исследовании на крысах была использована модель хронических экспериментальных судорог, вызванных введением химического конвульсанта пентилентетразола (ПТЗ) – пентилентетразоловый киндлинг. Кортексин вводили животным внутрибрюшинно (0,015 мг/кг, 0,15 мг/кг и 1,0 мг/кг) или интраназально в комплексе с наночастицами (0,015 мг/кг). Было обнаружено, что при моделировании хронической судорожной активности с помощью ПТЗ кортексин (преимущественно в дозе 1,0 мг/кг) удлиняет латентный период развития судорожной активности, так и, в ряде случаев, снижает силу судорог. Хроническая судорожная активность при длительном введении ПТЗ сопровождается потерей нормальной нейрональной плотности в различных полях гиппокампа. Введение кортексина (0,015 мг/кг и 0,15 мг/кг) предотвратило снижение нейрональной плотности в поле CA4 и зубчатой фасции гиппокампа.

Таким образом, при моделировании экспериментальной хронической судорожной активности у крыс было выявлено антиэпилептическое и нейропротекторное действие кортексина.

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ И ОПТИЧЕСКОЙ ИЗОМЕРИИ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ И ПРОИЗВОДНЫХ 2,5-ДИКЕТОПИПЕРАЗИНОВ

Дейгин В.И.[1], Ксенофонтова О.Б.[1], Ефремов Е.С.[1], Шевченко А.С.[2], Семин Ю.А.[2], Изместьева О.С.[2], Лузянина А.А.[2],Саенко А.С.[2]

[1]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
[2]Федеральное государственное бюджетное учреждение МРНЦ Минздравсоцразвития РФ, 249036 Обнинск, Московская обл., ул. Королёва, 4

E-mail: vdeigin@gmail.com

Одним из основных ограничений к широкому внедрению пептидных лекарственных препаратов в медицинскую практику является их низкая устойчивость к ферментативному расщеплению при введении в организм. Исследователями используются различные методы и приемы, увеличивающие стабильность молекул при введении в организм, в том числе получение различных циклических производных.

Выделение из экстракта тимуса биологически активного пептида L-Glu-L-Trp положило начало структурно – функциональным исследованиям низкомолекулярных пептидов, содержащих в своем составе дипептид Glu-Trp. Ранее нами было показано влияние этих соединений на процессы пролиферации стволовых гемопоэтических клеток костного мозга экспериментальных животных *in vivo*; была установлена роль оптической изомерии в направленности биологических эффектов. Основываясь на полученных данных о влиянии оптических и химических свойств пептидов семейства Glu-Trp на их биологическую активность, было высказано предположение о реципрокном действии ряда изомеров Glu-Trp на иммунную и гемопоэтическую системы. Исследование влияния оптических и химических свойств изомеров Glu-Trp показало, что существует взаимосвязь между биологическим действием, химической структурой и оптической активностью для каждого из восьми возможных изомеров [1]. Для низкомолекулярных пептидных препаратов (до 800 – 1000 D) нами предложен подход, позволяющий создавать стабильные при пероральном приеме соединения, путем «включения» биологически активного фрагмента в структуру дикетопиперазинового производного. Наряду с иммуно- и гемоактивными препаратами получены дикетопиперазиновые производные нейропептидов, обладающие анальгетической активностью при пероральном приеме, а также «химерные» производные, содержащие в своем составе различные фармакофоры.

Литература

1. Deigin V.I., et.al. «The effects of the EW dipeptide optical and chemical isomers on the CFU-S population in intact and irradiated mice». *Int. Immunopharmacology*. (2007) **7**, 375–382.

ПСИХОФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ СПЕКТР АКТИВНОСТИ НЕЙРОТЕНЗИНПОДОБНЫХ ПЕПТИДОВ

Кост Н.В.[1], Мешавкин В.К.[1], Батищева Е.Ю.[1], Соколов О.Ю.[1], Андреева Л.А.[2], Мясоедов Н.Ф.[2]

[1]*Научный центр психического здоровья РАМН, Москва, Каширское ш., 34*
[2]*Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, Москва, пл. Ак. Курчатова, 2*

E-mail: nat-kost@yandex.ru

Предполагается, что регуляторный пептид нейротензин играет роль эндогенного антипсихотика, а так же способен модулировать другие психические функции, в частности, тревогу и депрессию. На основе фармакофора нейротензина (Pro-Tyr) был синтезирован ряд олигопептидов, названных нейротензинподобными пептидами (НТП). В поведенческих экспериментах в условиях фармакологически измененной активности дофаминовой, серотониновой и глутаматной систем НТП проявили свойства, характерные для антипсихотиков. НТП были эффективны в экспериментальных моделях позитивной и негативной симптоматики шизофрении и не вызывали выраженных отрицательных побочных эффектов. Кроме того НТП оказывали антидепрессивное и анксиолитическое действие на животных в тестах «принудительное плавание» и «приподнятый крестообразный лабиринт», соответственно. В тесте «открытое поле» НТП повышали «исследовательскую» активность животных, что косвенно свидетельствует об их ноотропных свойствах. Сопоставление результатов, полученных в поведенческих тестах и в экспериментах *in vitro* (радиолигандный метод, агрегация тромбоцитов), показало, что биологические эффекты НТП могут быть опосредованы дофаминовыми и серотониновыми рецепторами.

Таким образом, НТП обладают широким спектром действия и могут послужить основой для создания новых пептидных антипсихотиков, эффективных в терапии позитивной, негативной симптоматики и когнитивных расстройств при шизофрении, а также антидепрессантов и других психофармакологических препаратов.

СОЗДАНИЕ СИСТЕМНО АКТИВНОГО ДИПЕПТИДНОГО МИМЕТИКА ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ

Гудашева Т.А., Середенин С.Б.

Учреждение РАМН НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, 125315 Москва, Балтийская, 8

E-mail: tata-sosnovka@mail.ru

Многочисленные литературные данные свидетельствуют об участии фактора роста нервов (NGF) в патогенезе нейродегенеративных заболеваний. Белковая природа NGF исключает возможность заместительной терапии, а созданные к настоящему времени его циклоолигопептидные аналоги в качестве низкомолекулярных миметиков не проявляют достаточной фармакологической активности при системном введении.

Нами был сконструирован и синтезирован N-ацилдипептидный миметик β-изгиба 4-й петли NGF. По своей последовательности он совпадает с центральным участком (Glu^{94}-Lys^{95}) β-изгиба, а N-ацил представляет собой биоизостер Asp^{93}. Поскольку NGF является гомодимером, были синтезированы димеры этого дипептида, и соединение с гексаметилендиамидным спейсером [ГК-2; $HOOC-(CH_2)_2-CO-Glu-Lys-NH-CH_2-CH_2-CH_2-)_2$] было отобрано для подробного изучения. Нейропротективная активность ГК-2 (10^{-5}–10^{-9}M) *in vitro* установлена на клеточных моделях в условиях оксидативного стресса, глутаматной, МФТП и 6-оксидофаминовой нейротоксичности. Подобно NGF, ГК-2 усиливал фосфорилирование TrkA и синтез HSP32 и HSP70. (Т.А.Антипова, 2010).

В опытах *in vivo* ГК-2 обнаружил противоинсультную, антипаркинсоническую и антиишемическую активности. Эффекты проявлялись в интервале доз 0,01–5 мг/кг i.p. и 10–30 мг/кг p.o. Так, при хроническом введении ГК-2 (1 мг/кг i.p.) уменьшал на 60% зону инфаркта на модели фотоиндуцированного инсульта коры головного мозга крыс и на 16% – на модели инсульта, вызванного окклюзией среднемозговой артерии, а на модели геморрагического инсульта полностью предупреждал смертность крыс. На модели индуцированного нейротоксином МФТП паркинсоничского синдрома ГК-2 достоверно уменьшал выраженность акинезии и ригидности, а при хроническом введении полностью снимал паркинсонический синдром, вызванный унилатеральным введением 6-оксидофамина в стриатум. На модели неполной глобальной ишемии, вызванной двусторонней перевязкой сонных артерий у крыс, хроническое введение ГК-2 (1 мг/кг i.p.) полностью предотвращало гибель животных и восстанавливало нарушенное поведение.

Таким образом, ГК-2 можно рассматривать в качестве первого NGF-подобного нейропротективного препарата, эффективного при системном введении.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (грант № 11-04-00538-а).

ПОИСК МАЛЫХ МОЛЕКУЛ С АНТИПСИХОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ НА ОСНОВЕ НЕЙРОТЕНЗИНА

Островская Р.У., Гудашева Т.А., Середенин С.Б.

Учреждение РАМН НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, 125315 Москва, Балтийская, 8

E-mail: rita.ostrovskaya@gmail.com

Данные о тесной взаимосвязи нейротензин (НТ)- и дофамин (ДА)-ергической систем позволили выдвинуть гипотезу о роли НТ как эндогенного нейролептика (Nemeroff, 1980). Структура этого тридекапептида, обуславливающая низкую биодоступность для мозга, делает невозможным его практическое использование. Оригинальный подход к поиску системно активных пептидных препаратов, развиваемый в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, состоит в создании малых молекул – замещенных дипептидов, имитирующих конформацию активного центра эндогенного пептида, выявленного на основании структуры дипептидного прообраза соответствующего непептидного лекарства [Gudasheva T.A. et al., 1996, 1998]. За основу моделирования активных НТ-подобных нейролептиков был взят дипептид пролил-тирозин в связи с тем, что он имеет топологическое сходство с атипичным нейролептиком сульпиридом и соответствует центральному фрагменту β-изгиба $НТ_{8-13}$, На основании структуры выявленного активного дипептидного участка нейротензина получена новая группа потенциальных атипичных нейролептиков, N- ацилпролилтирозинов [Середенин и соавт., Патент РФ № 2091390], из серии которых для подробного изучения был отобран метиловый эфир N-капроил-L-пролил-L-тирозина (Дилепт). Дилепт (в диапазоне доз 0,4-4 мг/кг для в/б введения, 8–24 мг/кг для перорального введения) ослабляет апоморфиновую вертикализацию и стереотипию, стимуляцию двигательной активности и нарушение экстраполяционного избавления, обусловленные введением дофаминомиметиков, устраняет дефицит препульсового торможения, вызванный дофамино-миметиками или блокатором NMDA-рецепторов («трансляционная» модель шизофрении), потенцирует эффект барбитуратов. Даже в дозах, превышающих в 500 раз таковые по антидофаминовым эффектам, он не вызывает каталепсии, седации. Важным преимуществом Дилепта перед известными антипсихотиками является также положительное влияние на когнитивные функции и нейропротективное действие [Островская Р.У., 2000–2008]. В отличие от пептидных препаратов более сложной структуры, Дилепт в условиях перорального введения проникает в мозг. Препарат не вызывает толерантности, лекарственной зависимости и синдрома отмены.

ГЛИПРОЛИНЫ И ЯЗВА ЖЕЛУДКА

Самонина Г.Е., Копылова Г.Н., Умарова Б.А., Багликова К.Е., Бакаева З.В.

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

E-mail: g_samonina@mail.ru

Распространенность язвенной болезни по-прежнему не имеет тенденции к снижению, поэтому проблема поддержания гомеостаза слизистой оболочки желудка (СОЖ) при воздействии на нее различных повреждающих факторов остается весьма актуальной. Особое внимание уделяется роли эндогенных регуляторных пептидов в процессе поддержания гомеостаза СОЖ. Несмотря на различный характер повреждающих факторов, вызывающих экспериментальные язвы желудка у крыс (этанол, стресс, индометацин, ледяная уксусная кислота и др.), первоначальной реакцией является воспаление, приводящее к разной степени язвенных повреждений.

Мы исследовали влияния на гомеостаз СОЖ крыс различных глипролинов: PG, GP, PGP, GPG, GPGP, GPGP, PGPG, PGPGP, GPGPGP, PGPPGP, GHyp, HypG, HypGP и PGHyp на этаноловой, стрессорной, индометациновой, ацетатной и при введении вещества 48/80, вызывающего массивную дегрануляцию тучных клеток.

Глипролины – фрагменты коллагена, состоящие из глицина, пролина и/или гидроксипролина, обладают целым рядом физиологических свойств, среди которых следует отметить в первую очередь противовоспалительные и антиульцерогенные. Протекторным противоязвенным эффектом, как при внутрибрюшинном, так и внутрижелудочном способах введения глипролинов (3.7 и 0.37мкг/кг) на этаноловой модели язвообразования обладают PGP, PG, GPGP и GPGPGP, а устойчивость СОЖ к действию стресса повышают PGP, GP, GPGP, GPGPGP, GHyp, HypGP и PGHyp. На ацетатной модели язвообразования было показано, что все изученные глипролины обладают и лечебным противоязвенным действием.

Наибольшие противоязвенные эффекты проявляют PGP и GPGPGP. Противоязвенные эффекты этих пептидов обусловлены восстановлением нарушенного кровотока, уменьшением кислой и усилением щелочной секреции, усилением образования слизи, снижением секреторной активности тучных клеток, уменьшением вызванных воспалением нарушений микроциркуляции и сократительной активности лимфатических сосудов. Способность глипролинов предотвращать или уменьшать повреждения СОЖ позволяет рассматривать их как вещества перспективные для создания новых лекарственных средств.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты №№ 97-04-48550-а, 00-04-48086-а, 03-04-48664-а, 06-04-48833-а, 09-04-00669-а).

ПЕПТИД МОЛОКА ЧЕЛОВЕКА ЛАКТАПТИН КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ПРОТИВОРАКОВЫЙ ПРЕПАРАТ

Рихтер В.А.[1], Коваль О.А.[1], Каледин В.И.[2], Фомин А.С.[1], Потапенко М.О.[1], Кулигина Е.В.[1], Семенов Д.В.[1]

[1]Учреждение РАН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8
[2]Учреждение РАН Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090 Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10

E-mail: richter@niboch.nsc.ru

Ранее было обнаружено, что в человеческом молоке содержится пептид, вызывающий апоптоз клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Было установлено, что исследуемый пептид является протеолитическим фрагментом каппа-казеина человека. Учитывая происхождение пептида и его апоптотические свойства, его назвали **лактаптином**.

Далее был создан штамм-суперпродуцент и получен генно-инженерный аналог лактаптина RL2. Было показано, что RL2 подавляет жизнеспособность онкотрансформированных клеток и не влияет на немалигнизированные клетки человека.

Был разработан способ лечения метастазирующих злокачественных заболеваний животных рекомбинантным аналогом лактаптина RL2. Показано, что при двухразовом внутривенном введении RL2 в дозе 40 мг/кг рост солидной опухоли замедляется на 65% по сравнению с контрольной группой животных. В экспериментах по моделированию процессов метастазирования у животных установлено, что при внутривенном введении RL2 в дозе 40 мг/кг (2–4 раза) продолжительность жизни животных увеличивается в среднем на 24%. При этом RL2 не оказывает общего токсического действия.

Было установлено, что механизм действия рекомбинантного аналога лактаптина RL2 на клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 включает в себя взаимодействие RL2 с белками микротрубочек (α и β цепи тубулина и α-актинин-1), нарушение динамики веретена деления, остановку клеточного цикла в G2/M фазе, что приводит к p53 регулируемой апоптотической гибели клеток по митохондриальному пути.

Работа поддержана грантами: РФФИ № 10-04-01109-а, ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» № 02.740.11.0715.

ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ АЛЬФА7-СУБЪЕДИНИЦЫ АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА И ПРИОННОГО БЕЛКА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Камынина А.В.[1], Бобкова Н.В.[2], Медвинская Н.И.[2], Александрова И.Ю.[2], Короев Д.О.[1], Волкова Т.Д.[1], Вольпина О.М.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*
[2]*Учреждение РАН Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская обл.*

E-mail: aneskaminina@mail.ru

Болезнь Альцгеймера (БА) – тяжелое нейродегенеративное заболевание, которое сопровождается накоплением амилоидных бляшек, состоящих из агрегированной формы бета-амилоидного пептида (Aβ). В настоящее время неизвестен точный механизм того, как именно Aβ оказывает свое губительное действие. В последние годы в качестве наиболее перспективного подхода для лечения БА рассматривается иммунотерапия, основанная на индукции специфических антител к Aβ, снижающих его уровень в мозгу пациентов. Однако этот подход имеет ряд недостатков, поэтому остается актуальным поиск новых альтернативных путей для борьбы с БА.

Нами был предложен новый подход к терапии БА, основанный на выработке антител не к Aβ, а к его предполагаемым рецепторам. Известно несколько мишеней Aβ, среди которых альфа7-тип ацетилхолинового рецептора (АХР) и прионный белок. Мы предположили, что специфические антитела к этим рецепторам будут препятствовать их связыванию с Aβ и, таким образом, защищать клетки от гибели. Нами были выбраны и синтезированы фрагменты этих рецепторов: пептид последовательности 173-193 альфа7-субъединицы АХР (АХР173-193) и пептиды последовательностей 95-123 и 203-229 прионного белка (Пр95-123 и Пр 203-229, соответственно). Была изучена их иммунотерапевтическая активность на мышах с экспериментально индуцированной формой БА. Было выявлено, что активная иммунизация пептидами АХР173-193 и Пр95-123 оказывала терапевтический эффект в модели БА, а именно, приводила к восстановлению пространственной памяти и понижению уровня Aβ. Чтобы доказать, что наблюдаемая терапевтическая активность вызвана именно действием антител, были проведены опыты по пассивной защите мышей с экспериментально индуцированной формой БА аффинноочищенными антителами к пептидам АХР173-193 и Пр95-123. Было выявлено, что пассивное введение антител, также как и активная иммунизация, приводило к восстановлению пространственной памяти экспериментальных животных. Была выявлена обратная дозо-зависимость эффекта. Таким образом, предлагаемый нами подход, основанный на действии антител к рецепторам Aβ, может рассматриваться как перспективный путь для борьбы с БА у людей.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ТРАНСПЛАНТАЦИИ VEGF И FGF2 В ОБЛАСТЬ ТРАВМАТИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ ПРИ ПОМОЩИ КЛЕТОК КРОВИ ПУПОВИНЫ И ПУТЕМ ПРЯМОЙ ИНЪЕКЦИИ

Шаймарданова Г.Ф.[1], Мухамедшина Я.О.[2], Ризванов А.А.[3], Салафутдинов И.И.[3], Челышев Ю.А.[2]

[1]Учреждение РАН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111 Казань, ул. Лобачевского, 2/31
[2]Казанский государственный медицинский университет, 420012 Казань, ул. Бутлерова, 49
[3]Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18

E-mail: Gulnara_kzn@rambler.ru

Ввиду низкого регенераторного потенциала ЦНС, используемые сегодня методы лечения травмы спинного мозга, остаются малоэффективными. Определенные перспективы открываются в связи с применением стволовых клеток. Так, трансплантация клеток крови пуповины человека сдерживает воспалительную реакцию, оказывает нейротрофическое действие, стимулирует неоваскуляризацию, снижает экспрессию проапоптозных генов и поддерживает выживание нейронов. Усилить терапевтический эффект можно путем применения генетически модифицированных клеток, обладающих способностью к длительной гиперэкспрессии ключевых факторов, которые поддерживают выживание и дифференцировку нейральных клеток.

В этом качестве особый интерес вызывают сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и фактор роста фибробластов 2 (FGF2). VEGF проявляет свойства типичного нейротрофического фактора. Однако, данные о влиянии на нейрорегенерацию прямой доставки VEGF в область повреждения спинного мозга противоречивы. FGF2 активирует дифференциацию предшественников макроглии в зрелые клетки. Влияние на процессы нейрорегенерации комбинации VEGF-FGF2 не изучено. С этой целью нами впервые сконструирована двухкассетная плазмида pBud-VEGF-FGF2, экспрессирующая одновременно два гена *vegf* и *fgf2*. В настоящей работе на модели дозированной контузионной травмы спинного мозга крысы на уровне T8 изучены эффекты немедленного однократного введения в область повреждения мононуклеарных клеток крови пуповины человека, трансфицированных плазмидным вектором pBud-VEGF-FGF2 и путем прямой инъекции плазмид pBud-VEGF-FGF2. Животным контрольной группы в тех же условиях вводили аналогичные клетки, трансфицированные геном зеленого флуоресцентного белка (EGFP).

По данным морфометрии на 30-е сутки после операции как трансплантация клеток, так и инъекция плазмиды приводят к увеличению площади сохраненного серого и белого вещества на расстоянии 3 и 5 мм в ростральном и каудальном направлениях от эпицентра травмы. При трансплантации клеток, трансфицированных плазмидой pBud-VEGF-FGF2, площадь сохраненного серого вещества на расстоянии 3 мм от эпицентра травмы увеличивается более чем на 60%. В наружных зонах белого вещества отмечено уменьшение площади патологических полостей и рост числа миелиновых волокон. При трансплантации трансфицированных кле-

ток крови пуповины количество периваскулярных клеток, экспрессирующих бета рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFRbeta), на расстоянии 1,5 см от эпицентра травмы возрастает в среднем на 30%, а в случае прямой инъекции – на 54%. Наибольшее количество PDGFβR^{+}-клеток выявлено в наружных зонах белого вещества. Количество S100^{+}-клеток на этом расстоянии возрастает при введении трансфицированных клеток крови пуповины на 55%, в случае прямой инъекции плазмиды – на 46% ($P<0,05$).

ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА ПУТЕМ СЕЛЕКТИВНОЙ ЭЛИМИНАЦИИ АУТОРЕАКТИВНЫХ В-КЛЕТОК

Степанов А.В., Белогуров А.А.-мл., Пономаренко Н.А., Козлов Л.В., Дмитриев С.Е., Стремовский О.А., Деев С.М., Габибов А.Г.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: stepanov.aleksei.v@gmail.com

Рассеянный склероз (РС) – это хроническое нейродегенеративное заболевание аутоиммунной природы, при котором повреждается миелиновая оболочка нервных волокон, что приводит к постепенной утрате различных функций нервной системы, связанных с физическим и психоэмоциональным состоянием больного. РС представляет собой острую медико-социальную проблему, поскольку, как правило, поражает лиц молодого и среднего возраста. Проблема лечения РС остается далекой от разрешения, на сегодняшний день существуют лекарственные препараты, способные только в некоторой степени замедлить течение РС, но не излечивать от этой патологии. В основном современная терапия РС состоит в применении иммуносупрессоров, копаксона (сополимер глатирамера ацетат) и моноклонального анти-CD20/19 антитела (ретуксимаб). Все вышеперечисленные подходы обладают рядом существенных недостатков, в основном связанных с неспецифическим действием на всю иммунную систему. В данной работе мы предлагаем подходы для направленной и эффективной элиминации аутореактивных В-клеток, позволяющие избежать подавления функций В-клеточного звена в целом. В ходе выполнения работы были получены иммунотоксины (ИТ) на основе барназы, псевдомонадного токсина, шига-подобного токсина и Fc домена человеческого антитела класса IgGγ1, слитных с последовательностью c-myc эпитопа. Данные ИТ были протестированы как на наличие функциональной активности, так и на связывание с антителами, продуцируемыми клетками-мишенями. Нами было показано, что последовательность c-myc, слитная с токсинами, во всех случаях обеспечивала адресную доставку токсичного агента к клетке-мишени. Молекула на основе псевдомонадного токсина оказалась одной из наиболее цитотоксичных, однако она обладала и высоким неспецифическим действием. Иммунотоксин на основе шига-подобного токсина продемонстрировал средние значения обоих параметров. Согласно нашим данным наиболее эффективными ИТ, сочетающими высокую токсичность и селективность, являются иммунотоксины на основе барназы и Fc домена человека. Терапия РС с их использованием представляется наиболее перспективной.

ОЦЕНКА ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДОВ ПРОСТАМАКС И КОРТАГЕН НА МОДЕЛИ ХИМИЧЕСКОГО ОТЕКА СТОПЫ КРЫС: ИССЛЕДОВАНИЕ В СООТВЕТСТВИИ С ТРЕБОВАНИЯМИ КАЧЕСТВЕННОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКИ

Ленцман М.В.[1], Артемьева А.И.[1], Гранстрем О.К.[2], Шопотов И.К.[2]

[1]Учреждение РАН Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, 199034 С.-Петербург, наб. Макарова, 6
[2]ООО «Герофарм», 197022 С.-Петербург, ул. Ак. Павлова, 5

E-mail: Lensman@kolt.infran.ru; Granstrem@geropharm.ru

Пептиды Простамакс и Кортаген обладают широким спектром биологической активности. Для выяснения одного из возможных механизмов действия этих пептидов, в данном исследовании, проведенном в соответствии с требованиями качественной лабораторной практики, была выполнена оценка их противовоспалительной (противоотечной) активности.

Исследование проведено на 90 неанестезированных белых крысах-самцах линии Вистар весом 250–320 г с применением «слепого» экспериментального протокола. Экспериментальный отек вызывался субплантарным введением 3% раствора полисахарида Агар-Агар (А-А). Исследуемые вещества (ИВ) вводились внутрибрюшинно за 60 мин до введения ирританта. Степень отека оценивалась по изменению объема стопы (методом плетизмометрии) сразу после и через 2, 4 и 6 часов после введения ирританта и выражалась в приросте объема стопы в % относительно фонового значения у данного животного. В исследование были включены 12 групп ИВ (по 3 группы каждого из 4 ИВ в дозах 10, 100 и 1000 мкг/кг), группы негативного (0,9% р-р хлорида натрия, НК) и позитивного (Диклофенак, 50 мг/кг, ПК) контролей.

В группах НК происходило формирование выраженного отека стопы в ответ на введение А-А: 43–44% через 2 часа, 62–64% через 4 часа и 58–60% через 6 часов после введения А-А. Вещество ПК практически полностью блокировало развитие отека.

Кортаген в дозе 1000 мкг/кг статистически достоверно снижал степень отека в точках регистрации 4 часа (на 24% меньше группы НК) и 6 часов (на 24% меньше группы НК).

Простамакс в дозе 1000 мкг/кг снижал степень отека в точках регистрации 2 часа (на 23 % меньше группы НК) и 4 часа (на 19% меньше группы НК).

По результатам исследования Кортаген и Простамакс могут быть признаны обладающими выраженной противовоспалительной активностью.

Исследование проведено по заказу и при финансовом обеспечении ООО «Герофарм».

ИММУНОГЕННЫЕ И ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА IgA 1 ПРОТЕИНАЗЫ МЕНИНГОКОККА

Котельникова О.В.[1], Бичучер А.М.[3], Дрожжина Е.Ю.[1], Жигис Л.С.[1], Зуева В.С.[1], Мельников Э.Э.[1], Разгуляева О.А.[1], Серова О.В.[1], Ягудаева Е.Ю.[1], Аваков А.Э.[4], Аллилуев А.П.[2], Козлов Л.В.[3], Румш Л.Д.[1]

[1]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
[2]ГОУ ВПО Российский университет дружбы народов (медицинский факультет), 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8
[3]ФГУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, 125212 Москва, ул. Адм. Макарова, 10
[4]Филиал ФГУН (НПО «Микроген») предприятие по производству бактерийных препаратов им. Г.Н. Габричевского, 125212 Москва, ул. Адм. Макарова, 10

E-mail: ovkot.2003@mail.ru

До настоящего времени в практике мирового здравоохранения отсутствует вакцина против менингококковой инфекции серогруппы B. Результаты, полученные авторами, позволяют предложить в качестве кандидата такой вакцины секретируемую менингококком и рядом других микробов IgA1 протеиназу, являющуюся фактором их патогенности. Для работы использовали очищенные препараты IgA1 протеиназы менингококков серогрупп A или серогруппы B. Было установлено, что оба полученных препарата обладают выраженной иммуногенной и протективной активностью в опытах на мышах, обеспечивая их защиту от заражения живыми вирулентными штаммами менингококков трех основных эпидемических серогрупп (A, B и C). Уровень специфических антител к IgA1 протеиназе, определяемых методом твердофазного ИФА, составлял 1:20 000–1:40 000. Защищенность иммунизированных мышей от заражения менингококком увеличивалась в 3 и более раз по сравнению с контрольными мышами, а число погибших животных составляло от 10 до 30%, по сравнению с 90% в контрольной группе.

Таким образом, показано, что IgA1 протеиназа, полученная из различных источников, обладает поливалентной активностью и способна эффективно защищать мышей от заражения живой менингококковой культурой гетерологичных серогрупп, а, следовательно, может рассматриваться как кандидат для создания поливалентной менингококковой вакцины.

Работа выполнена при финансовой поддержке госконтракта № 16.512.11.2110.

ПЕПТИДНЫЕ ИММУНОГЕНЫ ДЛЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГЕПАТИТА С

Колесанова Е.Ф., Мойса А.А., Пындык Н.В., Фарафонова Т.Е., Фуников С.Ю., Соболев Б.Н., Арчаков А.И.

Учреждение РАМН НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121 Москва, ул. Погодинская, 10

E-mail: Ekolesanova@yandex.ru

Чрезвычайно высокая генетическая вариабельность и изменчивость оболочечных белков вируса гепатита С (ВГС) делает разработку средств вакцинопрофилактики вызываемого этим возбудителем заболевания непростой задачей. Одним из перспективных вариантов такого средства является синтетическая пептидная вакцина на основе фрагментов оболочечных белков вируса гепатита С (ВГС).

Пептидные иммуногены конструировали с использованием биоинформационных подходов, включающих анализ аминокислотных последовательностей оболочечных белков вируса гепатита С (ВГС), предсказание возможных В- и Т-эпитопов и вероятности формирования стабильных вторичных структур в молекулах пептидов. Пептиды синтезировали методом твердофазного синтеза.

Были получены 6 синтетических пептидных конструкций, каждая из которых состояла из двух высококонсервативных фрагментов оболочечного белка Е2 ВГС. Один из фрагментов представлял собой предсказанный *in silico* Т-хелперный эпитоп. Тестирование иммуногенности полученных пептидных конструкций на лабораторных животных показало, что они способны вызывать эффективную продукцию антител не только к самим конструкциям и входящим в их состав фрагментам, но и к целому оболочечному белку Е2 ВГС и гетеродимеру Е1Е2, причём даже в низких дозах (до 200 нг/животное). Пептидные В-Т-эпитопные конструкции в водном растворе образуют олигомеры размером 4–20 нм, что, возможно, способствует проявлению ими высокой иммуногенности. При иммунизации смесью пептидных конструкций титры антител к каждой отдельной конструкции были такими же, как и при иммунизации индивидуальными пептидами, но титры антител против целого белка Е2 и гетеродимера Е1Е2 при этом возрастали.

Полученные против синтетических пептидных конструкций антитела связывали вирусные частицы из плазмы крови больных гепатитом С, причём антитела против смеси конструкций практически не проявляли изолят-специфичности.

Создание пептидных иммуногенных конструкций является перспективным направлением разработки кандидатных вакцин против гепатита С и других возбудителей инфекционных заболеваний, обладающих высокой генетической вариабельностью и генетической изменчивостью.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 07-04-12117-офи и № 10-04-91054_НЦНИ.

ПЕПТИДНЫЙ ФРАГМЕНТ 29-40 АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ МОНОЦИТАРНОГО ХЕМОТАКСИЧЕСКОГО БЕЛКА-1 (MCP-1) СТИМУЛИРУЕТ МИГРАЦИЮ МОНОЦИТОВ

Красникова Т.Л., Кухтина Н.Б., Арефьева Т.И., Соколов В.О., Рулева Н.Ю., Пылаева Е.А., Азьмуко А.А., Сидорова М.В., Беспалова Ж.Д.

Институт экспериментальной кардиологии ФГУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздравсоцразвития РФ, 121552 Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а

E-mail: krasnikova@cardio.ru, tlkrasnikova@gmail.com

Моноцитарный хемотаксический белок-1 (MCP-1) является одним из важнейших хемокинов, стимулирующих миграцию лейкоцитов и обладающих провоспалительным и ангиогенным действием. В связи с этим ингибиторы MCP-1 могут быть эффективны в терапии воспалительных и онкологических заболеваний. Ранее нами был разработан пептидный препарат Инграмон – фрагмент 65-76 С-концевого домена MCP-1 H-Asp-His-Leu-Asp-Lys-Gln-Thr-Gln-Thr-Pro-Lys-Thr-OH, обладающий противовоспалительным действием у пациентов с атеросклерозом, подвергшихся стентированию коронарных артерий. Напротив, при инфаркте миокарда и ишемии периферических органов, когда важной задачей является стимуляция ангиогенеза, агонисты MCP-1, способные стимулировать миграцию моноцитов в зону ишемии, могут являться перспективными препаратами для медицины. Целью настоящей работы явился поиск пептидов – агонистов MCP-1. При компьютерном анализе первичной структуры MCP-1 был выявлен фрагмент 29-40 H-Arg-Arg-Ile-Thr-Ser-Ser-Lys-Cys-Pro-Lys-Glu-Ala-OH, который вызывал миграцию моноцитов *in vitro* так же эффективно, как и MCP-1. Стимулирующее действие пептида на миграцию лейкоцитов было показано *in vivo* у крыс, как при подкожном введении самого пептида, так и при имплантации агарозных «таблеток» с пептидом. В модели ранозаживления у линейных крыс при использовании пептида отмечали более чистое состояние раневой поверхности и её более ровные края по сравнению с контролем. Согласно данным ИФА пептид IX в значительной степени ингибировал связывание MCP-1 с гепарином. По данным ДСН – электрофореза пептид IX в растворе образует гомодимеры и, возможно, олигомеры. Предполагается, что механизм действия пептида IX опосредован взаимодействием олигомеров пептида с гликозаминогликанами на поверхности клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке контракта правительства Москвы № 8/3-280н-10.

НОВЫЙ ПОДХОД К СОЗДАНИЮ УСТОЙЧИВЫХ К ФЕРМЕНТАТИВНОМУ ГИДРОЛИЗУ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Валуева Т.А.[1], Валуев Л.И.[2], Валуев И.Л.[2]

[1]*Учреждение РАН Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,*
119071 Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2
[2]*Учреждение РАН Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН,*
119991 Москва, Ленинский просп., 29

E-mail: valueva@inbi.ras.ru

Природа создала практически непреодолимый барьер для проникновения полипептидов в кровоток при их прохождении через пищеварительную систему, в которой под действием протеолитических ферментов желудка и тонкого кишечника происходит гидролитическое расщепление белков до аминокислот. Вследствие этого для устранения дефицита в организме какого-либо полипептида его в виде раствора обычно вводят инъекционно, минуя пищеварительный тракт.

Эксперименты на модельных системах показали, что при разбавлении растворов полипептидов наблюдается повышение количества нативных форм, диффундирующих через ферментсодержащие мембраны. В опытах на животных показана принципиальная возможность проникновения в кровоток полипептидов при пероральном введении их разбавленных растворов. Так, подкожная инъекция раствора 10 ед. инсулина/кг массы животного приводила к снижению уровня глюкозы в крови на 60–75%. В то же время пероральное введение такого же количества инсулина в 1 мл воды не сопровождалось изменением уровня глюкозы в крови животных. Увеличение количества воды до 3.0, 5.0, 10.0 и 15.0 мл при сохранении дозы вводимого гормона приводило к статистически достоверному снижению уровня глюкозы в крови животных на 15±5, 27±7, 30±4 и 32±8% соответственно. Таким образом, чем меньшей была концентрация полипептида в вводимом растворе, тем более ярким было гипогликемическое действие препарата.

Похожий эффект проникновения в кровоток наблюдали при пероральном введении кроликам раствора глюкагона – полипептида с молекулярной массой примерно 3500 Да, а также более высокомолекулярного полипептида – гормона роста с молекулярной массой 24000 Да.

Предположено, что использование разбавленных растворов полипептидов позволит разработать новую стратегию лечения некоторых заболеваний, в том числе сахарного диабета.

ТЕЗИСЫ СТЕНДОВЫХ ДОКЛАДОВ

Секция 1

Выделение, очистка, характеризация белков и пептидов. Пептидомика. Протеомика

10-ЦИСТЕИНОВЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM KIHARAE*: РОЛЬ В ОТВЕТЕ НА СТРЕСС И ПРОИСХОЖДЕНИЕ

Андреев Я.А.[1], Коростылева Т.В.[2], Одинцова Т.И.[2], Егоров Ц.А.[1], Гришин Е.В.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*
[2]*Учреждение РАН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991 Москва, ул. Губкина, 3*

E-mail: ay@land.ru

Для защиты от патогенов в растениях существует ряд защитных реакций, к которым относится конститутивный или индуцируемый синтез соединений с антимикробными свойствами, в том числе, антимикробных пептидов (АМП). Исследование АМП позволит лучше понять механизмы иммунитета растений при стрессовом воздействии, выделить наиболее перспективные для использования в защите растений соединения, использовать полученные данные для создания сортов сельскохозяйственных культур, устойчивых к фитопатогенным грибам, а также улучшения уже имеющихся сортов.

В семенах пшеницы *Triticum kiharae* были обнаружены два гевеин-подобных АМП WAMP-1a и WAMP-1b, различающихся одним аминокислотным остатком в С-концевой области и содержащих уникальный 10-цистеиновый мотив. Было показано, что WAMP-1a обладает широким спектром антимикробной и антигрибковой активности против как хитин-содержащих, так и не содержащих хитин патогенов растений.

Были определены последовательности кДНК и генов, кодирующих предшественник WAMP-1 и шесть его близких гомологов. Предшественники пептидов состоят из сигнального пептида, зрелого пептида и С-концевого продомена. Гены, кодирующие пептиды WAMP, не содержат интронов. Анализ последовательностей кДНК позволил предположить происхождение генов *wamp* из генов хитиназ. По-видимому, в результате делеции и сдвига рамки считывания был утерян каталитический домен хитиназы, что привело к появлению генов *wamp*.

Биотические и абиотические факторы влияют на экспрессию генов *wamp*. Солевой стресс и взаимодействие с разными патогенными грибами приводит к индукции экспрессии, что предполагает важную роль пептидов WAMP в ответе на стресс. Так, при взаимодействии проростков пшеницы с патогенным грибом *Aspergillus niger* меняется не только уровень, но и профили экспрессии генов *wamp*. Впервые показана экспрессия генов гевеин-подобных АМП в ответ на солевой стресс.

ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ УБИКВИТИНИРОВАННЫХ БЕЛКОВ МИТОХОНДРИЙ МОЗГА МЫШИ В НОРМЕ И ПРИ ВВЕДЕНИИ НЕЙРОТОКСИНА MPTP

Бунеева О.А.[1], Копылов А.Т.[1], Згода В.Г.[1], Неробкова Л.Н.[2], Капица И.Г.[2], Непоклонов А.В.[2], Медведев А.Е.[1]

[1]Учреждение РАМН НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121 Москва, Погодинская ул., 10
[2]Учреждение РАМН НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, Москва

E-mail: olga.buneeva@ibmc.msk.ru

В настоящее время становится все более очевидной роль митохондриальной дисфункции и нарушения деятельности убиквитин-протеасомной системы в развитии болезни Паркинсона. В связи с этим представляет интерес протеомный анализ убиквитинированных белков митохондрий мозга животных с экспериментальным паркинсонизмом.

Введение нейротоксина MPTP (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина) мышам C57BL/6 в дозе 30 мг/кг приводило к развитию характерных двигательных нарушений. Убиквитинированные белки из митохондриальной фракции мозга мышей, извлеченного через 2 часа после инъекции, выделяли с использованием иммуноаффинного сорбента с иммобилизованными на протеин А-сефарозе антителами к убиквитину. Масс-спектрометрический анализ триптических фрагментов элюированных с иммуноаффинной колонки белков осуществляли с помощью обратнофазовой нанопроточной жидкостной хроматографической системы Agilent 1100 и масс-спектрометра Agilent XCT Ultra.

Введение MPTP приводило к увеличению числа белков, специфически связывающихся с иммуноаффинным сорбентом (49 против 34 в контроле), однако количество убиквитинированных белков внутреннего компартмента митохондрий менялось незначительно (7 против 9 в контроле). При этом в митохондриальной фракции животных, получивших инъекцию MPTP, появлялись белки теплового шока и цитоскелета, отсутствовавшие в контроле. Последнее, очевидно, отражает раннюю реакцию митохондрий мозга на введение нейротоксина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 10-04-00530-а).

СУБСТРАТ-СВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА С-КОНЦЕВЫХ МОДУЛЕЙ ЛАМИНАРИНАЗЫ LIC16A *CLOSTRIDIUM THERMOCELLUM*

Дворцов И.А., Лунина Н.А., Великодворская Г.А.

Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН,
123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2

E-mail: dvortsov@img.ras.ru

Гликозилгидролазы часто содержат некаталитические субстрат-связывающие модули (CBM) одного или разных семейств. Наличие комплекса CBM в составе фермента приводит к изменению качественных и количественных характеристик связывания – увеличению константы связывания на 1–2 порядка по сравнению с константами отдельных модулей (синергизм), связыванию с субстратами, к которым у отдельных модулей нет сродства, к мультивалентности связывания (связывание в нескольких сайтах субстрата/модуля одновременно) и т.п.

Исследование мультивалентных свойств CBM проводится нами на примере CBM ламинариназы Lic16A из *Clostridium thermocellum*. Свойства и функции фермента изучались нами ранее. Фермент является мультимодульной гликозилгидролазой, проявляющей наибольшую активность на растворимых субстратах лихенане и ламинарине. Помимо каталитического модуля, лидерного пептида и 3 гомологов протеинов S-слоя клеточной стенки, в его состав входят N-концевой CBM семейства 54, и расположенный на С-конце тандем из четырёх CBM семейства 4.

Модули семейства 4 проявляют сродство к ксилану, глюканам с β-1,3- и смешанными β-1,3-1,4-связями, аморфной, но не кристаллической, целлюлозе. Нами были проклонированы 4 отдельных С-концевых CBM и весь тандем, изучены их субстрат-связывающие свойства. Было получено, что все отдельные CBM проявляют сродство к ксилану (константа связи $K \sim 10^6$ M^{-1}), 1-ый, 2-ой и 3-ий CBM – к кристаллической целлюлозе и β-1,3-глюкану клеточной стенки дрожжей ($K \sim 10^5$ M^{-1}), 3-ий и 4-ый CBM – к Avicel (аморфная целлюлоза) ($K \sim 10^3$ M^{-1}). Кроме того, 3-ий CBM показал сродство к пустулану (субстрат с β-1,6-связями), а 4-ый CBM – к хитозану. 1-ый и 2-ой CBM не связывались с Avicel и пустуланом, а 4-ый CBM – с кристаллической целлюлозой и хитином (отличающимся от хитозана боковыми цепями). Связывание 3-го CBM как с кристаллической, так и с аморфной целлюлозой говорит о присутствии 2 независимых сайтов связывания. Субстрат-связывающие свойства 4-ый CBM проявляет только в виде своего димера, у мономера они отсутствуют. Исследуется синергизм при связывании всего тандема модулей.

Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-00204-а.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ИЗМЕНЕНИЯ БЕЛКОВ-МАРКЕРОВ НЕОСМОТИЧЕСКОГО ДЕПОНИРОВАНИЯ НАТРИЯ У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

Доброхотов И.В.[1], Валеева О.А.[1], Пастушкова Л.Х.[1], Николаев Е.Н.[2], Попов И.А.[2], Кононихин А.С.[2], Иванисенко В.А.[3], Ларина И.М.[1]

[1]Учреждение РАН Государственный научный центр РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, 123007 Москва, Хорошевское ш., 76А
[2]Учреждение РАН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва
[3]Учреждение РАН Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

E-mail: hum.d@narod.ru

В последние годы было показано, что изменение содержания натрия в организме, при определенных условиях может не сопровождаться адекватными изменениями в содержании общей воды тела, что противоречит классической теории водно-солевого обмена. Была выдвинута гипотеза о возможности изменения депо сухого натрия в организме на фоне изменения уровня его потребления или даже без такового. Анализ современного состояния данного вопроса позволил составить список белков-кандидатов, физиологическая роль которых может быть связана с сухим депонированием натрия в организме и которые определяются в моче протеомными методами.

Целью работы была оценка динамики изменения в моче предполагаемых белков-маркеров неосмотического депонирования натрия у 6 здоровых добровольцев во время их жизнедеятельности в изолированном гермообъекте в течение 105 суток. Сбор и подготовка к анализу образцов осуществлялись согласно стандартному протоколу, после чего был проведён хромато-масс-спектрометрический анализ образцов мочи на гибридном масс-спектрометре ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье LTQ FT MS фирмы Thermo, в котором было идентифицировано около 700 белков. Были выявлены белки-маркеры активизации депонирования натрия в соединительной ткани, такие как синдекан IV – 21628,03Da, дерматопонтин – 24559,01Da, Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein – 479247,56Da и ряд других.

Кроме того, с помощью программы ANDCell были построены сети взаимодействий между белками, динамически отвечающими на изменение потребляемого испытателями натрия и основными компонентами соединительной ткани, участвующими в его депонировании. В результате, для исследуемых белков, были обнаружены как прямые связи (белок-белок), так и воссозданы связи через одного посредника (белок-компонент соединительной ткани-белок).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований по проекту № 09-04-12225-офи_м, 2009–2010 гг.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТ-СОДЕРЖАЩИХ ПРОТЕОГЛИКАНОВ КУЛЬТУРЫ МИОБЛАСТОВ L6J1

Ермакова И.И.[1,2], Сакута Г.А.[1], Федорова М.А.[3], Морозов В.И.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт цитологии РАН, С.-Петербург*
[2]*Учреждение РАН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, С.-Петербург*
[3]*Leipzig University, Institute of Bioanalytical Chemistry, Faculty of Chemistry and Mineralogy, Leipzig, Germany*

E-mail: irinabiochem@mail.ru

Регенерация мышечной ткани – сложный процесс, важными этапами которого являются активация, пролиферация, миграция и дифференцировка стволовых клеток скелетных мышц – миобластов. В этот процесс вовлекаются различные регуляторные молекулы, в том числе и протеогликаны (ПГ) – компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ), состоящие из корового белка, связанного с одной или более полисахаридными цепями – гликозаминогликанами (ГАГ). Важными элементами в цепи событий, составляющих миогенез, являются межклеточное узнавание и адгезия миобластов. Цель настоящей работы состояла в выделении и характеристике основных хондроитинсульфат-содержащих ПГ культуры трансформированных миобластов крысы L6J1, а также изучении влияния ПГ на адгезию этих клеток.

Выделение ПГ проводили с помощью анионообменного сорбента Q-сефароза из трех компонентов культуры миобластов L6J1 – культуральной среды, ВКМ и клеток. Элюция сорбированного материала в градиенте NaCl позволила отделить ПГ от основной массы белков, элюируемых при низкой концентрации соли. С помощью ферментов хондроитиназы и гепариназы, специфически расщепляющих цепи ГАГ, было показано, что преобладающим классом ПГ во всех составляющих клеточной культуры являются хондритин/дерматансульфаты. Коровые белки ПГ, выявленные в результате обработки указанными ферментами и последующего электрофореза SDS-PAGE, подвергали масс-спектрометрическому анализу MALDI-TOF. Были идентифицированы следующие хондроитинсульфат-содержащие ПГ: версикан – в ВКМ, бигликан, коллаген XII («part-time» ПГ) и интер-альфа-ингибитор трипсина – в культуральной среде. В опытах по изучению влияния ПГ на клеточную адгезию было показано, что миобласты не прикрепляются и не распластываются на субстрате, состоящем из смеси фибронектина и ПГ ВКМ или ПГ культуральной среды. Предварительная обработка такого субстрата хондроитиназой привела к нормализации адгезии и распластывания миобластов, что указывает на участие цепей ГАГ в подавлении адгезии этих клеток.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЦИТОСКЕЛЕТНОГО БЕЛКА ЗИКСИНА С РЕЦЕПТОРОМ HEDGEHOG КАСКАДА PATCHED 2 В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ ЦНС *XENOPUS LAEVIS*

Мартынова Н.Ю., Ермолина Л.В., Зарайский А.Г.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: m61@hotmai.ru

В результате поиска белковых партнёров цитоскелетного белка зиксин у шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*) при помощи двугибридной дрожжевой системы мы идентифицировали трансмембранный рецептор hedgehog-сигнального каскада – Patched2 (Ptc2). Hedgehog-сигнальный каскад регулирует многие процессы клеточной дифференцировки в эмбриональном развитии. В частности, дифференцировку клеток в зачатке центральной нервной системы (ЦНС). В тоже время, основная функция зиксина – регуляция динамики актинового цитоскелета и морфогенетических движений клеток. Однако в некоторых случаях зиксин может перемещаться в ядро и модулировать экспрессию специфических генов. В связи с этим, изучение взаимодействия зиксина с рецептором сигнального каскада hedgehog важно для понимания координации дифференцировки и морфогенетических движений клеток – двух основных процессов, необходимых для нормального эмбрионального развития ЦНС.

Способность зиксина взаимодействовать с рецептором Ptc2 была подтверждена нами в серии экспериментов по осаждению комплекса гибридных белков и их делеционных мутантов из лизата зародышей шпорцевой лягушки. Было показано, что взаимодействие этих белков обусловлено способностью второго Lim-домена зиксина связываться с фрагментом С-концевого цитоплазматического примембранного участка Ptc2 из шпорцевой лягушки (с 1220 по 1312 а.о). Мы также подтвердили взаимодействие второго Lim-домена гомолога зиксина человека с С-концевой областью человеческого прямого гомолога Ptc2 из шпорцевой лягушки – Ptc1. Полученные данные позволяют предположить наличие эволюционно консервативного молекулярного механизма регуляции зиксином сигнального каскада hedgehog.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российского фонда фундаментальных исследований.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТРАНСКРИПЦИОННОГО РЕГУЛЯТОРА SoxD С ГОМЕОДОМЕННЫМ ФАКТОРОМ XANF1 В РАННЕМ РАЗВИТИИ ПЕРЕДНЕГО МОЗГА У ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ

Мартынова Н.Ю., Ерошкин Ф.М., Зарайский А.Г.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: m61@hotmai.ru

В экспериментах по изучению цис-регуляторных элементов в составе промотора гена *Xanf1*, кодирующего гомеодоменный транскрипционный регулятор развития переднего мозга у шпорцевой лягушки, нами был выявлен потенциальный сайт связывания транскрипционных факторов семейства Sox. С использованием EMSA-метода мы показали, что напрямую связываться с регуляторным элементом промотора может один из представителей семейства Sox-факторов, транскрипционный регулятор SoxD. Гены семейства *SOX* регулируют ранние этапы дифференцировки нервной пластинки и кодируют HMG-доменный белки, которые часто проявляют активность в результате взаимодействия с другими транскрипционными регуляторами. При помощи двугибридной дрожжевой системы мы установили, что фактор SoxD, может физически взаимодействовать с белком Xanf1. Кроме того, в модельной дрожжевой системе SoxD проявлял свойства сильного активатора транскрипции. Взаимодействие транскрипционных регуляторов SoxD и Xanf1 было подтверждено методом ко-иммунопреципитации. Полученные данные позволяют предложить гипотетический механизм, позволяющий избежать эффекта само-репрессирования гена *Xanf1* в переднеголовной области нервной пластинки, где в нормальном развитии наблюдается высокий уровень экспрессии *Xanf1* и *SoxD*. Как было показано ранее, Xanf1, связываясь с регуляторным участком собственного промотора, блокирует экспрессию собственного гена. Однако SoxD, образуя комплекс с белком Xanf1, мог бы выполнять функцию ингибитора подобной само-репрессорной активности белка Xanf1.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ПРОТЕОМНЫЙ СОСТАВ И ФУНКЦИИ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВОЙ ОРГАНЕЛЛЫ PING-BODY, ОБНАРУЖЕННОЙ В ПЕРВИЧНЫХ СПЕРМАТОЦИТАХ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Оленина Л.В., Кибанов М.В., Егорова К.С., Рязанский С.С., Соколова О.А., Котов А.А., Оленкина О.М., Гвоздев В.А.

Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2

E-mail: olenina_ludmila@mail.ru

Эволюционно консервативный механизм piРНК-сайленсинга с участием коротких 25-30 н. piРНК молекул предотвращает экспрессию нежелательных элементов генома, таких как ретротранспозоны и повторяющиеся гены в герминальных тканях эукариот. Белки, отвечающие за его реализацию, сконцентрированы в околоядерных рибонуклеопротеиновых гранулах, образующих особую структуру – *nuage*. С помощью конфокальной микроскопии иммуноокрашенных семенников *Drosophila* мы обнаружили в первичных сперматоцитах наряду с обычными гранулами *nuage* новую более крупную структуру, одну на клетку, названную нами piNG-bogy. Мы показали, что эта структура является основным местом локализации белков piРНК-сайленсинга, Aubergine, AGO3, Vasa, Tudor, Squash, Spindle-E, Cutoff, а также ряда белков микроРНК-сайленсинга, таких как AGO1 и Belle. Размеры piNG-bogy (2,38±0,35 мкм) позволили нам разрешить его внутреннюю структуру и выявить компартментализацию его компонентов. Ключевые белки piРНК-сайленсинга, Aubergine и AGO3, расположены в неперекрывающихся зонах на периферии piNG-bogy и в его центре, соответственно. Мутационный анализ показал, что мутации *aubergine, ago 3* и *vasa* приводили к исчезновению piNG-bogy и гиперэкспрессии тандемных генов *Stellate,* в норме репрессированных с помощью piРНК-сайленсинга. Известно, что функциональность Aubergine и AGO3 зависит от симметричного метилирования остатков аргинина в N-концевых участках этих белков. На фоне мутации гена *dart 5*, кодирующего аргининметилтрансферазу, ответственную за метилирование Aubergine и AGO3, мы наблюдали распад piNG-bogy, сопровождающийся дерепрессией генов *Stellate* и исчезновением piРНК. Мы полагаем, что piNG-bogy является центром piРНК-процессинга в сперматоцитах *D. melanogaster*, а выявленная внутренняя организация способствует быстрому и эффективному образованию пула piРНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и гранта РФФИ № 10-04-00535-а.

ПОЛУЧЕНИЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ И БЕЛКОВЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ ИЗ ГИДРОБИОНТОВ БАРЕНЦЕВА МОРЯ

Рысакова К.С., Лыжов И.И., Новиков В.Ю.

Полярный НИИ морского рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича (ПИНРО), 183038 Мурманск, ул. Книповича, 6

E-mail: rysakova@pinro.ru

Гиалуроновая кислота (ГК) является основным компонентом внеклеточного матрикса, входит в состав многих биологических тканей и жидкостей. В связи с возрастающим интересом к данному полимеру, представляется интересным проведение исследований по содержанию ГК в различных органах и тканях гидробионтов.

В работе использовались различные ткани (глаза, шкуры, хребты) 3 видов рыб: черного палтуса (*Reinhardtius hippoglossoides*), атлантической трески (*Gadus morhua*) и камбалы (*Pleuronectes platessa*).

Исходную ткань обрабатывали 0,2 моль/л раствором NaOH, после нейтрализации 0,1 моль/л уксусной кислотой проводили ферментативный гидролиз белков препаратом, полученным из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtchaticus.* Из полученного гидролизата высокомолекулярные полисахариды осаждали двойным объемом этилового спирта и затем сушили на воздухе.

Содержание ГК в полученных препаратах проводилось методом ВЭЖХ (по выходу глюкозамина) и спектрофотометрическим методом количественного определения гексуроновых кислот (метод Дише). Наибольшее содержание ГК наблюдалось в препаратах, выделенных из хрящевой ткани хребтов.

Предпринята попытка разработки нового метода получения гиалуроновой кислоты из отходов рыбного промысла. Показано, что наибольший выход ГК наблюдался при обработке сырья щелочью, а затем ферментным препаратом. Ранее существовали 2 варианта получения ГК: 3-кратная экстракция гиалуроновой кислоты из измельченных петушиных гребней водно-хлороформенным раствором, и 2-кратная экстракция сырья водным раствором н-пропилового или трет-бутилового спирта с дальнейшим добавлением хлорид натрия до расслоения системы и осаждением из данной системы гиалуроновой кислоты (патент RU 2017751).

Таким образом, ферментативный гидролиз может быть использован для получения белковых гидролизатов и препарата гиалуроновой кислоты. Показано, что источниками выделения ГК могут служить отходы переработки рыб и предложен новый метод выделения гиалуроновой кислоты.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПРОДУКТА ГЕНА 145 НА ЧАСТИЦЕ БАКТЕРИОФАГА phiKZ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Сыкилинда Н.Н., Курочкина Л.П., Кадыков В.А.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: sykilinda@mail.ru

Бактериофаг phiKZ – один из самых больших и сложноустроенных вирусов семейства *Myoviridae*, инфицирует условно патогенные для человека и животных штаммы *Pseudomonas aeruginosa,* устойчивые к широкому спектру антибиотиков. Определение генома бактериофага phiKZ [1] обусловило возросшее внимание к гигантским фагам как со стороны фундаментальной, так и прикладной науки. Поскольку phiKZ-подобные бактериофаги входят в состав фаговых смесей, используемых в терапии псевдомонадных инфекций, требуется тщательное изучение их молекулярно- биологических свойств.

Геном бактериофага phiKZ составляет 280334 п.н. и содержит 306 открытых рамок считывания. На основании гомологии с генами других организмов идентифицировано лишь 59 фаговых белков. Из 38 структурных белков идентифицированы: продукт гена (пг) 120 (основной белок капсида), пг29 (хвостовой чехольный белок), пг30 (белок хвостового стержня), пг144 (литическая трансгликозилаза) и пг181 (пептидогликан гидролаза).

Целью данной работы явилась локализация одного из мажорных структурных белков вирусной частицы – пг145 (84 кДа). На основании сравнительного анализа белков интактного фага и термочувствительного мутанта phiKZ, продуцирующего капсид, установлено, что пг145 является белком капсида. Нами был сконструирован плазмидный вектор для экспрессии гена 145 в клетках *E.coli* и отработаны условия для получения его продукта в растворимой форме. Разработан метод очистки рекомбинантного белка. Получены поликлональные антитела на пг145. На препарате очищенного бактериофага phiKZ с использованием полученных антител проведена иммуноэлектронная микроскопия. Установлено, что пг145 локализован в вершинах капсида. С помощью иммуноблоттинга показано также, что ряд phiKZ-подобных фагов содержит структурный белок, гомологичный пг145.

Литература

1. Mesyanzhinov, V.V., Robben, J., Grymonprez, B., Kostyuchenko, V.A., Bourkaltseva, M.V., Sykilinda, N.N., Krylov, V.V., Volckaert, G. (2002) The genome of bacteriophage φKZ of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol*. 317, 1–19.

ПОИСК БЕЛКОВ-ПАРТНЁРОВ МАЛОЙ ГТФазы НОВОГО СЕМЕЙСТВА RAS-DVA

Терёшина М.Б., Мартынова Н.Ю., Зарайский А.Г.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: ma-treshka@yandex.ru

Недавно нами была описана новая группа малых ГТФаз, Ras-dva. Исследования роли малой ГТФазы Ras-dva-1 в процессе эмбрионального развития зародышей позвоночных на модели эмбрионов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* показали, что её нормальное функционирование необходимо на начальных этапах формирования и развития головного мозга, органов чувств и производных нервного гребня (жаберных дуг). В настоящей работе для выяснения молекулярных функций Ras-dva-1 мы провели поиск белков-партнёров этой малой ГТФазы с помощью дрожжевой двугибридной системы в экспрессионной кДНК библиотеке эмбрионов шпорцевой лягушки на стадии ранней нейрулы (ст.12,5-14).

Среди идентифицированных в результате проведенного скрининга 52-х клонов одним из наиболее представленных оказался клон, содержащий кДНК легкой цепи клатрина – белка, участвующего в процессе сборки т.н. «клатриновой оболочки» на формирующихся эндоцитозных везикулах. Кроме того, данный белок регулирует взаимодействия между везикулами и элементами цитоскелета (актиновыми филаментами). Дальнейшие эксперименты по перекрестной смене векторов с последующей ко-трансфекцией в дрожжи и ко-иммунопреципитации в зародышах шпорцевой лягушки подтвердили взаимодействие между Ras-dva-1 и легкой цепью клатрина. Реальность такого взаимодействия в эмбриогенезе была также подтверждена результатами анализа экспрессии гена легкой цепи клатрина в целых эмбрионах шпорцевой лягушки, которые выявили повышенную концентрацию транскриптов этого гена в клетках тех же областей, где наблюдается экспрессия гена малой ГТФазы Ras-dva. Результаты настоящей работы хорошо согласуются с ранее полученными данными о примембранной локализации белка Ras-dva-1 и специфической экспрессии его гена в клетках различных органов эмбрионов шпорцевой лягушки, обладающих повышенной эндо/экзоцитозной активностью. Таким образом, логично предположить, что в клетке малая ГТФаза Ras-dva-1 вовлечена в регуляцию процессов везикулярного переноса (эндо/экзоцитоза).

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и РФФИ.

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ПРОТЕОМА КРОВИ ЗДОРОВОГО ЧЕЛОВЕКА

Трифонова О.П.[1], Пахарукова Н.А.[1], Пастушкова Л.Х.[1], Мошковский С.А.[2], Лисица А.В.[2], Ларина И.М.[1]

[1]Учреждение РАН ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, 123007 Москва, Хорошевское ш., 76А
[2]Учреждение РАМН НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121 Москва, ул. Погодинская, 10

E-mail: oxana.trifonova@gmail.com

Одной из главных задач диагностической протеомики является сравнительный анализ биологических жидкостей здоровых людей и пациентов различных нозологических групп с целью поиска новых высокоспецифичных биомаркеров. Однако медицинское применение результатов протеомного анализа осложняется как значительными популяционными различиями, так и ограничениями существующих технологических платформ. Задачей данного исследования было оценить пределы изменчивости протеома крови в группе здоровых добровольцев, признанных здоровыми в результате углубленного медицинского освидетельствования.

Образцы плазмы и сыворотки крови анализировались: (1) методом двумерного электрофореза (2-DE) после удаления мажорных белков и концентрирования минорных с помощью микрогранул ProteoMinerTM (Bio-Rad) и (2) методом прямого масс-спектрометрического (МС) профилирования после префракционирования на магнитных частицах MB WCX с помощью робота ClinProt (Bruker Daltonics).

Обнаружено, что протеом сыворотки и плазмы крови здоровых лиц характеризуется значительной как внутри-, так и межиндивидуальной вариабельностью. Причем межиндивидуальные различия значительно превысили внутрииндивидуальные изменения уровня содержания белков крови с течением времени. Большой разброс среди изученной группы здоровых мужчин имели следующие белки – фибриноген α- и β-цепи, тромбоцитарный фактор IV, β2-микроглобулин, цистатин С, аполипопротеины A-I, A-IV, E и C-I, фрагменты фактора C3 и C4 комплемента и другие. Среди этих белков – аполипопротеины A-I, E и C-I и цистатин С отличались и наибольшей индивидуальной изменчивостью во времени. Для некоторых белков было характерно увеличение дисперсии с возрастом. Данные результаты позволяют предположить, что эти белки не могут рассматриваться в качестве очевидных биомаркеров и должны быть тщательно исследованы в последующих более масштабных работах.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы ОБН РАН.

Секция 2

Химия белков и пептидов. Методы синтеза, химическая модификация

УДОБНЫЙ И ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД ВВЕДЕНИЯ N^{IND}-ФОРМИЛЬНОЙ ЗАЩИТНОЙ ГРУППЫ В МОЛЕКУЛУ ТРИПТОФАНА И НОВАЯ ПОБОЧНАЯ РЕАКЦИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ H-Trp(N^{IND}-For)-OH В ТВЁРДОФАЗНОМ ПЕПТИДНОМ СИНТЕЗЕ

Азев В.Н., Чулин А.Н., Мустаева Л.Г., Горбунова Е.Ю., Родионов И.Л.

Филиал Учреждения РАН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Московская обл.

E-mail: viatcheslav.azev@fibkh.serpukhov.su

Триптофан, защищённый N^{ind}-формильной группой, нашёл широкое применение в химическом синтезе пептидов. Классический способ введения этой защитной группы в индольное кольцо имеет недостаток в необходимости наличия специального оборудования для насыщения реакционной смеси сухим газообразным хлористым водородом. Мы осуществили формилирование триптофана муравьиной кислотой в присутствиии бромистого водорода, генерируемого *in situ* из муравьиной кислоты и трибромида фосфора или бромтриметилсилана. Предложенный метод отличается удобством осуществления процесса и высоким выходом продуктов. Данный подход распространен на ряд 3-алкилиндолов.

Известно, что лабильность N^{ind}-формильной защитной группы по отношению к нуклеофилам проявляется в виде побочной реакции формилирования свободной аминогруппы лизина. Мы обнаружили, что растущая цепь пептидилполимера может быть подвержена терминированию формильной группой из остатка Trp(N^{ind}-For), находящегося на полимере. Нами предложены условия проведения процесса наращивания цепи пептидилполимера, которые позволили свести к минимуму появление продуктов терминирования.

ПЕПТИД m 879 – ИНГИБИТОР ИНТЕГРАЗЫ ИЗ HIV-I

Елякова Л.А., Васьковский Б.В., Ванцева С.И., Гаранин С.К.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: svetvan@yandex.ru

Предварительная работа по установлению структур пептидов-ингибиторов: m 673, YPIEMeHis [1] (I ревертазы, IC50 10^{-7}M); m 683, DLHSerHAQ [2] и m 727, YAGFLR [3] (I интегразы, IC50 $3x10^{-5}$M и 10^{-4M}, соответственно) – показала, что в состав проявивших активность (ИА) по отношению к интегразе из HIV-I входило ещё вещество m 879. Сиквенс (6 шагов) дал последовательность Ser-Asp-Ser-Arg-Val-Gly. УФ-спектр пептида показал наличие в нём Phe; тогда недостающей АК должна быть m 113 (Leu, Ileu). Далее (при отсутствии наиболее активного пептида m 673 [1]) в «слепом» опыте было показано, что при 40-кратном разбавлении сохранили ИА лишь образцы, в которых присутствовала m 879 (IC50 $8x10^{-6}$ M). Масс-фрагментация дала массы 879→439,486,544,574,586,600,615,643,714,732,756,861. Эти масс-фрагменты дают структуру:

SER – ASP – SER – ARG – VAL – GLY – LEU – PHE
87 114 87 156 99 57 113 147

Вероятно, m 439 представляет собой двухзарядный ион от m 879. Фрагменты b8,b7, b6, b5,b4 имеют массы m 861,714,601,544 и 445, из чего собирается частичная последовательность …Phe-Leu-Gly-Val... Интересно, что из остальных данных, где аминокислоты находятся в ацетатной форме (m+42), m 756,643,586 и 487 – снова собирается часть последовательности с С-конца …VAL-GLY-LEU-… Для фрагмента ARG-VAL-GLY-LEU-PHE, наряду с нормальной формой (m 573), была получена и его ацетатная форма (m 615).

Литература

1. Елякова Л.А., Васьковский Б.В., Бочаров Э.В., Туницкая В.Л., Кочетков С.Н., Еляков Г.Б. Патент РФ № 2314818. Опубл. 20.01.2008. Бюлл. № 2.
2. Елякова Л.А., Васьковский Б.В., Хорошилова Н.И., Ванцева С.И., Агапкина Ю.Ю. *Биоорган. химия* (2011) 37(2), 233–243.
3. Елякова Л.А., Васьковский Б.В., Ванцева С.И., Гаранин С.К. *Химия природ. соедин.* (2011), в печати.

ПОДХОДЫ К СИНТЕЗУ КОНЪЮГАТОВ АРГИНИНСОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДОВ С ГЕМИНОМ И ИХ АНТИГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ

Желтухина Г.А.[1], Окороченков С.А.[1], Арзуманян В.Г.[2], Небольсин В.Е.[3]

[1]Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, 119571 Москва, просп. Вернадского, 86
[2]НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 105064 Москва, Малый Казенный пер., 5а
[3]ООО «Фарминтерпрайсез», 119571 Москва, просп. Вернадского, 86

E-mail: laboratory211@yandex.ru

В связи с развитием резистентности грибов к уже существующим антибиотикам и антигрибковым средствам, а также недостаточной эффективностью и токсичностью последних проводится поиск новых антигрибковых агентов среди различных классов соединений, в том числе пептидов.

Целью данной работы явилось создание антигрибковых агентов на основе конъюгатов природных соединений: гемина, пептидов и их аналогов, выявление их биологической активности, исследование взаимосвязи между структурой и активностью в ряду полученных соединений.

В ряду синтезированных конъюгатов гемина (КГ) наиболее высокую активность в отношении дрожжеподобных грибов *C. albicans* проявил дизамещенный разветвленный КГ, содержащий 4 остатка эфира аргинина. Производные монозамещенного гемина, содержащего линейные три – гексапептиды с одним – тремя остатками аргинина, активности не проявили (RGD, combi-1). Конъюгат гемина с гексапептидом combi-1 был успешно синтезирован твердофазным методом по Fmoc-стратегии на полимере с тритилхлоридной якорной группой с использованием незащищенного по гуанидину производного аргинина. Пептид RGD и соответствующий КГ HemRGD получены нами по оригинальным схемам в растворе с высокими выходами с применением Z3ArgOH, метода смешанных ангидридов и силилирования. Показано, что синтез Hem(Glu(ArgOMe)ArgOMe)$_2$ путем ступенчатого присоединения отдельных аминокислот к активированному эфиру гемина является более эффективным по сравнению с присоединением пептида Glu(ArgOMe)ArgOMe.

Таким образом, разветвленная структура, присутствие заместителей по двум пропионовокислым остаткам гемина, наличие нескольких положительно заряженных остатков аргинина способствуют проявлению антигрибковой активности.

N-АЦИЛИРОВАННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ИНСУЛИНА И ЕГО ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ АНАЛОГОВ

Зинченко А.А., Мелихова Т.Д., Гордеева Е.А., Нокель Е.А., Красильщикова М.С., Михалев А.В., Зиганшин Р.Х., Шибанова Е.Д.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ГСП-7, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: alezin@ibch.ru

Перспективным путем повышения эффективности терапевтических белков вообще и противодиабетических пептидных препаратов, в частности, является химическая модификация белковых молекул, позволяющая получать соединения с новыми физиологическими свойствами. Целью настоящей работы было изучение условий синтеза N-ацилированных 3-(4-карбоксибутил)-1,2-дитиоланом три-замещенных производных инсулина человека и его генно-инженерных аналогов, инсулинов лизпро и аспарт, доказательство структуры и исследование некоторых свойств полученных соединений. В качестве ацилирующего агента использовали активированный оксисукцинимидный эфир α-липоевой кислоты. Реакции проводили в различных средах, варьируя концентрации и соотношения компонентов, температуру, pH и время реакции. Течение реакций контролировали ОФ ВЭЖХ. Хроматографическую очистку N-ацилированных инсулинов осуществляли в две стадии, с использованием ионообменной хроматографии низкого давления и обращеннофазовой ВЭЖХ. Структуру полученных соединений доказывали масс-спектрометрическим анализом, пептидным картированием и титрованием свободных аминогрупп. Стабильность полученных соединений в условиях протеолиза исследовали в растворах с физиологическими концентрациями трипсина, химотрипсина и пепсина, контроль гидролиза осуществляли методом ОФ ВЭЖХ по убыванию исходных соединений. Биологическую активность N-ацилированных инсулинов определяли по снижению концентрации глюкозы в крови нормальных мышей после подкожного введения растворов соответствующих препаратов, концентрацию глюкозы в плазме крови определяли глюкозооксидазным методом.

В результате проведенных исследований разработаны способы получения три-$N^{\alpha A1}$,$N^{\alpha B1}$,$N^{\varepsilon B29}$-липоилзамещенных производных инсулина человека, инсулина аспарт и инсулина лизпро с хроматографической (ОФ ВЭЖХ) чистотой (93±3)%. Показано, что полученные соединения проявляют повышенную, в сравнении с исходными инсулинами, устойчивость к протеолизу, обладают высокой гипогликемической активностью и увеличенной длительностью гипогликемического действия.

СИНТЕЗ ГК-2 – ДИПЕПТИДНОГО ДИМЕРНОГО МИМЕТИКА ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ

Курилов Д.В., Помогайбо С.В., Гудашева Т.А.

Учреждение РАМН НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН,
125315 Москва, ул. Балтийская, 8

E-mail: kur-dv@mail.ru

В НИИ фармакологии РАМН сконструирована и синтезирована группа дипептидных димерных миметиков фактора роста нервов (NGF), для которых *in vitro* на клеточных моделях была показана нейропротективная активность [1].

Из этой группы для развития в качестве лекарственного препарата был отобран дипептидный димерный миметик β-изгиба 4-ой петли NGF, гексаметилендиамид бис-(моносукцинил-глутамил-лизина) [(HOOC-$(CH2)_2$-CO-Glu-Lys-NH-$(CH2)_3$-$]_2$, получивший шифр ГК-2. В связи с этим возникла необходимость разработать оптимальный синтетический подход к получению ГК-2, который должен лечь в основу лабораторного регламента. Были реализованы две схемы синтеза. В обеих схемах применён метод активированных оксисукцинимидных эфиров в растворе. В схеме **I** использовали стратегию Z(Bzl)-защиты боковых радикалов и наращивание пептидной цепи проводили с N-конца. При этом сукцинильный остаток вводили на первой стадии с помощью оксисукцинимидного эфира монозащищенной янтарной кислоты, а гексаметиленовый спейсер присоединяли на последних стадиях синтеза. В схеме **II** использовали стратегию Z/Boc-защитных групп и наращивание пептидной цепи проводили с С-конца. В этом случае гексаметиленовый спейсер вводили на первой стадии, а сукцинильный остаток – на финальных стадиях синтеза посредством ацилирования гексаметилендиамида бис-дипептида янтарным ангидридом. Удаление защитных групп осуществляли классическими способами. Для очистки целевого продукта применяли ВЭЖХ и ионообменную хроматографию. В обеих схемах синтеза диастереомерная чистота ГК-2 была не менее 98% (по данным ^{1H} ЯМР-спектроскопии), и наблюдались совпадающие величины удельных углов оптического вращения.

На основании данных по выходам, временным затратам и стоимости реагентов для синтеза пептида ГК-2 в качестве оптимальной выбрана схема **II**.

Литература

1. Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б. *Докл. Акад. Наук* (2010) 434(4), 549–552.

ИНГИБИТОРЫ КАСПАЗ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПЕПТИДОМЕТИЛКЕТОНОВ

Мартинович В.П.[1], Грибовская О.В.[1], Голубович В.П.[1], Бурая Т.А.[1], Янченко В.В.[2]

[1]*Институт биоорганической химии НАН Беларуси,*
220141 Минск, ул. Акад. Купревича, 5/2, Беларусь
[2]*Витебский государственный медицинский университет,*
210602 Витебск, ул. Фрунзе, 27, Беларусь

E-mail: vermar@iboch.bas-net.by

Регуляция активности каспаз – цистеиновых протеиназ, главных исполнителей апоптоза, с использованием синтетических ингибиторов представляется перспективным путем создания препаратов для лечения различных сосудистых, нейродегенеративных и других видов расстройств, сопровождающихся клеточной гибелью. Среди синтезированных к настоящему времени ингибиторов особый интерес вызывают производные пептидокетонов, которые способны ацилировать активный центр каспаз, образованный каталитической диадой (остатки His237 и Cys285), проявляя свойства обратимых ингибиторов.

Целью настоящего исследования являлось создание новых ингибиторов каспаз, относящихся к пептидометилкетонам с ацильными заместителями в кетометильной группе. В качестве базовой пептидной структуры был выбран дипептидный фрагмент валил-аспарагинил, основная часть субстратной последовательности (P2-P_1) каспазы-3, с *N*-карбобензоксизащитой по α-аминогруппе. Полупродуктом при синтезе кетопроизводных служил бромметилпептидокетон Z-Val-Asp(Me)-CH2Br, который был получен из соответствующего диазокетона; для замены N2 на Br использовали раствор HBr в уксусной кислоте. Ацилированные производные метилкетонов получалали по методу Крантца [1], в котором катализатором для замещения брома на ацильный остаток служит KF. Структура соединений общей формулы Z-Val-Asp(Me)-CH2Ac, где Ac – остатки ароматических и алифатических кислот, была подтверждена методами масс-спектрометрии и ЯМР-спектрометрии.

Влияние синтезированных соединений на выживаемость клеток исследовали на модели апоптоза лейкоцитов. Наряду с ингибированием апоптоза были отмечены парадоксальные эффекты его индукции, возможные причины этого явления обсуждаются.

Работа была выполнена при поддержке гранта БРФФИ №Х09-044.

Литература

1. Krantz A., Copp J.L., Coles J.P. *Biochemistry* (1991) 30, 4678–4687.

ПОБОЧНЫЕ РЕАКЦИИ В ХОДЕ СИНТЕЗА АПЕЛИНА-12 И ЕГО АНАЛОГОВ И ПУТИ ИХ ПРЕОДОЛЕНИЯ

Палькеева М.Е., Сидорова М.В., Азьмуко А.А., Молокоедов А.С., Бушуев В.Н., Беспалова Ж.Д.

Институт экспериментальной кардиологии ФГУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздравсоцразвития РФ, 121552 Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

E-mail: peptide1@cardio.ru

В настоящее время твердофазный синтез (ТФС) 20–25-членных пептидов представляется рутинной задачей, и побочные реакции на стадии заключительного деблокирования и отщепления от носителя пептидов являются обычным и хорошо описанным феноменом. Образующиеся при действии TFA карбокатионы алкилируют такие чувствительные аминокислотные остатки как Trp, Cys, Tyr, Met, происходит также ацидолитическое окисление Met до соответствующего сульфоксида; некоторые побочные реакции обусловлены алкилированием чувствительных аминокислот продуктами разрушения якорных групп полимера Ванга или амидного полимера Ринка. Часто подобные побочные реакции драматически отражаются на качестве продукта ТФС и существенно осложняют его очистку. Поэтому в каждом конкретном случае зачастую приходится проводить специальное исследование с целью минимизации образования нежелательных побочных продуктов. При синтезе вазоактивных додекапептидов – апелина-12 H-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe-OH и четырех его протеолитически устойчивых аналогов мы столкнулись с побочными реакциями при действии TFA. Пептиды получали с использованием Fmoc-технологии, очищали с помощью ВЭЖХ, структуру подтверждали данными ^{1}H-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Нами было установлено, что в процессе заключительного деблокирования апелина-12 и его аналогов происходит сульфатирование гидроксильной группы остатка Ser с образованием соответствующего сложного эфира. При этом донором сульфогруппы служит сульфо-фрагмент отщепляющихся Pmc-защит остатков Arg. Количество побочного продукта зависит от наличия воды в составе деблокирующей смеси. Кроме того, при синтезе амидов апелина заключительное отщепление защит сопровождается образованием побочного 4-гидроксибензиламида соответствующего пептида, содержание которого в реакционной смеси колеблется от 20 до 8% (по ВЭЖХ) и также зависит от состава деблокирующей смеси. Обсуждаются пути подавления побочных реакций сульфатирования серина и алкилирования *C*-концевой амидной функции пептида

ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ ДЭЦ С АЛЬБУМИНОМ ЧЕЛОВЕКА, НО НЕ С АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНОМ И АЛЬБУМИНАМИ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Панова И.Г.[1], Татиколов А.С.[2]

[1]*Учреждение РАН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26*
[2]*Учреждение РАН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334 Москва, ул. Косыгина, 4*

E-mail: pinag@mail.ru

Для исследования белковых компонентов внеклеточного матрикса нами был разработан спектрально-флуоресцентный зонд ДЭЦ на основе полиметинового (цианинового) красителя. Характерным свойством этого зонда является способность распознавать молекулы коллагенов и сывороточного альбумина человека. Образование комплекса красителя с альбумином вызывает появление длинноволновой полосы поглощения (~612 нм) и резкий рост флуоресценции, а в присутствии коллагенов краситель образует на них наноструктуры J-агрегатов, обладающие длинноволновой полосой поглощения (640–650 нм) и флуоресценцией. Этот зонд оказался эффективным для исследования жидких сред организма, например, сыворотки крови и жидких сред глаза, таких как стекловидное тело и жидкость передней камеры. В настоящей работе с применением красителя ДЭЦ было проведено исследование стекловидного тела у плодов и взрослого человека, новорожденных и взрослых крыс, быков, эмбрионов кур и взрослых травяных лягушек. Показано, что краситель ДЭЦ выявляет сывороточный альбумин только в стекловидном теле человека. При этом с альфа-фетопротеином, который присутствует в стекловидном теле плодов человека, данный зонд не взаимодействует, также как и с альбуминами других представителей позвоночных животных. Способность красителя ДЭЦ взаимодействовать с разными типами коллагенов позволила установить, что в стекловидном теле травяной лягушки основным является коллаген типа I, в отличие от млекопитающих, где основным коллагеном стекловидного тела является коллаген типа II. Таким образом, данный зонд позволяет эффективно использовать его как для диагностических, так и для научно-исследовательских целей.

Авторы выражают благодарность Р.А. Полтавцевой за помощь в работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 09-04-01054-а; № 10-03-00647-а).

МУЛЬТИПЛЕТНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ В ОБРАЗОВАНИИ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ И КОМПЛЕКСНЫХ ЛИГАНДОВ

Скляров Л.Ю.[1], Козин С.А.[2], Градюшко А.Т.[3], Вагида М.С.[3], Казанский Д.Б.[3]

[1]ГНЦ Институт иммунологии МЗ РФ, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24-2
[2]Учреждение РАМН НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Москва
[3]НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

E-mail: lsklyarov@immune.umos.ru

Основой (кором) мультиплетных пептидов служат трифункциональные аминокислоты, кором белков являются гетероциклы – порфирины, 3-гидроксипиридины, имидазолоны и др. Был предпринят синтез для получения аналогов порфринов, исходя из аддуктов производных аминокислот и пептидов с ненасыщенными дикарбоновыми кислотами. При этом наблюдался ряд неизвестных ранее процессов, например, присоединение к пиридиновым ядрам воды, аммиака и возможный распад аддуктов (в случае производных этиленовых и ацетиленовых кислот) с превращением пиридинового ядра в пиррольное и гидролиз ядра пептидилпиридинов. Образование хинониминовых производных порфирина, возможно связано с каталитическими свойствами получаемых соединений. Боковые функциональные группы в порфиринах служат источником связей для образования из них дендримеров и супрамолекулярных структур не только за счет ковалентных и водородных связей, но и за счет сильных металлохелатных и иминохингидронных связей. Структурирование за счет гидрофобных связей наблюдалось у мультиплетных пептидов содержащих остатки жирных кислот и алкилированных производных порфирина (ковалентные липосомы). Агрегация пептидов, содержащих боковые металлохелатные группы (пиридоксина и порфирина), наблюдалась при добавлении солей металлов (в том числе и цинка). На основе пептидов, способных хелатировать цинк, был получен ряд ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента – возможно, эти препараты также связываются с участками белков, содержащих цинк. Это важно при изучении болезни Альцгеймера и биохимических процессов, связанных с металлами. Уникальные спектральные характеристики (поглощение и флуоресценция в красной области спектра) могут быть использованы в фотодинамическом лечении рака. Присоединение природных хромофоров (хлорина, фолиевой кислоты) к мультиплетному пептиду, содержащему последовательность RGDS и Form-MPL, позволило получить комплексный клеточный лиганд. Широкий спектр флуоресценции мультиплетных производных порфирина (400–900 nm) позволил наблюдать связывание этих соединений с клеточными линиями методом проточной цитофлуориметрии с различными источниками возбуждения.

ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД СИНТЕЗА β-ФЛУОРЕНИЛМЕТИЛОВОГО ЭФИРА АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ

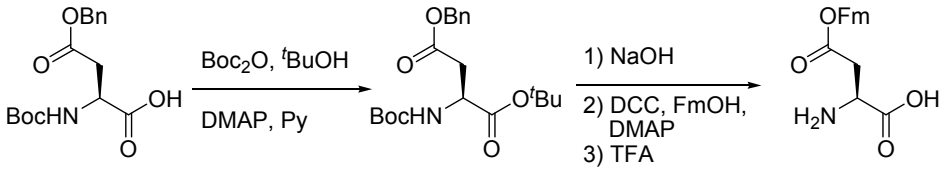
Чулин А.Н., Азев В.Н., Мустаева, Л.Г., Родионов И.Л.

Филиал Учреждения РАН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Московская обл.

E-mail: pepsylab@fibkh.serpukhov.su

Использование достаточно редкого соединения Fmoc-Asp(OFm)-OH в синтезе пептидов, которые содержат аспарагиновуюю кислоту на N-конце цепи, имеет рядпреимуществв над производнымиаспарагиновойй кислоты с защитными группами бензильного или трет-бутильного типа. В частности, защитные группы на основе флуоренилметанола предпочтительныы при синтезе пептидов имеющих в своей последовательности труднодоступные неприродные аминокислоты, содержащие замещённые индолы (например, 5-йодтриптофан) и другие электронодонорные гетероциклические системы (например, тиенилаланин). В этом случае исключаются побочные реакции, имеющие место быть при снятии Bn, Cbz, ^{t}Bu, Boc защитных групп: гидрогенолиз или алкилирование гетероциклической системы.

Ключевым производным в синтезе Fmoc-Asp(OFm)-OH является H-Asp(OFm)-OH. Последнее соединение может быть получено с помощью прямой β-селективной этерификации аспарагиновой кислоты флуоренилметанолом. Мы обнаружили, что этот метод имеет ряд недостатков при масштабировании. Нами предложен альтернативный четырёхстадийный способ получения H-Asp(OFm)-OH исходя из Boc-Asp(OBzl)-OH. Суммарный выход продукта (*ca.* 70%) гораздо выше опубликованного выхода по одностадийному способу (*ca.* 40%).



СИНТЕЗ АНАЛОГОВ ЛЮЛИБЕРИНА И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СИСТЕМАХ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ГЕНОВ

Яблокова Т.В.[1], Челушкин П.С.[1], Дорош М.Ю.[1], Орлов С.В.[2], Ефремов А.М.[2], Буров С.В.[1]

[1]Учреждение РАН Институт высокомолекулярных соединений РАН, 199004 С.-Петербург, В.О., Большой пр., 31
[2]Учреждение РАМН НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, С.-Петербург

E-mail: burov@hq.macro.ru

Адресная доставка генов в клетки-мишени является важнейшей проблемой, от решения которой зависит эффективность используемых методов генотерапии. При разработке систем доставки «суицидных» генов в опухолевые клетки особенный интерес представляет применение в качестве носителей аналогов люлиберина. В этом случае терапевтический эффект может быть усилен благодаря наличию специфических рецепторов на поверхности злокачественных клеток и собственной противоопухолевой активности пептидного носителя.

Поскольку классические аналоги люлиберина (GnRH) не способны образовывать комплексы с ДНК, нами разработаны методы синтеза гибридных соединений, содержащих последовательность ядерной локализации (NLS) вируса SV40. Наличие NLS обеспечивает эффективное связывание ДНК и направленную доставку комплекса в ядро клетки, не влияя на способность пептидного носителя избирательно связываться с рецепторами GnRH. Синтез пептидов проводили твердофазным методом при использовании стратегии ортогональной защиты или фрагментной конденсации. Второй подход имеет определенные преимущества при получении различных по структуре пептидных носителей, поскольку позволяет независимо варьировать последовательность аналога, обеспечивающего взаимодействие с рецептором, и ДНК-связывающего домена. Нами исследованы различные варианты синтеза с применением защищенных или деблокированных фрагментов. Для селективной конъюгации пептидов, содержащих незащищенные остатки лизина, использовали реакцию гидразида NLS с аналогом [D-Lys6]-GnRH, модифицированным пировиноградной кислотой. Исследование с помощью ОФ ВЭЖХ показывает, что образующийся гидразон устойчив в водном растворе при pH>4.

Синтезированные аналоги люлиберина использованы в качестве носителей для адресной доставки «суицидного» гена тимидинкиназы вируса простого герпеса в клетки гепатокарциномы человека HepG2. При этом в ряде случаев удается добиться полного уничтожения опухолевых клеток, что свидетельствует о перспективности предложенного подхода.

Секция 3

Биотехнология (конструирование и получение рекомбинантных белков и пептидов)

КОНСТРУИРОВАНИЕ ФНО-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ ДОМЕНА ФИБРОНЕКТИНА МЕТОДОМ ПЕРЕСАДКИ CDR

Крюкова Е.А.[1], Петровская Л.Е.[1], Шингарова Л.Н.[1], Болдырева Е.Ф.[1], Якимов С.А.[1], Гурьянова С.В.[1], Долгих Д.А.[1], Кирпичников М.П.[1,2]

[1]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
[2]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

E-mail: kelen@fromru.com

Фактор некроза опухолей (ФНО) играет ключевую роль в патогенезе различных заболеваний. Использование связывающих белков для снижения повышенной концентрации ФНО в организме человека представляет собой эффективный подход к их лечению. С целью изучения возможности конструирования ФНО-связывающих белков методом пересадки CDR проведена замена петель 10 домена фибронектина человека III типа (^{10}Fn3) аминокислотными последовательностями CDR легкой и тяжелой цепей нейтрализующего ФНО антитела F10. Соответствующие белки FNL и FNH наработаны в клетках *E. coli* и очищены при помощи металлоаффинной хроматографии. С целью изучения вклада отдельных петель в связывание антигена получены варианты, содержащие замены одного из CDR последовательностями петель домена фибронектина дикого типа.

Исследование ФНО-связывающих свойств полученных белков при помощи ELISA показало, что наиболее высокой активностью обладает вариант Hd3, содержащий CDR-H1 и CDR-H2. Сконструированные нами белки на основе домена фибронектина специфически связывают ФНО в Вестерн-блоте, а также ослабляют его цитотоксическое действие на линию клеток L929. Наиболее высокую нейтрализующую активность демонстрируют белки Hd2 и Hd3, вызывающие, соответственно, 10- и 50-кратное повышение эффективной концентрации ФНО, необходимой для 50%-ной гибели клеток.

Работа проводится при финансовой поддержке гранта НШ-5207.2010.4, программы РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.

СОЗДАНИЕ ПАНЕЛИ ТИРОЗИНОВЫХ КИНАЗ ДЛЯ ПОИСКА И ИЗУЧЕНИЯ НОВЫХ ХИМИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ

Липкин А.В.[1], Ракитина Т.В.[1,2], Юдкина О.В.[1], Осипов Е. М.[3], Чилов Г.Г.[4]

[1]НИЦ «Курчатовский институт», 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 1
[2]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
[3]Учреждение РАН Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва, Ленинский просп., 33, стр.2
[4]ООО «Молекулярные технологии», 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.75А

E-mail: lipus57@yahoo.com

Классический подход к созданию таргетных (направленных на определённую белковую мишень) лекарственных препаратов основан на выборе биологически активных молекул из многомиллионных коллекций химических соединений. Использование методов биоинформатики и молекулярного моделирования может существенно сократить размер коллекций, используемых для скрининга, а следовательно, время и затраты на поиск ингибиторов. В то же время задача получения белков-мишеней в количестве и с качеством, позволяющими отбирать химические соединения, способные связаться с заданными белками и воздействовать на интересующую исследователя активность не теряет свою актуальность.

С целью поиска низкомолекулярных ингибиторов тирозиновых киназ (ТК) были отобраны и экспрессированы в бакуловирусной системе шестнадцать генов, кодирующих терапевтически важные ТК. Рекомбинантные белки, содержащие на N-конце шесть остатков гистидина, были выделены с помощью аффинной хроматографии, и после определения их активности с помощью люциферазного тирозинкиназного теста использованы для проведения скрининга коллекции химических соединений. Были найдены соединения активные в отношении одной или нескольких киназных мишеней и определены их коэффициенты ингибирования. Для ряда соединений был проведён молекулярный докинг и предложен механизм взаимодействия с активными центрами ТК. В результате, было установлено, что производные катехола являются новым типом химических ингибиторов тирозиновых киназ, а также обнаружено, что ТК наряду с рядом белков других классов являются мишенями для воздействия экологических загрязнителей группы фенантренхинонов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (Госконтракт № 02.512.12.2051).

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГИРУДИНА В РАСТЕНИЯХ РЯСКИ МАЛОЙ (*LEMNA MINOR*)

Таранов А.И.[1,2], Фирсов А.П.[2], Долгов С.В.[2]

[1]*Пущинский государственный университет, 142290 Пущино, Московская обл., пр. Науки, 3*
[2]*Филиал Учреждения РАН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290 Пущино, Московская обл.*

E-mail: taranovemva@rambler.ru

Гирудин – высокоспецифический прямой ингибитор тромбина, обнаруженный в слюнных железах медицинской пиявки *Hirudo medicinalis*. В настоящее время препараты гирудина используются при лечении широкого спектра заболеваний, таких как: антикоагулятнтная терапия при тромбозах, профилактика и лечение тромбозов после хирургических вмешательств и переломов и др.

На данный момент существует два источника получения гирудина – природный из слюнных желез пиявки и синтез рекомбинантного гирудина в дрожжах. Оба этих способа дорогостоящи, кроме того, гирудин, синтезированный в дрожжах, обладает лишь 20–30% активности от природного. Это связано с недостаточной точностью процессинга молекул гирудина в дрожжах.

Нами исследуется возможность синтеза гирудина в растительных экспрессионных системах. Преимуществом такого подхода является низкая стоимость конечного продукта, а также наличие в растениях биохимических систем, необходимых для формирования корректной вторичной структуры гирудина.

Аминокислотная последовательность гирудина была получена из баз данных GenBank. К N-концу аминокислотной последовательности гирудина в трансляционном слиянии был добавлен сигнальный пептид α-амилазы риса. Для усиления экспрессии гирудина в растениях была проведена оптимизация кодонного состава последовательности кодирующей ДНК с помощью программы Gene Composer. Синтез последовательности ДНК был выполнен методом полимеразной цепной реакции. Для дизайна наборов перекрывающихся олигонуклеотидов была использована программа Primo Optimum 3.6 Optimal Gene Synthesis And Expression. Полученная нуклеотидная последовательность была клонирована в вектор pBI121под контролем 35S промотора CaMV и отсеквенирована, нуклеотидная последовательность 3 из 5 проанализированных клонов соответствовала заданной. Полученный вектор был перенесен в *Agrobacterium tumefaciens* CBE21 и будет использован для трансформации растений табака и ряски малой (*Lemna minor)*.

КОНСТРУИРОВАНИЕ И ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ДЕЛЕЦИОННЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА *DRGA* ЦИАНОБАКТЕРИИ *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC 6803 И ИХ ГИБРИДОВ С ГЕНАМИ, КОДИРУЮЩИМИ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ

Топорова В.А.[1], Алешин А.В.[2], Некрасов А.Н.[1], Муронец Е.М.[2], Лукашев Е.П.[2], Тимофеев К.Н.[2], Долгих Д.А.[1], Еланская И.В.[2]

[1]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*
[2]*Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1*

E-mail: toporova-viktorija@rambler.ru, assol5@rambler.ru
E-mail: ivelanskaya@mail.ru

Растворимая NAD(P)H:хинон-оксидоредуктаза цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803, кодируемая геном *drgA*, участвует в окислении NADPH и контролирует устойчивость клеток к нитроароматическим ингибиторам и к ингибиторам хинонного типа, индуцирующим окислительный стресс. С целью выяснения роли белка DrgA в клетках цианобактерии, а также изучения его структурно-функциональных характеристик, на основе анализа информационной структуры белка выявлены потенциальные участки для проведения сайт-направленного мутагенеза и сконструированы рекомбинантные последовательности ДНК, которые содержали делеционные варианты гена *drgA* с присоединенной к 3'-концу гена синтетической последовательностью, кодирующей 12 гистидиновых остатков. Кроме того, для визуализации белка в клетках, к гену *drgA* присоединены кодирующие последовательности флуоресцентных белков Cherry и EGFP. Полученные кодирующие последовательности использованы для конструирования на основе pTrc99A плазмид для прямой конститутивной и индуцируемой внутриклеточной экспрессии в *E. coli* гена *drgA* и его делеционных производных под контролем промотора Ptrc с усилителем трансляции TREN гена 10 бактериофага T7. Нативный и мутантные гены *drgA* экспрессированы в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3). Соответствующие гибридные белки очищены методом металл-аффинной хроматографии.

Для изучения роли и клеточной локализации DrgA в клетках *Synechocystis* sp. PCC 6803 на основе полученных рекомбинантных плазмид сконструированы мутанты *Synechocystis* sp. PCC 6803, несущие делеции в отдельных районах гена *drgA,* а также штаммы цианобактерии, содержащие белок DrgA с присоединенной к нему последовательностью флуоресцентных белков Cherry и EGFP. Охарактеризована фотосинтетическая активность мутантов и их устойчивость к ингибиторам.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 09-04-01119).

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА CIS ДИСПЛЕЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ TNF-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ ДОМЕНА ФИБРОНЕКТИНА

Шингарова Л.Н., Петровская Л.Е., Ключарева А.Ю., Крюкова Е.А., Болдырева Е.Ф., Хабибуллина Н.Ф., Долгих Д.А., Кирпичников М.П.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: lshing@mx.ibch.ru

Фактор некроза опухолей (TNF) является одним из основных медиаторов воспаления и врожденного иммунитета. При некоторых заболеваниях нейтрализация его активности дает ярко выраженный клинический эффект, поэтому поиск различных блокаторов TNF является перспективным направлением белковой инженерии и биотехнологии. Домен фибронектина (10 домен фибронектина III типа, Fn3) является структурным аналогом VH домена иммуноглобулинов. Варьирование аминокислотных последовательностей в трех петлях Fn3, соответствующих CDR в молекулах антител, позволяет получать белки, обладающие способностью связывать различные антигены.

Целью работы явилось изучение возможности конструирования TNF-связывающих белков на основе домена фибронектина методом CIS дисплея. На первом этапе была получена библиотека генов Fn3, содержащих статистические последовательности нуклеотидов (NNB+KMT) в участках, кодирующих петли BC, DE и FG. Для получения второй библиотеки использован метод ДНК-шаффлинга ранее полученных вариантов генов TNF-связывающих белков на основе Fn3. Далее обе библиотеки были объединены с фрагментом ДНК, кодирующим белок RepA и последовательность ori. Проведена селекция библиотек при помощи бесклеточного CIS-дисплея с отбором вариантов, связывающих биотинилированный TNF. Полученные в результате 3 раундов селекции варианты экспрессированы в клетках *E. coli*, рекомбинантные белки выделены и охарактеризованы физико-химическими и иммунологическими методами. Выявлено 2 клона, специфически связывающих TNF с константой около $7x10^{-8}$ М. Таким образом впервые показана возможность получения антиген-связывающих белков на основе Fn3 методом CIS дисплея.

Работа проводится при финансовой поддержке гранта НШ-5207.2010.4, программы РАН «Молекулярная и клеточная биология» и федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.

Секция 4

Физико-химические и компьютерные методы исследования. Пространственная структура и динамика. Биоинформатика

МОДЕЛИРОВАНИЕ ФОРМЫ И РАДИАЛЬНОЙ ПЛОТНОСТИ БЕЛКА α-КРИСТАЛЛИНА ПО КРИВЫМ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ

Амарантов С.В.[1], Волков В.В.[1], Налётова И.Н.[2], Аттанасио Ф.[3]

[1]*Учреждение РАН Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН, 119333 Москва, Ленинский просп., 59*
[2]*НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва*
[3]*Institute of Biostructure and Bioimaging (IBB), National Council of Research (CNR), Catania, Italy*

E-mail: amarantov_s@mail.ru

По экспериментальной кривой рентгеновского малоуглового рассеяния *Iexp(s)* где s модуль вектора рассеяния, и методом аналитического ультрацентрифугирования нами был получен набор моделей формы белка α-кристаллина (далее частицы) в растворе.

В рамках однородного, для плотности частицы, приближения были построены три трёхмерные модели формы с различной степенью разрешения. Первая модель – приближение формы частицы трёхосным эллипсоидом заданным своим форм-фактором $\langle \Phi(s,a,b,c) \rangle$, где параметры *a, b, c* – полуоси эллипсоида. Методом нелинейной минимизации квадратичного отклонения модельной кривой рассеяния $\langle \Phi(s,a,b,c) \rangle$ от экспериментальной *Iexp*(s) были получены числовые значения полуосей эллипсоида; вторая модель – приближение формы частицы набором сферических гармоник. В этом случае независимыми параметрами модели являлись коэффициенты ряда Фурье *flm* по сферическим гармоникам Ylm, а форма частицы *F* представлялась суммой ряда $F = \sum_{l=0}^{L} \sum_{m=-l}^{l} f_{lm} \, \mathrm{Y}_{lm}$ с максимальным числом гармоник *L*, связанных с числом независимых параметров модели *M* – определяемых теоремой Котельникова – Шеннона, рассчитанных из данных рассеяния. Третья модель – восстановление формы частицы методом поиска структуры заданной своей аминокислотной последовательностью – наилучшим образом подгоняет данные рассеяния по критерию наименьших квадратов. Последняя модель дала наиболее детальную модель формы частицы. Максимальная область поиска *Dmax* предварительно находилась из нуля функции парных расстояний внутри частицы *P*(*Dmax*)=0, полученной из *Iexp*(s) преобразованием Фурье.

В рамках неоднородного, для плотности частицы, подхода был осуществлён поиск радиального распределения плотности $\rho(r)$ внутри частицы при заданной форме. В этом случае форма частицы предполагалась сферически симметричной.

ТРИТИЕВАЯ ПЛАНИГРАФИЯ. ОТЛИЧИЯ В ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЕ БЕЛКА М1 ВИРУСА ГРИППА В КРИСТАЛЛЕ, РАСТВОРЕ И ВИРИОНЕ

Богачева Е.Н.[1], Долгов А.А.[1], Чуличков А.Л.[1], Шишков А.В.[1], Ксенофонтов А.Л.[2], Федорова Н.В.[2], Баратова Л.А.[2]

[1]Учреждение РАН Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991 Москва, ул. Косыгина, 4
[2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

E-mail: bogen_chph@mail.ru

Методом тритиевой планиграфии в сочетании с компьютерными алгоритмами предсказания вторичной, третичной структуры и моделирования бомбардировки объекта атомами трития исследована структура белка М1 вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (PR8, подтип H1N1) в растворе, вирионе и кристаллическом состоянии. Предложена предварительная модель С-концевого домена белка, для которого отсутствуют данные РСА. Анализ данных для свободного белка, белка в составе вириона и в кристаллическом состоянии (NM-домен) показал ряд существенных отличий в их структуре. На основании полученных данных можно сделать следующие выводы: 1) пространственная структура белка в растворе отличается от структуры в вирионе; 2) структура NM-домена в растворе отлична от структуры этого домена в кристаллическом состоянии, определенной с помощью РСА; 3) как и в случае с белком в составе вируса, основное отличие для белка в растворе наблюдается в области контакта N- и M-доменов, которые более плотно упакованы в кристаллическом состоянии. Мы предполагаем, что *in vivo* переход молекулы белка из подмембранного чехла, образованного агрегатами белка, в свободное состояние приводит к серьезным конформационным изменениям пространственной структуры М1 белка и даже смещению доменов друг относительно друга.

Работа поддержана грантами РФФИ (№№ 09-03-00469, 09-04-01160).

СТЕРЕОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СИЛЬНО СКРУЧЕННЫХ И ИЗОГНУТЫХ ββ-ШПИЛЕК В ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКАХ

Бражников Е.В., Ефимов А.В.

Учреждение РАН Институт белка РАН, 142290 Пущино, ул. Институтская, 4, Московская обл.

E-mail: tefg@vega.protres.ru

ββ-Шпильки широко распространены в белках и встречаются как в обособленном виде, так и в составе других структурных мотивов, таких как abcd-единицы, S- и Z-образные β-листы , ββ- и 3β-уголки и др. Многие ββ-шпильки в белках скручиваются и изгибаются очень сильно, что приводит к образованию своеобразных двойных спиралей, имеющих вогнутые и выпуклые поверхности [1,2]. Такие шпильки представляют особый интерес, поскольку образуют не только правые двойные спирали, но и сами являются правыми, т.е. в них второй по цепи β-тяж располагается справа относительно первого, если смотреть со стороны вогнутой поверхности [2]. Основная задача настоящей работы состоит в том, чтобы выяснить особенности аминокислотных последовательностей, кодирующих сильно скрученные ββ-шпильки, по сравнению с плоскими аналогами. Для этого создана база данных белков, содержащих такие шпильки, используя Банк белковых данных (PDB). Всего в негомологичных белках было найдено 386 сильно скрученных и изогнутых ββ-шпилек, в которых длина β-тяжей была 5 и более остатков. Определены частоты встречаемости всех 20 аминокислотных остатков на внутренней (вогнутой) и внешней (выпуклой) поверхностях сильно скрученных ββ-шпилек и построены соответствующие гистограммы. Установлено, что позиции на внутренних сторонах в большинстве случаев заняты гидрофобными остатками, а на внешних сторонах – гидрофильными. В этом сильно скрученные шпильки не отличаются от обычных шпилек в глобулярных белках. Однако обнаружено, что во внутренних позициях сильно скрученных и изогнутых ββ-шпилек аномально часто встречаются глицины и аланины, а во внешних позициях – пролины. Более того, во внутренних позициях этих шпилек пролины не встречаются вовсе. По-видимому, эти особенности и определяют образование сильно скрученных и изогнутых ββ-шпилек.

Работа поддержана грантом РФФИ № 10-04-00727-а и грантом Федерального агентства по науке и инновациям № 02.740.11.0295.

Литература

1. Chothia C. (1973). *J. Mol. Biol.* 75, 295–302.
2. Efimov A.V. (1991). *FEBS Lett*. 284, 288–292.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ МОДЕЛЬ КОМПЛЕКСА ИНГИБИТОРА ФОТОСИНТЕЗА И ФОТОСИСТЕМЫ II ИЗ *THERMOSYNECHOCOCCUS ELONGATES*

Габдулхаков А.Г.[1], Донцова М.В.[1], Зенгер В.[2]

[1]*Учреждение РАН Институт белка РАН,*
142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 4
[2]*Институт кристаллографии, Свободный университет, Берлин, Германия*

E-mail: azat@vega.protres.ru

Ключевым компонентом в фотосинтетическом образовании кислорода является фотосистема II. Этот сложный многокомпонентный комплекс располагается в тилакойдной мембране цианобактерий, зеленых водорослей и растений. Фотосистема II является наиболее удобной мишенью для ингибиторов фотосинтеза, что позволяет получать новые высокоэффективные гербициды. В данной работе методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 3,2 Å (R_{factor}=26,9%, R_{free}=29,9%, rmsd длин связей – 0,013 Å, валентных углов – 2,2^o, соответственно) впервые определена и уточнена пространственная модель фотосистемы II из цианобактерии *Thermosynechococcus elongates* в комплексе с гербицидом тербутрином (2-tert-butylamino-4-ethylamino-6-methylthio-1,3,5-triazine). Структура комплекса была получена методом молекулярного замещения, в качестве стартового образца использовалась структура мономера фотосистемы II из *T. elongates*, определенная нами ранее с разрешением 2,9 Å (PDB ID 3BZ1). Была обнаружена одна молекула тербутрина на мономер фотосистемы II, расположенная в сайте связывания подвижного пластохинона QB. Координаты уточненной структуры комплекса фотосистемы II с тербутрином депонированы в международный банк белковых структур под номерами PDB ID: 3PRQ, 3PRR.

Кристаллографическая часть работы выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук и Программы «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ И СВОЙСТВА БЕЛКОВ КРОВИ В ВОДНЫХ ДИСПЕРСИЯХ НАНОУГЛЕРОДА

Горюнов А.С., Рожков С.П., Борисова А.Г., Суханова Г.А.

Учреждение РАН Институт биологии Карельского научного центра РАН, 185610 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

E-mail: goryunov@krc.karelia.ru

Разработка технологий получения все новых и новых наноматериалов на основе углерода и перспективы их медицинского применения требуют изучения биофизикохимических взаимодействий углеродных наночастиц с белковыми, структурами в устойчивых водных дисперсиях для выяснения общих закономерностей влияния наноуглерода на биопроцессы на молекулярном и субклеточном уровне. Цель настоящей работы – охарактеризовать структурно-динамические, термодинамические и гидродинамические особенности состояния белковых макромолекул в нанодисперсии углерода и в составе белковой короны наночастиц (НЧ).

Исследование методами ЭПР спин-метки и спин-зонда, дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ДСК), спектроскопии лазерного светорассеяния, хроматографии позволило установить, что в случае сывороточного альбумина (СА) при образовании в бессолевой водной среде устойчивых комплексов белок-углеродная наночастица (наноалмаз, шунгитовый наноуглерод) в их состав входит практически весь белок раствора, образуя многослойную белковую корону, тогда как в случае гемоглобина – лишь малая часть белка. При хроматографическом разделении комплексы на основе шунгитового наноуглерода выходят из колонки во фракциях со значительно меньшим объемом элюции, чем чистый СА, в то время как гемоглобин не оказывает влияния на хроматографическую подвижность наноуглерода, которая в этом случае, а также в отсутствии белка близка к нулю. В составе белковой короны альбумин, находящийся в непосредственном контакте с НЧ, оказывается в частично развернутом состоянии: взаимодействие молекулы СА с НЧ, имеющими неполярную природу поверхности, вероятно, осуществляется за счет центров на СА, связывающих неполярные молекулы жирных кислот; происходит перераспределение молекулярных контактов между структурными доменами СА, меняется его термостабильность; свойства остальной части альбумина в составе короны изменяются мало. Показано также, что наночастицы углерода могут выступать в качестве фактора, ускоряющего или даже обеспечивающего процессы индуцированного восстановления/окисления органических соединений (спин-зонд ТЕМПО) и автоокисления гемоглобина.

АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОМИМЕТИКОВ

Горячева Е.А., Архипова С.Ф., Артемьев И.В., Плетнев В.З.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: goryacheva@ibch.ru

Ограничения при использовании молекул пептидной природы связаны с их высокой метаболической активностью, конформационной подвижностью и сильным влиянием внешних условий (температура, pH и др.) на структурно-функциональные свойства. Одним из подходов к стабилизации природных пептидов является создание на их основе псевдопептидных соединений с ограниченной конформационной свободой, получивших название «пептидомиметиков». Пептидомиметики дают возможность направленно изменять конформацию исходной пептидной молекулы и вводить «неприродные» модификации в полипептидную цепь, что позволяет повысить метаболическую устойчивость природных соединений и получить модифицированные пептиды с существенно более высоким сродством к молекулам-мишеням.

Ограничение конформационной подвижности пептидной цепи может быть достигнуто в результате образования дополнительной непептидной амидной связи с участием определенных аминокислотных остатков. В работе был проведен теоретический конформационный анализ синтезированных с помощью реакции аминоацильного включения циклических дипептидов, образованных с участием Asp, Lys, Glu, Orn и Dab: Boc-Lys-Glu-Bu^t, Boc-Dab-Glu-OBu^t, Z-Orn-Glu-OBzl и Z-Lys-Asp-OBzl. Также для соединения Boc-Dab-Glu-OBu^t был проведен анализ конформационных свойств как в LL, так и LD пространственной ориентации аминокислотных остатков. Для определения структуры низкоэнергетических конформационных состояний исследуемых циклических дипептидов был использован программный комплекс CHARMM.

Теоретический конформационный анализ циклопептидов показал, что конформационная подвижность циклической системы исследуемых соединений зависит от числа атомов в цикле, взаимного расположением амидных связей и природы N- и C-концевых фрагментов. При этом взаимное расположение амидных связей оказывает существенное влияние на конформационную подвижность исследуемых молекул.

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ СТРУКТУРЫ МАТРИКСНОГО М1-БЕЛКА ВИРУСА ГРИППА В РАСТВОРЕ

Ксенофонтов А.Л.[1], Федорова Н.В.[1], Добров Е.Н.[1], Богачева Е.Н.[2]

[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.40
[2]Учреждение РАН Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, ул. Косыгина, 4

E-mail: ksenofon@belozersky.msu.ru

Матриксный М1-белок вируса гриппа выполняет важную роль при сборке вируса за счет выраженной склонности к самополимеризации при ассоциации с липидными мембранами. Ша и Луо [1] удалось закристаллизовать N-концевую часть молекулы М1 (остатки 2-158) и установить ее пространственную структуру. Структура С-концевого домена (остатки 159-252) остается неизвестной.

С помощью метода тритиевой планиграфии мы оценили включение тритиевой метки в цельный М1-белок при кислых pH. Обнаружено преимущественное включение тритиевой метки в С-концевой домен, что говорит о «рыхлости» его структуры. Методами аналитического центрифугирования и динамического лазерного светорассеяния (ДЛС) при кислых pH (3,5–5,0) мы определили необычно большой для глобулярного белка гидродинамический диаметр молекулы М1 (D_H = 5,6 ± 1,5 нм). Анализ ряда доступных в интернете программ предсказания областей неструктурированности белков показал высокую долю разупорядоченности в С-домене (от 29%-FoldIndex до 66%-IUPred) и лишь незначительную в N-концевом фрагменте (7±4%). Также изучена склонность М1-белка к самополимеризации и ассоциации в растворе. Данные кругового дихроизма (КД) интактного М1-белка при pH 4,0–5,0 показали рост структурированности при увеличении концентрации белка (в диапазоне 0,1–10 мг/мл) или добавлении трифторэтанола, что подтверждает наличие неструктурированных областей, склонных к сворачиванию. Повышение температуры приводило к «плавлению» структуры М1-белка при 60°С. При этом происходила необратимая, но частичная денатурация (до 50%). По данным ДЛС в диапазоне 55–65°С происходило слипание денатурированных молекул и диаметр частиц D_H возрастал до 12–16 нм. Повышение pH до 6,0–6,5 приводило к резкому увеличению мутности раствора ($ОД_{320}$). При этом происходила ассоциация молекул с появлением пиков с D_H равным 50–60 нм и 400–800 нм, не сопровождающаяся заметной денатурацией по данным КД. По-видимому, при повышении pH раствора происходит самополимеризация М1-белка, возможно, сходная с его полимеризацией при сборке вириона в клетке.

Работа поддержана грантами РФФИ (№№ 09-04-01160, 09-03-00469).

Литература

1. Nat.Struct.Biol., 1997, 4, 239–244.

РОЛЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ В ОБЪЕМНОЙ БИОРЕГУЛЯЦИИ

Курзанов А.Н.

Кубанский государственный медицинский университет, 350063 Краснодар, ул. Седина, 4

E-mail: kurzanov@mail.ru

Гипотеза о существовании в живой природе регуляции физиологических функций, а также патофизиологических реакций по принципу объемной биорегуляции (Курзанов А.Н., 2009, 2010) базируется на существующих представлениях о структурно-функциональной организации, а также информационных принципах функционирования живой материи. При этом роль важнейших информационных детерминант отводится пептидам. Пептидергическая сигнальная трансдукция имеет место на различных уровнях организации жизнедеятельности – генетическом, молекулярном, внутриклеточном, межклеточном, тканевом, организменном, видовом, межвидовом.

В отличие от нейромедиаторной синаптической передачи информации по «анатомическому адресу», обеспеченному контактом пре- и постсинаптических структур, дистактная пептидергическая передача информации по «химическому адресу» обеспечивается переносом молекул пептидов через кровь, ликвор, межклеточную жидкость, а также внешнюю среду (воздух, воду) и носит объемный характер. Понятие «объема» в этом смысле может включать от пространства, окружающего отдельную клетку, до пространства, в котором происходит обмен информацией через внешнюю среду между целыми организмами. Объемная передача информации посредством пептидов – важный составной элемент объемной регуляции жизнедеятельности.

Основными факторами, лимитирующими объем и эффективность пептидергической регуляции, можно считать: период существования сигнальных молекул, характер микроциркуляции биологических жидкостей, определяющий скорость транспорта пептидов от места их выброса; мощность пептидного сигнала, определяемая количеством их молекул; готовность клеток к восприятию сигнала (наличие и количество рецепторов) и трансляции его после лиганд-рецепторного взаимодействия.

Взаимодействие клеток в определенном объеме ткани, органа, обмен информацией между особями в группе с участием регуляторных пептидов обеспечивается специфичностью молекулярной структуры лигандов и их рецепторов. Уникальные возможности системы регуляторных пептидов позволяют рассматривать их в качестве универсального инструмента, обеспечивающего эффекты эволюционно наиболее древнего механизма организации жизнедеятельности – объемной биорегуляции.

ХРОМОФОР-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЖЕЛТЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ

Мартынов В.И., Пахомов А.А.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: vimart@ibch.ru

Спектральные свойства зеленого флуоресцентного белка (GFP) и его гомологов определяются структурой хромофора и различными его взаимодействиями с окружающими аминокислотами. Для изучения структурных особенностей, определяющих спектральные свойства желтых флуоресцентных белков, с помощью гомологичного моделирования и масс-спектрометрии была построена модель трехмерной структуры белка phiYFP (λem = 537 nm) из медузы *Phialidium* sp. Масс-спектрометрический анализ хромофорсодержащего пептида показал, что химическая структура хромофора phiYFP эквивалентна таковой у GFP. Далее, для получения полной 3-х мерной модели, экспериментально определенная структура хромофора была включена в рассчитанную на основе гомологии модель белка. Эта модель на следующем этапе использовалась для определения аминокислот в окружении хромофора, которые могут влиять на фотофизические свойства белка, и по этим аминокислотам проводился направленный мутагенез. Анализ спектральных свойств полученных мутантов показал, что несколько факторов определяют фотофизические характеристики желтых флуоресцентных белков. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что π-π стэкинг-взаимодействия хромофора с фенольным кольцом Tyr203 вносят лишь небольшой вклад (около 10 нм) в общий сдвиг спектров в красную область. Дополнительный эффект может быть получен при введении Val в позиции 205. Также, важным фактором является образование водородной связи между Glu222 и азотом имидазолонового цикла хромофора.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 09-04-00212; 10-04-00471).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АНОМАЛЬНОЙ ТЕПЛОВОЙ АГРЕГАЦИИ GFP

Молочков Н.В.[1], Мельник Б.С.[2], Прохоров Д.А.[1], Уверский В.Н.[3], Кутышенко В.П.[1]

[1]Учреждение РАН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290 Пущино, Московская обл.
[2]Учреждение РАН Институт белка РАН, 142290 Пущино, Московская обл.
[3]Center for Computational Biology and Bioinformatics, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202, USA

E-mail: molotchkov@rambler.ru

В данной работе методом ЯМР исследуется взаимодействие с молекулами воды и тепловая денатурация cycle-3 мутанта зеленого флуоресцентного белка. Показано, что при его тепловой денатурации происходит накопление агрегированной формы этого бека и практически отсутствует в растворе развернутый белок. Анализ экспериментальных данных по спиновой диффузии позволяет сделать вывод, что внутренняя часть бета бочонка GFP активно взаимодействует с молекулами воды, поэтому при высоких температурах происходит не разворачивание полипептидной цепи GFP, а скорее «разлом» его структуры, что, в свою очередь, приводит к усиленной агрегации и выпадению белка в осадок.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПЕПТИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНТРОЛИРУЕМОЙ ФРАГМЕНТАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ИОНОВ ПРИ ЭЛЕКТРОРАСПЫЛЕНИИ РАСТВОРОВ

Назимов И.В.[1], Новиков А.В.[2], Бубляев Р.А.[2], Краснов Н.В.[2]

[1]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*
[2]*Учреждение РАН Институт аналитического приборостроения РАН, 190103 С.-Петербург, пр. Рижский, 26*

E-mail: nazimov@ibch.ru

Целью данной работы являлось создание отечественного приборного комплекса для хроматографического разделения компонентов смеси пептидов с *on line* фрагментацией в ESI-TOF молекулярных ионов компонентов смеси и последующей расшифровки аминокислотной последовательности каждого пептида.

Смеси пептидов разделялась на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром А-02», работающем в режиме прямой стыковки с времяпролетным масс-спектрометром MX 5311 с электрораспылительной ионизацией. Элюируемые с хроматографа пептиды детектировались масс-спектрометрически в виде их молекулярных ионов. Полученные молекулярные ионы подвергались регулируемой фрагментации в узле ввода образца, что приводило к образованию смеси первичных и вторичных фрагментных ионов пептидов.

Предложенный способ фрагментации молекулярных ионов пептидов приводит к образованию значительного числа первичных фрагментных ионов, соответствующих аминокислотному типу фрагментации. Обнаружено, что интенсивность таких ионов превышает сигнал фона в 3–100 раз, что позволяет надёжно определять аминокислотную последовательность пептидов, содержащих до 10 аминокислот.

ПРОГРАММНО-АППАРАТНЫЙ КОМПЛЕКС РАСПОЗНАВАНИЯ ФРАГМЕНТНЫХ МАСС-СПЕКТРОВ ПЕПТИДОВ НА ОСНОВЕ ПРОТЕОМНЫХ БАЗ ДАННЫХ – PROTEOS

Назимов И.В.[1], Присяч С.С.[2], Фиронов С.В.[2]

[1]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
[2]Учреждение РАН Институт аналитического приборостроения РАН, 198103 С.-Петербург, пр. Рижский, 36

E-mail: prisyatch@yandex.ru

Программно-аппаратные средства для вероятностной оценки соответствия фрагментных масс-спектров пептидов аминокислотным последовательностям из белковых баз данных становятся одним из основных инструментов биохимика-масс-спектрометриста. Тем не менее, потребительские качества существующих на текущий момент реализаций (Mascot) еще требуют доработки по ряду параметров: низкая скорость обработки данных (недостаточная для множественного автоматического анализа масс-спектров), недостаточное качество оценки (значимо уступает эталонному анализу эксперта – масс-спектрометриста).

Разработанный в ИАП РАН комплекс Proteos, подобно Mascot, является клиент-серверным приложением и может предоставлять пользователям доступ посредством Интернет-обозревателя через сеть Интернет. Благодаря использованию специально разработанных алгоритмов обработки масс-спектров (Crystal Tag – разновидность peptide sequence tag и алгоритмам частичной интерпретации аминокислотной последовательности) удалось достичь качества распознавания на уровне конкурирующих разработок и на порядок увеличить скорость интерпретации данных.

По предварительным испытаниям на тестовой выборке смесей пептидов вхождение пептидов, образовавших исследуемый фрагментный масс-спектр, в 200 результатов с наивысшей оценкой наблюдается примерно в 65% случаев. При исследовании фрагментных масс-спектров очищенных пептидов, заведомо имеющихся в используемых базах данных аминокислотных последовательностей, искомый пептид занимает 1–2 место в результатах оценки. Скорость обработки достигает 1 000 спектров в секунду.

В настоящее время начато практическое использование программно-аппаратного комплекса Proteos совместно с ИБХ РАН.

ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТНОЙ ЗАМЕНЫ ПРО^{11}-АЛА^{11} НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА БУФОРИНА 2: ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Науменкова Т.В.

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1-12

E-mail: tnaumenkova@gmail.com

Среди известных на сегодняшний день антимикробных пептидов буфорин 2 является одним из наиболее активных. Он обладает чрезвычайно широким спектром противомикробного действия, оказывает эффект в низких концентрациях и даже в концентрациях, в десятки раз превышающих эффективные, не проявляет токсических свойств. Однако, обладая всеми структурными характеристиками α-спиральных катионных пептидов, буфорин 2 не является мембраноактивной молекулой. Предположительно, его биологический эффект реализуется за счет взаимодействия с внутриклеточной мишенью.

Проведенные нами исследования свидетельствуют о том, что аминокислотная замена Про^{11}-Ала^{11} придает замещенному аналогу буфорина 2 способность специфически взаимодействовать с мембранами микробных клеток. Предложенная замена способствует выпрямлению характерного пролинового изгиба в центре пептида. Замещенный аналог не взаимодействует с модельной мембраной эукариотических клеток, но связывается с поверхностью модельной мембраны клеток прокариот, тогда как нативный буфорин 2 не способен удерживаться на поверхности любых клеток. Группа из четырех молекул аналога, размещенная на поверхности модельной мембраны прокариот, вызывает деформацию бислоя и приводит к нарушению избирательной проницаемости мембраны.

Проведено также исследование стабильности трансмембранных тороидальных пор, образованных четырьмя молекулами буфорина 2 и его аналога. Показано, что пора, в состав которой входят молекулы нативного буфорина 2, разрушается в первые нс эксперимента, при этом в молекулах пептида образуются характерные изгибы. Пора, содержащая молекулы аналога, остается стабильной на протяжении всего времени моделирования.

Оба пептида способны к связыванию со специфическим участком ДНК.

Биохимические и токсические свойства предложенного аналога требуют дальнейшего изучения, однако полученные нами данные дают основание утверждать, что Про^{11}-Ала^{11}-буфорин 2 является перспективным терапевтическим агентом.

КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА L1-ВЫСТУПА РИБОСОМЫ С РАЗРЕШЕНИЕМ 2.0 Å

Невская Н.А., Сарских А.В., Костарева О.С., Никонова Е.Ю., Габдулхаков А.Г., Тищенко С.В., Гарбер М.Б., Никонов С.В.

Учреждение РАН Институт белка РАН,
142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 4

E-mail: nevskaya@protres.ru

L1-выступ 50S рибосомной субчастицы участвует в высвобождении деацилированной тРНК из E сайта. Рибосомный белок L1, кроме связывания с рРНК, связывается со специфическим участком на мРНК и осуществляет регуляцию собственного синтеза по принципу «обратной связи». Ранее было показано, что минимальный участок специфического связывания белка L1 на 23S рРНК включает спираль 77 (H77) с двумя прилегающими петлями, и была определена структура комплекса белка L1 из *Sulfolobus acidocaldarius* с соответствующим фрагментом рРНК, содержащим 55 нуклеотидов. Кроме того, были определены структуры нескольких комплексов белка L1 с фрагментами матричной РНК. Эти структуры не могли в полной мере объяснить различие в кинетических параметрах связывания белков L1 дикого типа и их мутантных форм с рибосомной и матричной РНК. В данной работе мы определили структуру комплекса рибосомного белка L1 из бактерии *Thermus thermophilus* с фрагментом 23S рРНК, содержащим 80 нуклеотидов и включающим, кроме минимального участка связывания, полную спираль 78. Оказалось, что H78 контактирует с первым доменом белка L1, образуя второе, удаленное от специфического, место связывания с белком. Ранее нами было показано, что наличие разнесенных мест связывания более существенно повышает сродство белка к РНК, чем увеличение площади единственного места контакта. Таким образом, можно сделать вывод, что причиной большей стабильности рибосомных комплексов L1-рРНК по сравнению с комплексами с L1-мРНК, является взаимодействие белка L1-именно со спиралью 78. Полученные результаты вносят существенный вклад в понимание структурных основ регуляции трансляции.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 10-04-00618).

СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ УЧАСТКА СВЯЗЫВАНИЯ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТА БЕЛКОМ HFQ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Никулин А.Д.[1], Гарбер М.Б. [1], Никонов С.В. [1], Мурина В.Н.[1,2]

[1]*Учреждение РАН Институт белка РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 4, Московская обл.*
[2]*Пущинский филиал МГУ им. М.В. Ломоносова, Пущино, Московская обл.*

E-mail: nikulin@vega.protres.ru <mailto:vmlipkin@mx.ibch.ru>

Hfq – небольшой термостабильный РНК-связывающий белок, являющийся глобальным регулятором экспрессии генов в бактериях. Белок Hfq образует характерную для него четвертичную структуру в виде тороидального гексамера. На поверхности белка выявлено два места связывания РНК: участок связывания мРНК и малых регуляторных РНК с одной стороны гексамера (проксимальная сторона белка), и участок связывания полиА РНК с противоположной стороны гексамера (дистальная сторона). Кроме того, было показано, что Hfq способен связывать не только полиА РНК, но и отдельные молекулы АТФ.

Нами впервые была определена пространственная структура белка Hfq из *Pseudomonas aeruginosa* в комплексе с нерасщепляемым аналогом АТФ ADPNP. ADPNP располагается в дистальном сайте связывания на поверхности белка Hfq, образуя водородные связи с аминокислотными остатками Thr61, Gln52 и Gly29 и стэкинг с боковой цепью Tyr25. В отличие от комплексов белка Hfq с полиА РНК не было зафиксировано нахождение ADPNP в соседнем месте связывания аденина, которое было предложено как существенное для узнавания полиА РНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» ГК № 02.740.11.0295.

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ОБЪЯСНЕНИЮ АЛЛОРЕАКТИВНОСТИ КАК ПРОЯВЛЕНИЯ ПЕРЕКРЕСТНОЙ РЕАКТИВНОСТИ Т-КЛЕТОК С ВИРУСНЫМИ БЕЛКАМИ

Новоселецкий В.Н.[1], Абрамов В.Ю.[2]

[1]*Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,*
119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.12
[2]*ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. В.И.Шумакова,*
123182 Москва, ул. Щукинская, 1

E-mail: valeryns@mail.ru

При пересадке органов человека основной причиной прекращения функции трансплантата является отторжение, возможность развития которого обусловлена генетически детерминированными различиями в строении молекул тканевой совместимости (HLA) реципиента и донора. Для объяснения острого отторжения аллотрансплантата было высказано предположение, что оно является проявлением анамнестического иммунного ответа, который обусловлен перекрестной реактивностью лимфоцитов (клеток памяти) реципиента, перенесшего ранее те или иные вирусные заболевания, с аллогенными молекулами HLA донора. В пользу этого предположения говорит и тот факт, что белок UL18 цитомегаловируса человека (HCMV) не только имеет сходство по последовательности и структуре с HLA-A2, но и способен функционировать сходным образом, обеспечивая тем самым мимикрию инфицированных клеток под здоровые и предотвращая иммунный ответ хозяина (Bjorkman et al., 2008). Нами было выполнено сравнение последовательностей молекул HLA класса I и последовательностей вирусных белков. Было обнаружено, в частности, что последовательность молекулы HLA-A2 имеет заметное сходство с последовательностями белков ряда вирусов. В частности, идентичность с последовательностью упомянутого белка UL18 составила 26%. Интересно, что идентичные остатки не только распределены по последовательности вирусных белков, но и образуют несколько участков по 8-10 остатков, локальная идентичность в которых достигает 100%. Предполагая важность такой идентичности для функционирования вирусов, мы оценили склонность идентичных участков к связыванию с молекулам HLA-DR, которое является важным этапом иммунного распознавания. С помощью веб-интерфейса к базе данных SYFPEITHI, содержащей информацию о связывании пептидов с молекулами HLA различных классов, было обнаружено, что эти участки локального сходства имеют повышенное сродство к молекулам HLA-DR. В ближайшее время мы планируем выяснить биологическую роль этого явления.

Секция 5

Биологическая активность. Методы тестирования

ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ПРОДИГИОЗИНА

Андреева И.Н., Рязанцева И.Н., Захарченко Н.Л., Огородникова Т.И.

Учреждение РАН Казанский институт биохимии и биофизики РАН, 420111 Казань, ул. Лобачевского, 2/31

E-mail: Andreyeva@mail.knc.ru

Продигиозин – линейный трипиррол – пигмент, образуемый *Serratia marcescens* и придающий растущей культуре характерную красную окраску; продигиозин в клетке находится в составе пигмент-белкового комплекса и локализован в ее оболочке. В наших исследованиях показана способность пигментированного штамма *S.marcescens* ATCC 9986 запасать световую энергию, что вызывает интерес к изучению первичных фотореакций, происходящих в пигмент-белковом комплексе, а также спектральных свойств продигиозина и влиянию на них белкового окружения.

Продигиозин растворим в полярных и неполярных органических растворителях и не растворим в воде, но может быть переведен в водную фазу в составе пигмент-белкового комплекса обработкой биомассы детергентами (додецилсульфатом натрия и Тритоном Х-100); молекулярный вес входящего в его состав белка – 105,5 КДа.

Продигиозин имеет две спектральные формы: красную (макс.погл.535 нм) и желтую (макс.погл. 460–470 нм) в зависимости от pH среды. Растущая культура *S.marcescens* содержит обе формы продигиозина, причем желтая форма либо более фотоактивна, либо количественно преобладает. Абсорбционная кривая клеточной суспензии перекрывает область поглощения обеих форм пигмента, но кроме выраженного пика при 535 нм имеет еще один – 500 нм.

В щелочных условиях продигиозин в спиртовом растворе и в составе пигмент-белкового комплекса дает широкий максимум поглощения (460–470 нм). В кислой среде продигиозин в спиртовом растворе и в комплексе с денатурированным белком имеет один пик с максимумом поглощения 535 нм. Кривая абсорбции продигиозина в комплексе с нативным белком в кислой области совпадает с таковой интактных пигментированных клеток (два пика, 500 и 535 нм); возможно, при этом сохраняются связи продигиозина с белковым окружением подобные существующим *in vivo*.

Обе формы продигиозина флуоресцируют в области 560–580 нм, как в спиртовом растворе, так и в составе пигмент-белкового комплекса, однако, в клетке выявляется преимущественно флуоресценция красной формы пигмента (дл.волны возб. 535 нм), что может указывать на их функциональные различия в метаболизме бактериальной клетки.

ВВЕДЕНИЕ СЕМАКСА В ТЕЧЕНИЕ 3–4 НЕДЕЛЬ ЖИЗНИ КРЫС ОСЛАБЛЯЕТ НЕГАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ ХРОНИЧЕСКОЙ МАТЕРИНСКОЙ ДЕПРИВАЦИИ

Володина М.А.[1], Глазова Н.Ю.[2], Себенцова Е.А.[2], Манченко Д.М.[1], Левицкая Н.Г.[2], Андреева Л.А.[2], Каменский А.А.[1]

[1]МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/12
[2]Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2

E-mail: mariavolodina@yandex.ru

Многочисленные исследования показали, что материнская депривация (МД) в ранний постнатальный период развития является серьезным стрессогенным воздействием и вызывает негативные изменения поведения и физического развития животных. Ранее было показано, что введение аналога фрагмента АКТГ(4-10) семакса детенышам белых крыс в течение 1–3-й недель жизни приводит к эффектам, противоположным описанным в литературе эффектам неонатального стресса.

Целью работы являлась оценка возможности коррекции отставленных эффектов хронической МД у белых крыс с помощью введения семакса в течение 3–4-ой недель жизни. Каждый выводок делили на 3 группы: «контроль», «МД», «МД+сем». С 1-го по 14-й дни жизни крысята групп «МД» и «МД+сем» ежедневно на 5 часов в день помещались в индивидуальные боксы. С 15-го по 29-й дни жизни крысята группы «МД+сем» получали ежедневные интраназальные инъекции семакса в дозе 0.05 мг/кг массы тела, животные из групп «контроль» и «МД» – инъекции воды в том же объеме. Крысят регулярно взвешивали. На 15-й и 60-й дни жизни измеряли уровень глюкозы в крови у животных, находящихся в условиях свободного доступа к пище. На 42-й день жизни оценивали пищевую мотивацию крыс и измеряли уровень глюкозы в крови после пищевой депривации. Масса тела животных группы «МД» была достоверно ниже контроля до возраста 62 дней. У животных группы «МД+сем» также отмечалось отставание в росте по сравнению с контролем в течение первых полутора месяцев жизни, но уже на 55-й день жизни достоверных отличий от контроля не наблюдалось. Уровень глюкозы в крови у животных группы «МД» был достоверно ниже контроля при всех измерениях. У крыс группы «МД+сем» уровень глюкозы в крови на 42-й и 60-й дни жизни не отличался у контроля. При этом у животных группы «МД+сем» отмечалось повышение пищевой мотивации по сравнению с другими группами. Таким образом, введение семакса в течение 3–4-й недель жизни частично компенсирует негативное влияние хронической МД на физическое развитие белых крыс.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (ГК № П1057) и РФФИ (грант № 11-04-01329).

АНТИДЕПРЕССАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ АНАЛОГА С-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА АРГИНИН-ВАЗОПРЕССИНА – ТЕТРАПЕПТИДА N-Ac-D-MET-PRO-ARG-GLY-NH2

Воскресенская О.Г.[1], Голубович В.П.[2], Каменский А.А.[1]

[1]МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.12
[2]Институт биоорганической химии НАН Беларуси,
220600, Минск -23, Академгородок, Жодинская, 5, Беларусь

E-mail: voskresenskaya05@mail.ru

Одним из поведенческих признаков, по которым можно судить о развитии у грызунов состояния депрессии, является развитие у них «поведенческого отчаяния» (увеличения длительности иммобилизации) в тесте принудительного плавания. Ac-D-MPRG вводили самкам интраназально в дозе 10 мкг/кг с 11 дня беременности и до родов. Мы проводили определение структуры и параметров поведения в данном тесте на 27, 40 и 70-ый день жизни потомства (29 контрольных и 39 опытных животных). Фиксировали длительность активного и пассивного плавания, длительность иммобилизации, время ее наступления и ряд других показателей. Исследование показало, что на 27-ой день наблюдалось достоверное (p=0,01) увеличение длительности активного и пассивного плавания, иммобилизация наступала позднее, а ее продолжительность была в 2 раза меньше, чем у контрольных животных (p=0,02). На 40-ой день у животных опытной группы достоверно снижалась длительность активного плавания и увеличивалась длительность пассивного плавания (p=0,02). Иммобилизация наступала позднее, количество актов иммобилизации было снижено (p=0,01). На 70-ый день структура и параметры плавательного поведения опытной и контрольной групп были одинаковы. Известно, что у крыс к концу внутриутробного развития вазопрессинергическая система организована так же, как у взрослых животных. По-видимому, в результате непрямого действия на эту систему Ac-D-MPRG, введенный беременным самкам, повышает способность потомства адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей обстановки, снижая уровень тревожно-фобических реакций. Наиболее ярко антидепрессантное действие Ac-D-MPRG выражено на 27–40 дни жизни, то есть до периода полового созревания потомства.

Работа выполнена в рамках соглашения о научно-техническом сотрудничестве по созданию лекарственного препарата ноотропного действия для внедрения в медицинскую практику Российской Федерации и Республики Беларусь между ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» и кафедрой физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова.

НОВЫЕ ФУНКЦИИ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА NOGGIN: ИНГИБИРОВАНИЕ СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДОВ TGF-β И WNT

Ерошкин Ф.М., Байрамов А.В., Мартынова Н.Ю., Ермакова Г.В., Соловьева Е.А., Зарайский А.Г.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: xenopus@nm.ru

Секретируемый белок Noggin (Noggin1), впервые открытый у шпорцевой лягушки *Xenopus* как нейральный индуктор, способен связывать белки семейства BMP (Bone Morphogenetic Proteins). Благодаря этому свойству Noggin1 выполняет функцию ингибирования *BMP*-сигнального каскада и играет ключевую роль во многих процессах, включая индукцию нервной ткани и скелетной мускулатуры в эмбриогенезе, развитие хрящей и дифференцировку волосяных фолликулов.

Помимо «классического» Noggin1, у позвоночных нами были найдены две другие группы белков семейства Noggin, Noggin2 и Noggin4. Нами было показано, что микроинъекция мРНК *Noggin2* в вентральные бластомеры эмбрионов *Xenopus laevis* может вызывать формирование вторичной головы – процесс, который требует одновременного подавления *BMP*, *Nodal*/*Activin* и *Wnt*-сигнальных каскадов. Чтобы изучить функцию белка Noggin2 и идентифицировать его молекулярные мишени, мы сравнили лиганд-связывающие свойства Noggin1 и Noggin2, экспрессированных в ранних эмбрионах *Xenopus*, а также их способность подавлять *BMP*, *Nodal*/*Activin* и *Wnt*-сигнальные каскады. Предварительно мы установили, что способность к трансляции мРНК *Noggin1* дикого типа необычно низка, поэтому особое внимание в ходе последующих экспериментов было уделено выравниваю «транслируемости» мРНК *Noggin1* и *Noggin2* путем модификации их 5'-нетранслируемых областей. В результате мы впервые установили, что Noggin1, как и Noggin2, способен связывать *in vitro*, помимо BMP, ряд белков *Nodal/Activin* и *Wnt* каскадов – ActivinB, Xnr2, Xnr4 и Wnt8 и ингибировать эти каскады *in vivo*. Однако, поскольку из-за низкой транслируемости дикого типа мРНК *Noggin1* концентрация его белка в клетках чрезвычайно низка, в нормальном развитии существенную роль играет только BMP-антагонистическое свойство Noggin1, что обусловлено необычайно высокой аффинностью Noggin1 к BMP лигандам. В тоже время, одной из ключевых функций *Noggin2* в эмбриогенезе является подавление активности *Activin* и *Wnt* в клетках зачатка переднего мозга.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

РАЗРУШЕНИЕ БИОПЛЕНОК СТАФИЛОКОККОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО КАТИОННОГО ПЕПТИДА ВАРНЕРИНА

Полюдова Т.В., Лемкина Л.М., Коробов В.П.

Учреждение РАН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, 614081 Пермь, ул. Голева, 13

E-mail: korobov@iegm.ru

Бактерии рода *Staphylococcus* обладают выраженной способностью к образованию биопленок на различных поверхностях, что представляет серьезную медицинскую проблему в связи со снижением уязвимости бактерий в этом состоянии для иммунных защитных механизмов человека и повышением устойчивости к антибактериальным препаратам. Одним из подходов к подавлению формирования и функционирования биопленок коагулазонегативных стафилококков, как показали наши исследования, является их направленное разрушение под действием низкомолекулярного катионного пептида варнерина благодаря активации аутолитических систем бактериальных клеток.

В работе использовали 25 клинических штаммов коагулазонегативных стафилококков, в разной степени способных формировать биопленки. Биопленки выращивали в полистироловых 96-луночных планшетах на жидкой среде LB. Инкубацию проводили при 37°C в течение 48 ч, после чего пленки промывали 0.9% раствором NaCl и в лунки вносили раствор варнерина в концентрации 4 мг/мл. Планшеты инкубировали при 37°C в течение 2 ч, биопленки промывали 0.9% раствором NaCl, подсушивали и окрашивали 0.1% раствором генцианвиолета. Оптическую плотность этанольных экстрактов связавшегося с пленками красителя измеряли на планшетном спектрофотометре Benchmark Plus «BioRad» (США) при длине волны 570 нм.

В результате проведенных исследований обнаружено, что под действием варнерина происходит разрушение биопленок значительного числа исследованных штаммов (68%). Биомасса пленок, сформированных бактериями этих штаммов, после инкубации с варнерином снижалась более чем в 2 раза по сравнению с контролем.

Полученные результаты указывают на выраженную способность варнерина деградировать зрелые биопленки коагулазонегативных стафилококков.

Работа поддержана грантами РФФИ № 10-04-96086-р_урал_а, Программ Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» № 09-П-4-1019 и УрО РАН № 09-М-14-2002, офи-10-14-12-НАБ.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АКТИВАЦИИ АУТОЛИЗИНОВ БАКТЕРИЙ *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* КАТИОННЫМ ПЕПТИДОМ ВАРНЕРИНОМ И ДЕТЕРГЕНТАМИ

Филатова Л.Б., Лемкина Л.М., Полюдова Т.В., Коробов В.П.

Учреждение РАН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, 614081 Пермь, ул. Голева, 13

E-mail: korobov@iegm.ru

Широкое применение антибиотиков приводит к быстрому формированию резистентности бактерий к антибиотикам, что определяет необходимость поиска новых эффективных лекарственных соединений. Такими соединениями могут стать низкомолекулярные катионные пептиды семейства лантибиотиков, обеспечивающие защиту микроорганизмов-продуцентов от ближайшего бактериального окружения. Воздействуя на связанные с пептидогликаном клеточной стенки аутолизины, катионные пептиды вызывают активацию этих гидролитических ферментов, результатом которой является лизис и гибель атакуемых бактериальных клеток.

В работе представлены данные анализа бактериолитического действия на клетки *S. epidermidis* 33 катионного пептида варнерина и различных детергентов – додецилсульфата натрия, цетавлона и тритона Х-100. Аутолиз инициировали внесением в клеточные суспензии *S. epidermidis* 33 лизирующих факторов с дальнейшей инкубацией на шейкере при 150 об/мин и 37°С в течение 3–4 ч. Оценку динамики лизиса проводили измерением оптической плотности суспензий бактерий (OD600). По окончании инкубации аликвоты проб центрифугировали и супернатанты подвергали ренатурирующему электрофорезу в ПААГе, содержащем автоклавированные клетки *S. epidermidis* 33. После обработки гелей метиленовым синим, краситель отмывали водой до проявления прозрачных полос зон лизиса на синем фоне и проводили анализ степени гетерогенности аутолизинов в препаратах.

Результаты экспериментов показали, что варнерин и детергенты обладают выраженным литическим действием на бактерии *S. epidermidis* 33. Эффект детергентов был несколько слабее действия пептида, что проявлялось в меньшей гетерогенности зон активированных гидролаз. При этом обнаружено что, препараты аутолизатов содержали помимо общих фракций, характерные только для активации каждым из использованных литических факторов. Таким образом, профили активируемых пептидом и детергентами фракций пептидогликан-гидролаз существенно различаются.

Работа поддержана грантами РФФИ № 10-04-96086-р_урал_а, Программ Президиума РАН «МКБ» № 09-П-4-1019 и УрО РАН № 09-М-14-2002, офи-10-14-12-НАБ.

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРИРОДНЫХ АНАЛЬГЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ АНЕМОНЫ *HETERACTIS CRISPA*

Королькова Ю.В., Мошарова И.В., Андреев Я.А., Гришин Е.В.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: july@ibch.ru
http://www.ibch.ru/about/history/personalia/740

Современный способ направленной терапии болевых симптомов – активное воздействие на рецепторы, которые непосредственно воспринимают болевые стимулы и/или медиаторы воспаления. Открытые недавно природные пептиды APHC1-3 из экстракта анемоны *Heteractis crispa* проявляют значительный анальгетический эффект в различных моделях боли *in vivo*. Было показано, что пептид APHC1 на 30–40% ингибируют проводимость экспрессированных в ооцитах каналов TRPV1.

Изучение действия анальгетических пептидов APHC1-3 проводилось на стабильной линии клеток CHO, экспрессирующей рецептор TRPV1. Данная линия была получена с использованием T-REx System (Invitrogene). Клетки, экспрессирующие рецептор, прокрашивались Ca^{2+}-чувствительными флуоресцентными зондами (Fluo-4), и исследовалось влияние различных концентраций пептидов на Ca^{2+} сигналы, индуцируемые при стимуляции клеток агонистами рецепторов (капсаицин, pH, температура). Был использован метод флуоресцентной спектроскопии в комбинации с применением планшетного спектрофотометра с интегрированной автоматической системой дозирования жидкостей NOVOstar (BMG LABTECH) и прибора RT-PCR (ДНК-Технология). Было показано, что пептиды APHC1 и APHC3, в отличие от капсазепина – известного блокатора TRPV1 каналов, не вызывают значительного падения Ca^{2+} ответа клеток при однократной активации клеток капсаицином, а также при приложении pH=6.0–5.5 и повышенной температуры (44˚C), однако, при применении слабого активационного стимула (pH 6.5) APHC1 и APHC3 значительно снижают кальциевый ответ на последующий капсаициновый стимул. Полученные данные свидетельствуют о более сложном механизме действия пептидов, затрагивающего различные переходные состояния рецептора во время активации-десенсетизации.

Показано, что данная клеточная система может быть использована для быстрого скрининга и поиска новых активных соединений по отношению к TRPV1-рецепторам, в том числе соединений, проявляющих модулирующую активность.

ВЛИЯНИЕ N-КОНЦЕВЫХ МОДИФИКАЦИЙ α-КОНОТОКСИНА MII НА ЕГО ФИЗИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ

Крюкова Е.В.[1], Сурин А.М.[2], Струков А.С.[1], Жмак М.Н.[1], Кашеверов И.Е.[1]

[1]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
[2]Научный центр здоровья детей РАМН, 119991 Москва, Ломоносовский просп., 2/62

E-mail: evkr@mail.ru

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР) нейронального типа участвуют в возникновении никотиновой зависимости, нейропатическом болевом синдроме, вовлечены в процессы мышления, участвуя в обучении и памяти, а нарушения их функционирования служат причиной или сопровождают различные психические и нейродегенеративные заболевания. Химические соединения, специфически действующие на определенные подтипы нАХР, могут являться новыми лекарственными препаратами. В связи с этим актуальна идентификация в норме и при патологиях отдельных подтипов нАХР, как возможных индикаторов и мишеней заболеваний. Преимущество α-конотоксинов, как инструмента для детекции нАХР, состоит в их разнообразии и возможности тонко идентифицировать различные подтипы рецепторов. α-Конотоксин MII из яда моллюска *Conus magnus* обладает сродством в наномолярном диапазоне к α6 и α3β2 подтипам нейрональных нАХР и, в отличие от других конотоксинов, медленнее отмывается из комплексов с рецептором в электрофизиологических экспериментах.

Нами синтезированы два аналога α-конотоксина MII, различающиеся модификациями по N-концевому остатку глицина флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) и реагентом Болтон-Хантера, а также тирозиновый аналог MII-Yo. В качестве модельной системы для оценки активности полученных производных конотоксинов использованы клетки нейробластомы человека SH-SY5Y, которые экспрессируют α3, α5, α7 и β2, β4 субъединицы нАХР нейронального типа. Физиологическая активность синтезированных аналогов оценивалась по подавлению индуцированного никотином входа натрия и кальция в клетки нейробластомы SH-SY5Y.

В результате проведенных экспериментов установлено, что производное Болтон-Хантера обладает большей активностью и более пригодно для синтеза йодированных производных, чем тирозиновый аналог. Также показано, что FITC модификация значительно ослабляет ингбирующий эффект MII.

РОЛЬ ИОНОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО КАЛЬЦИЯ НА РАННИХ СТАДИЯХ ПОЛИКЛОНАЛЬНОЙ АКТИВАЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Литвинов И.С., Мерсиянова И.В., Кирпичников М.П.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: lis@mx.ibch.ru, imers@mail.ru

Организм человека поддерживает ионный гомеостаз внутренних жидкостей с поразительной точностью. Именно эти условия принято считать наиболее оптимальными для функционирования организма и клеток иммунной системы. Величина концентрации ионов внеклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_o$) в периферической крови человека (ПКЧ) является важной составляющей гомеостаза. Для нее определены верхняя 1,10 мМ и нижняя 0,45 мМ границы нормы, а длительное отклонение от этих значений считается признаком патологии. Общий сепсис, СПИД, туберкулез и некоторые лейкозы, часто приводят к длительным отклонениям величины $[Ca^{2+}]_o$ в ПКЧ от нормы.

Активация ПКЧ приводила к резкому росту доли $CD4^+CD69^+$ клеток с 1÷2% в исходной популяции до 65÷80% среди всех $CD4^+$ Т-лимфоцитов. Зависимость доли активированных $CD4^+CD69^+$ Т-клеток от значений $[Ca2^+]_o$ в исследуемом интервале от 1,5 мМ до 0,1 мМ имеет два ярко выраженных максимума, различающихся по ширине и положению, а также локальный минимум между ними. Первый из них – широкий, расположен большей частью в пределах нормы для $[Ca2^+]_o$ в ПКЧ и частично «заходит» в область патологических значений для этого иона. Положение этого максимума чаще всего смещено к нижней границе нормы. Второй из них – узкий, находится в области между нижней границей нормы и минимальными физиологическими значениями для $[Ca2^+]_o$ в ПКЧ. При дальнейшем снижении величины $[Ca2^+]_o$ до значений ниже физиологических (0,1 мМ и меньше) в популяции уже не обнаруживалось более 1÷3% $CD4^+CD69^+$ Т-клеток.

Активированные $CD4^+$ Т-клетки синтезировали молекулы ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-17А, ИФН-γ и ФНО-α. Зависимость доли активированных $CD4^+$ Т-клеток, продуцирующих эти цитокины от значений $[Ca^{2+}]_o$ в исследуемом интервале также имеет два ярко выраженных максимума. Аналогичным же образом зависела от значений $[Ca^{2+}]_o$ и общая продукция клетками ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12р40, ИЛ-12р70, ИЛ-17А, ИФН-γ и ФНО-α. Скорее всего, одна из субпопуляции $CD4^+$ Т-клеток специализируется именно на «работе» в условиях патологии.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ РАСЩЕПЛЕНИЯ БЕЛКОВ

Мухин В.А., Пискунович Д.И.

Полярный НИИ морского рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича, 183038 Мурманск, ул. Книповича, 6

E-mail: vmukhin@pinro.ru

Степень деструкции белков – важнейшая характеристика любого белоксодержащего сырья или продукта, так как именно этот показатель, главным образом, определяет его качество и пищевую пригодность. Кроме того, этот показатель косвенно отражает активность протеолитических ферментов.

Определяющим процессом в ходе гидролиза белков является накопление низкомолекулярных продуктов белковой деградации. Перманентный распад белков происходит в процессе хранения любой белоксодержащей продукции. Как правило, происходит ферментативный распад под воздействием собственных протеиназ, а также протеолитических ферментов размножающихся микроорганизмов. Это классические ферментативные процессы и их интенсивность зависит от температуры и pH среды, а также от ряда других менее значимых факторов.

На протяжении многолетних исследований в лаборатории биохимии Полярного Института мы оценивали степень деградации белков различными способами. Объектом исследований являлись, главным образом, белки рыбного происхождения.

Мы использовали следующие критерии и методы: показатель степени гидролиза белков – соотношение аминного ($N_{ам}$) и общего ($N_{общ}$) азота; соотношение свободных аминокислот (САК) и крупных белков; показатель ($N_{ам}$)/($N_{общ}$); соотношение небелкового азота к общему ($N_{нб}$)/($N_{общ}$); изменение оптической плотности растворов белковых гидролизатов при 280 нм; определение молекулярно-массового состава пептидов методом гель-фильтрации на колонке сефадекса G-100, а также ВЭЖХ и электрофорезом в ПААГ. Применялись и некоторые другие методы.

Каждый из упомянутых методов имеет свои недостатки и преимущества.

Вероятно, не существует универсального показателя, который единственно объективно отражал бы глубину и степень расщепления белков, поэтому мы считаем, что при детальном описании свойств белков (равно как и протеиназ) необходимо приводить данные, полученные с применением различных методов.

ОТСТАВЛЕННОЕ ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ СОЙМОРФИН-5-АМИДА НА ОБУЧЕНИЕ С ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМ ПОДКРЕПЛЕНИЕМ

Сарычева Н.Ю.[1], Иванова Е.А.[1], Дубынин В.А.[1], Каменский А.А.[1], Калихевич В.Н.[2], Ардемасова З.А.[2]

[1]МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/12
[2]Санкт-Петербургский государственный университет, 199034 С.-Петербург, Университетская наб., 7/9

E-mail: katya.kilgor@gmail.com

В дополнение к уже известным экзорфинам (казоморфинам, рубисколинам, цитохрофинам) недавно была открыта новая их группа – сойморфины, образующиеся при расщеплении β-конглицинина сои. Это первые опиоидные пептиды растительного происхождения, для которых показана избирательная активация μ-типа опиоидных рецепторов. Действие сойморфинов на организм, в частности, на ЦНС, практически не изучено. Известно, что эти пептиды обладают анксиолитическим действием при внутрибрюшинном и пероральном введении [Ohinata et al., 2007].

Ранее нами было показано, что экзорфины способны изменять поведение не только при однократном, но и при хроническом введении, оказывая отставленное «программирующее» действие на созревание мозга детёнышей [Дубынин, Каменский, 2010]. В данной работе изучалось отставленное влияние сойморфин-5-амида (YPFVV-NH2) на обучение с положительным подкреплением. Пептид вводили беспородным крысам в течение первых 14 дней жизни (1 мг/кг, в/б), обучение осуществляли в лабиринте с пищевым подкреплением в возрасте 43–48 дней. Показано, что действие пептида на способность к обучению зависит от пола животных. У самцов подопытной группы количество ошибок и время нахождения подкрепления оказались меньше, чем в контроле; различия увеличились к последнему дню обучения. Напротив, у самок подопытной группы число ошибок и время реакции были больше, чем в контроле. Эти отличия также проявились сильнее в конце обучения. При переучивании в зеркальном варианте лабиринта выявлены аналогичные эффекты пептида. Можно заключить, что введение сойморфина в первые дни жизни значимо изменяет способность крыс к обучению; очевидно, это связано с действием препарата на центральные μ-рецепторы, следствием чего стали изменения в развитии некоторых участков мозга. Ранее подобные эффекты были описаны нами для β-казоморфина-7, изменяющего, прежде всего, активность 5HT-системы в различных отделах ЦНС.

Изучение сойморфинов проводится в рамках исследования роли различных компонентов детского питания в развитии мозга новорожденных.

УРОВЕНЬ ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА В ТКАНЯХ РЫБ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ СРЕДЫ

Суховская И.В., Смирнов Л.П., Борвинская Е.В., Немова Н.Н.

Учреждение РАН Институт биологии КарНЦ РАН,
185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

E-mail: suhovska@krc.karelia.ru

С помощью флуориметрического метода проведено исследование содержания восстановленного глутатиона, кофактора второго этапа биотрансформации ксенобиотиков, в печени и мышцах щуки, плотвы и сига, выловленных из оз. Каменное (Костомукшский заповедник) и хвостохранилища Костомукшского горно-обогатительного комбината (ГОК). Было показано, что концентрация глутатиона во всех исследованных тканях рыб из хвостохранилища была ниже по сравнению с рыбами из оз. Каменное. Известно, что глутатион увеличивает резистентность клеток к токсическим веществам, а также играет ключевую роль в защите от последствий окислительного стресса. При его недостатке часто фиксируются серьезные нарушения тканевых функций. Соответственно, более низкая концентрация восстановленного глутатиона в тканях исследованных рыб, выловленных в хвостохранилище Костомукшского ГОКа, по сравнению с контрольной группой указывает на снижение адаптивных возможностей организмов рыб в условиях данного типа загрязнения.

Интересно отметить, что уровень восстановленного глутатиона во всех тканях щуки был в несколько раз ниже по сравнению с другими исследованными видами. Вероятно, это связано с экологическим статусом того или иного вида рыб. Сиг и плотва – рыбы со смешанным типом питания, тогда как щука – облигатный хищник. Обнаружена также возрастная зависимость содержания восстановленного глутатиона в тканях исследованных рыб.

Исследования различных тканей (печень, мышцы, почки, головной мозг) форели садкового содержания в возрасте 1+ показали, что наибольшая концентрация глутатиона выявлена в печени и почках рыб, тогда как в жабрах и мышцах этот показатель был наименьший. По нашему мнению, эти различия связаны с функциональным предназначением той или иной ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Программы Президента РФ «Ведущие научные школы России» НШ № 3731.2010.4 и Программы Президиума РАН «Биологическое разнообразие» 2009–2011 гг.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА ВНУТРИ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ МИКРОКАПСУЛ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ pH СРЕДЫ

Шабарчина Л.И.[1], Дубровский А.В.[1], Санталова И.М., Казакова Л.И.[1], Мошков Д.А.[1], Аполонник Н.В.[2]

[1]*Учреждение РАН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская обл.*
[2]*МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

E-mail: shabarchina@rambler.ru

Полиэлектролитные микрокапсулы, изготавливаемые методом поочередного наслаивания противоположно заряженных полиэлектролитов на дисперсные частицы микроразмеров с последующим разрушением и удалением этих частиц, являются объектами новой быстро развивающийся области – полимерной нанотехнологии.

Такие микрокапсулы являются многофункциональными объектами. Они могут быть использованы в качестве микрореакторов для проведения химических и биохимических реакций в малом объёме; для инкапсулирования макромолекул, при котором оболочка микрокапсулы будет защищать их от негативного воздействия извне. Впечатляющими являются результаты по их использованию в качестве матриц для получения металлических полупроницаемых оболочек с магнитными и проводящими свойствами. В последнее время крайне перспективным является капсулирование различных ферментов, для успешного осуществления которого необходимо знать, как распределяется инкапсулированный белок внутри полиэлектролитных микрокапсул.

В работе методами конфокальной и электронной микрскопии установлено распределение белка, заполняющего объем таких микрокапсул в зависимости от pH среды. Оно возможно в двух вариантах: равномерное распределение белка по всему объему и концентрирование его агрегатов в пристенковом пространстве. Нами был закапсулирован ферритин – электронноплотный белок, который хорошо виден в электронный микроскоп. Нами было показано, что в случае, когда pH равен 5,2, (что соответствует изоэлектрической точке белка) молекулы протеина располагаются преимущественно вблизи внутренней поверхности оболочки. При смещении pH в кислую область, наблюдается равномерное распределение белка по всему объему микрокапсулы. Такое его поведение обусловлено, по-видимому, тем, что молекулы белка, заряженные преимущественно нейтрально возле изоэлектрической точки, хорошо взаимодействуют с внутренней поверхностью оболочки микрокапсулы. В случае же смещения pH в кислую область молекулы белка заряжаются положительно и отталкиваются от внутреннего полиэлектролитного слоя оболочки, который сформирован из положительно заряженного полиаллиламина.

Секция 6

Взаимосвязь структура – функция. Механизмы действия

МЕХАНИЗМ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ СЕЛЕКТИВНОСТИ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Т ИЗ *THERMOACTINOMYCES VULGARIS*

Акпаров В.Х.[1], Тимофеев В.И.[2], Куранова И.П.[2]

[1]*Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1*
[2]*Учреждение РАН Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН, 119333 Москва, Ленинский просп., 56*

E-mail: valery@akparov.ru

Для рационального дизайна ферментов с заданной селективностью необходимо изучение природных механизмов регуляции селективности ферментов. Удобным объектом для этого является карбоксипептидаза Т (КПТ) *Thermoactinomyces vulgaris*. В КПТ присутствует 4 структурно связанных иона кальция, удаление которых приводит к двукратному уменьшению эффективности катализа положительно и отрицательно заряженных трипептидных субстратов с одновременным 1,5 кратным улучшением эффективности катализа гидрофобных субстратов (Гришин и др., 2008). Эти ионы кальция не входят в состав активного центра и являются дистантными детерминантами субстратной специфичности КПТ. С разрешением 1,69 Å получена кристаллическая структура КПТ, лишенной структурных ионов кальция. Проведено её сравнение со структурой, полученной ранее (Teplyakov A., 1991) в присутствии ионов кальция. Обнаружены изменения конформации сайтов связывания кальция (поворот карбонила 313 остатка на 180 градусов, изменение подвижности пептидной цепи), с чем может быть связано уменьшение термостабильности лишенной кальция КПТ. Произошло также смещение положения бокового радикала Glu61, расположенного в другой зоне связывания кальция, и сдвиг пептидной цепи, который визуально прослеживается до 65-го остатка. Произошли изменения во вторичной структуре фермента (укорочение некоторых альфа-спиралей и бета-структур). Удалением кальция из своих сайтов в конечном итоге вызвало увеличение подвижности аминокислотных остатков в районе Glu250, что привело к появлению двух молекул кристаллизационной воды, связанной с его боковым радикалом. Произошел сдвиг кислорода пептидной группы Ala251, входящего в состав S1'-субсайта КПТ, в положение, более удобное для образования водородной связи с молекулой кристаллизационной воды № 499 непосредственно в полости S1'-субсайта. Это несколько уменьшило способность последней образовывать водородные связи с гидрофильными лигандами (например, с боковым радикалом аргинина), что может быть причиной наблюдаемого изменения субстратной специфичности КПТ.

Работа поддержана грантом РФФИ № 10-04-01541.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НОВОГО АНАЛОГА ФРАГМЕНТА АКТГ НА УРОВЕНЬ ТРЕВОЖНОСТИ ЖИВОТНЫХ В НОРМЕ И НА ФОНЕ ОСТРОГО СТРЕССОГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Глазова Н.Ю.[1], Левицкая Н.Г.[1], Атанов М.С.[2], Себенцова Е.А.[1], Андреева Л.А.[1], Манченко Д.М.[2], Мясоедов Н.Ф.[1]

[1]Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2
[2]МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/12

E-mail:tusy-g@yandex.ru

Многочисленные исследования показали, что меланокортины (АКТГ/МСГ-подобные пептиды) обладают широким спектром физиологической активности. Пептиды этого класса оказывают влияние на процессы памяти и обучения, сердечно-сосудистую систему, обладают нейропротекторным действием, модулируют болевую чувствительность. Также показано, что меланокортины играют важную роль в регуляции эмоционального состояния животных. Проведенные ранее исследования позволяют предположить, что присоединение последовательности PGP к различным фрагментам АКТГ приведет к увеличению выраженности их эффектов.

В работе исследовали влияние пептида, структура которого включает в себя последовательность природного фрагмента АКТГ и трипептид PGP, на уровень тревожности белых крыс в норме и после острого стрессогенного воздействия. В качестве стрессогенного воздействия использовали неизбегаемое электро-болевое раздражение. Уровень тревожности животных оценивали в тестах приподнятый крестообразный лабиринт, темная-светлая камера и О-образный лабиринт. Было показано, что пептид в дозе 50 и 250 мкг/кг вызывает снижение тревожности животных через 15 мин после введения. Через 24 часа после инъекции уменьшение тревожности отмечалось в группе крыс, получавших пептид в дозе 250 мкг/кг. Использованное стрессогенное воздействие вызывало увеличение тревожности животных как через 15 мин, так и через 24 часа после стресса относительно нестрессированного контроля. В группе крыс, получавших инъекцию пептида в дозе 50 и 250 мкг/кг, уровень тревожности был достоверно снижен относительно группы крыс, перенесших стрессогенное воздействие. Более того, введение пептида приводило к достоверному снижению тревожности по сравнению с группой нестрессированного контроля. Следовательно, новый синтетический аналог фрагмента АКТГ обладает выраженной анксиолитической активностью.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (ГК №П1057) и РФФИ (грант № 11-04-01329).

ВЗАИМОСВЯЗЬ СТРУКТУРЫ И ШАПЕРОНО-ПОДОБНОЙ АКТИВНОСТИ БЕТА-КАЗЕИНА

Захарченко Н.Л.[1], Коннова Т.А.[1], Гоголева Н.Е.[1], Зуев Ю.Ф.[1], Haertlé T.[2]

[1]Учреждение РАН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111 Казань, ул. Лобачевского, 2/31
[2]Национальный институт агрономических исследований, Нант (Франция)

E-mail: natasha@mail.knc.ru

В последнее время к белкам, обладающим шапероно-подобной активностью, стали относить семейство казеинов, и в первую очередь, бета-казеин, который способен предохранять от агрегации не только сывороточные белки молока, но и ингибировать образование амилоидных фибрилл. Молекулы бета-казеина амфифильны, обладают нечетко выраженной и подвижной структурой, а также демонстрируют сильную тенденцию к самоассоциации в сферические стабильные мицелло-подобные структуры.

Основной целью работы являлось исследование структуры и агрегационных свойств природной и модифицированных форм бета-казеина, а также их шапероно-подобной активности по отношению к ряду целевых белков. Для выяснения взаимосвязи структурных особенностей бета-казеина и его функциональной активности нарабатывались и исследовались рекомбинантные формы белка с минорными модификациями полипептидной цепи. А именно, в различные участки структуры вводились один или два цистеиновых остатка, что, при окислении сульфо-групп, приводило к образованию олигомерных форм белка.

В докладе рассмотрены результаты сравнительных исследований структуры и агрегационных свойств природной и модифицированных форм бета-казеина. Показано, что димерные и олигомерные формы бета-казеина существенно отличаются по своим физико-химическим свойствам от мономерных аналогов. Введение цистеина в концевую или центральную область полипептидной цепи вызывали спонтанную полимеризацию бета-казеина, кроме того, одновременная замена в двух концевых областях вела к формированию олигомеров и «кольцевой» формы белка. В работе проанализированы возможные молекулярные механизмы шапероно-подобного действия различных рекомбинантных форм бета-казеина в мономерном и полимерном состояниях. Показано, что полимеризация и формирование мицелл бета-казеина оказывают значительное влияние на шапероно-подобную активность белка.

ВЛИЯНИЕ ФРАГМЕНТА КОЛЛАГЕНА НА МОРФОЛОГИЮ И ЦИТОСКЕЛЕТ ФИБРОБЛАСТОВ МЫШИ

Иванова В.П.[1], Ковалева З.В.[2], Анохина В.В.[3], Сорочинская Е.И.[3], Кривченко А.И.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223 С.-Петербург, пр. Тореза, 44*
[2]*Учреждение РАН Институт цитологии РАН, С.-Петербург*
[3]*СПбГУ, С.-Петербург*

E-mail: valet@iephb.ru

Известно, что белок-белковые взаимодействия обеспечивают контроль формирования клеточных контактов и передачу сигнала через клеточную мембрану. Существуют опорные белки, которые, благодаря наличию в их последовательностях белок-связывающих доменов или модулей, создают основу для взаимодействий с различными полипептидами. Одним из таких белков, который взаимодействует не только с белками внеклеточного матрикса, но и со специфическими клеточными рецепторами (интегринами и др.) является коллаген. Имеются многочисленные факты, свидетельствующие о наличии в первичной структуре молекул коллагенов пептидных доменов, которые обеспечивают связывание коллагена со специфическими лигандами. Кроме лиганд-связывающих доменов молекулы коллагена содержат пептидные модули с потенциальной регуляторной активностью, которая проявляется только после выщепления этих фрагментов в ходе неполного протеолиза молекул коллагена.

Мы исследовали влияние повторяющегося трипептидного фрагмента коллагена на морфологию и актиновый цитоскелет эмбриональных фибробластов мыши линии STO. Клетки обрабатывали пептидом (10^{-6} M) и оценивали изменение формы клеток в течение 4 час с помощью фазово-контрастной микроскопии. Для визуализации микрофиламентов окрашивали F-актин флуоресцентным красителем родамин-фаллоидином. Клетки пересевали на покровные стекла за 60 мин до начала окраски. Установлено, что наибольшее влияние на морфологию клеток пептид оказывал в течение первых 30 мин распластывания фибробластов на твердой поверхности. Пептид увеличивал скорость образования филоподий и количество актиновых микрофиламентов. По-видимому, пептид, активируя процессы полимеризации актина, способствует как ускорению формирования мембранных протрузий, так и их удлинению. Создание нетоксических лекарственных препаратов на основе природных соединений, которые обладали бы свойством ускорять или ингибировать ламеллиподиальную и филоподиальную активность клеток, остается важной задачей в связи с необходимостью иметь средства для координации направленного движения клеток с заданными свойствами в поврежденные зоны тканей и органов.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЛИЯНИЯ ЭПИТАЛОНА И МЕЛАТОНИНА НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРЫС

Илюха В.А.[1,2], Виноградова И.А.[2], Ильина Т.Н.[1], Узенбаева Л.Б.[1], Хижкин Е.А.[1], Кижина А.Г.[1], Анисимов В.Н.[3], Хавинсон В.Х.[4]

[1]Учреждение РАН Институт биологии КарНЦ РАН,
185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11
[2]ФГОУ ВПО Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск
[3]НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова, С.-Петербург
[4]Институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, С.-Петербург

E-mail: ilyukha@bio.krc.karelia.ru

Пинеальная железа играет существенную роль в координации многих физиологических функций у млекопитающих благодаря влиянию на иммунную, нейроэндокринную систему и центральные механизмы регуляции. С возрастом происходит ослабление её функционирования, с чем связывают процесс старения организма. Введением синтетического тетрапептида эпиталона (ЭТ; Ala-Glu-Asp-Gly) или экзогенного мелатонина (МТ) можно «омолаживать» железу и опосредовано влиять на уровень гормона в сыворотке крови и тканях.

Целью нашего исследования было сравнение влияния ЭТ и МТ на состояние систем генерации и тушения активных форм кислорода, морфофункциональные особенности лейкоцитов крови крыс в процессе старения (6, 12, 18 и 24 месяца). Исследование эффектов препарата проводилось на фоне нормального, усиленного или ослабленного функционирования эпифиза – при регулярном чередовании света и темноты (12/12), постоянной темноте и постоянном освещении, соответственно, а также при естественном фотопериоде.

Эффекты препаратов зависели от уровня эндогенного МТ, который определяется возрастом животных, световым режимом и сезоном года. У крыс, содержавшихся при постоянном и естественном освещении, отмечено максимальное количество изменений под влиянием препаратов, причём, в первом случае действие ЭТ и МТ носило преимущественно однонаправленный, а во втором – разнонаправленный характер. Функциональное усиление работы эпифиза постоянной темнотой и препараты оказывали сходное влияние на изученные параметры. Нормализующие эффекты ЭТ и МТ сильнее проявляются на фоне ослабления функционирования пинеальной железы у стареющих и старых животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Президента РФ НШ-3731.2010.4.

НОВЫЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БЕЛКОВ С НЕИЗВЕСТНОЙ ФУНКЦИЕЙ

Горбачева М.А.[1,2], Ярош А.Г.[1], Корженевский Д.А.[1], Яковлев А.К.[1], Дороватовский П.В. [1], Липкин А.В.[1]

[1]НИЦ «Курчатовский институт», 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 1
[2]Учреждение РАН Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва, Ленинский просп., 33., стр.2

E-mail: gorbacheva-marina@yandex.ru

В последнее десятилетие, когда каждый год выходят сиквенсы десятков геномов и расшифровываются сотни новых пространственных структур макромолекул, всё более критичным становится отставание функциональных исследований белков. Белки с ещё не изученными функциями на сегодняшний день составляют 30–40% от общего количества белков, закодированных в любом бактериальном геноме, и даже больший процент в случае эукариотических геномов, включая геном человека. Поэтому развитие новых подходов к изучению белков с неизвестными функциями является актуальной научной задачей и имеет большое практическое значение.

Новый метод, названный кристаллографическим скринингом, будет использован для определения неизвестной функции и фармакологического потенциала белка с помощью изучения пространственной структуры самого белка и его комплексов с низкомолекулярными лигандами. Идентификации неизвестных лигандов будет проведена путём получения набора кристаллов для каждого из исследуемых белков, которые перед проведением рентгеноструктурного эксперимента будут проинкубированы с набором коктейлей, состоящих из смеси низкомолекулярных элементарных метаболитов, представляющих разные классы органических соединений: сахара, нуклеотиды и их производные, флавины и т.д. Метаболит наиболее похожий на эндогенный белковый лиганд с наибольшей вероятностью свяжется с закристаллизованным белком, и будет определён при обработке данных рентгеноструктурного анализа.

В настоящее время нами получены, выделены и очищены 15 бактериальных белков, предположительно способных связывать эндогенные лиганды. Проводится скрининг условий кристаллизации и кристаллографический скрининг метаболитов.

Работа выполняется при финансовой поддержке Министерства образования и науки Государственный контракт № 16.512.11.2175

ОЦЕНКА МЕХАНИЗМОВ ВЛИЯНИЯ АНАЛОГА АКТГ(4-10) СЕМАКСА НА СТРЕСС-ВЫЗВАННЫЕ АНАЛЬГЕЗИЮ И ПОВЕДЕНИЕ БЕЛЫХ КРЫС

Манченко Д.М.[1], Виленский Д.А.[1], Левицкая Н.Г.[2], Андреева Л.А.[2], Каменский А.А.[1], Мясоедов Н.Ф.[2]

[1]МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/12
[2]Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2

E-mail: dashishka@mail.ru

Стресс – неотъемлемая часть нашей жизни. Длительное стрессогенное воздействие приводит к нарушению деятельности многих систем организма. В формировании стрессорного ответа принимают участие различные медиаторные системы, в том числе меланокортиновая система. Меланокортины (АКТГ/МСГ-подобные пептиды) влияют на поведение, способность к обучению и память, болевую чувствительность и др. Семакс является аналогом АКТГ(4-10) пролонгированного действия. Ранее было показано, что Семакс проявляет анксиолитическое действие в модели тревожности, вызванной введением ХЦК. Целью представленной работы стало исследование влияния Семакса на болевую чувствительность и поведение животных в различных моделях острого стресса. Эксперименты проводили на самцах белых нелинейных крыс массой 200–250 г. В качестве стрессорного воздействия использовали неизбегаемое плавание при температуре 28°C (10 мин) или 12°C (5 мин) и электроболевое раздражение (10 мин). Семакс вводили внутрибрюшинно в дозах 0,05 и 0,5 мг/кг за 15 мин до стресса. Уровень тревожности оценивали в тестах «Норковая камера» и «Приподнятый крестообразный лабиринт», болевую чувствительность регистрировали в тесте «сдавливания задней лапы». В ответ на стрессорное воздействие у контрольных крыс наблюдалось увеличение тревожности и возрастание болевого порога. Предварительное введение налоксона снижало анальгезию, вызванную электроболевым раздражением и неизбегаемым плаванием в теплой воде, что свидетельствует об опиоидной форме стресс-вызванной анальгезии (СВА). Введение семакса ослабляло опиоидную форму СВА и не влияло на поведение крыс. Корреляции между изменениями поведения и выраженностью СВА зарегистрировано не было. Можно предположить, что действие семакса на болевую чувствительность и поведение зависит от природы стрессорного воздействия. Вероятно, снижение СВА связано с влиянием семакса на активность опиоидной системы, а его воздействие на поведение опосредуется другими медиаторными системами. Следовательно, в основе влияние семакса на стресс-вызванные поведение и анальгезию лежат различные механизмы.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (ГК №П1057) и РФФИ (грант № 11-04-01329).

НОВЫЕ МОДУЛЯТОРЫ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ

Никольский А.С., Василевский А.А., Гришин Е.В.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: annikolsky@gmail.com

Потенциал-зависимые натриевые каналы – важнейшие компоненты нервной системы, обеспечивающие восходящую фазу потенциала действия. Неудивительно поэтому, что эти белки являются мишенью действия разнообразных биологически активных веществ, многие из которых находят применение в медицине и биотехнологии. Общепринятая классификация лигандов натриевых каналов основана на предполагаемых местах связывания лигандов с каналом (так называемых рецепторных сайтах) и однозначно соответствующих им эффектах. В результате комплексных исследований, проводимых в ИБХ РАН, было выделено и охарактеризовано множество полипептидных модуляторов натриевых каналов из природных ядов. Например, из европейских и среднеазиатских пауков *Agelena orientalis*, *Heriaeus melloteei* и *Misumena vatia* были получены вещества, проявляющие различную активность (блокаторы, активаторы) в отношении различных типов натриевых каналов (млекопитающих, насекомых). Исследование механизма действия токсинов из *A. orientalis* выявило одновременное модулирование процессов активации и инактивации каналов насекомых. Этот и ряд других примеров показывают, что многообразие лигандов натриевых каналов не укладывается в узкие рамки существующей классификации, которая должна быть пересмотрена.

Работа поддержана грантами Президиума РАН (программа фундаментальных исследований «Молекулярная и клеточная биология»), Минобрнауки РФ (Госконтракты №№ П1388 и П818), РФФИ (№№ 10-04-90460 и 11-04-01606).

РИБОСОМ-ЗАВИСИМАЯ ГТФаза В НЕАКТИВНОМ СОСТОЯНИИ СПОСОБНА СВЯЗЫВАТЬ ГТФ

Никонов О.С., Столбоушкина Е.А., Никулин А.Н., Лазопуло А.М., Лазопуло С.М., Гарбер М.Б., Никонов С.В.

Учреждение РАН Институт белка РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 4, Московская обл.

E-mail: alik@vega.protres.ru

Фактор инициации трансляции 2 эукариот (eIF2) и архей (aIF2) в комплексе с ГТФ связывает метианилированную инициаторную тРНК и доставляет ее в Р-сайт малой рибосомной субчастицы. У архей и эукариот эти факторы являются гетеротримерными белками, состоящими из α, β и γ субъединиц, каждая из которых имеет определенные функции. γ-субъединица aIF2 представляет собой трехдоменный белок и принадлежит к семейству рибосом-зависимых ГТФаз. Наибольшее сходство γ-субъединица aIF2 имеет с эукариотическим фактором элонгации eEF1A и его бактериальным аналогом EF1A (EF-Tu). Для рибосом-зависимых ГТФаз было показано существование двух функциональных состояний – активного (в комплексе с ГТФ) и неактивного (в комплексе с ГДФ). В активном состоянии эти белки могут связывать аминоацилированную тРНК и рибосому. Как считалось ранее, состояние данных белков зависит от природы связанного нуклеотида. Характеристическими особенностями активного и неактивного состояний рибосом зависимых ГТФаз являются специфические конформации двух функционально важных подвижных участков их структуры, называемых участками-переключателями. В данной работе нами определена структура комплекса γ-субъединицы aIF2 с ГТФ с разрешением 2,8 Å. Асимметричная часть ячейки кристалла содержит 6 молекул комплекса. Ион магния не был найден в нуклеотид-связывающем кармане ни одной молекулы. В структуре комплекса aIF2γ•ГТФ участок-переключатель 2 занимает положение, соответствующее неактивному состоянию белка, тогда как участок-переключатель 1 сохраняет свою подвижность, и его конформация зависит только от кристаллических контактов. Эти данные показывают, что переход γ-субъединицы aIF2 из неактивного состояния в активное не зависит от связывания с ГТФ. По всей видимости, этот переход осуществляется при связывании с инициаторной метианилированной тРНК. Кроме того, было показано, что для связывания ГТФ γ-субъединицей aIF2 ион Mg^{2+} не является необходимым.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы МКБ РАН.

СВЯЗЬ ДЛИНЫ МЕЖДОМЕННОЙ ПЕРЕТЯЖКИ С КОНФОРМАЦИЕЙ РИБОСОМНОГО БЕЛКА L1

Никонова Е.Ю., Шкляева А.А., Костарева О.С., Габдулхаков А.Г., Тищенко С.В., Невская Н.А., Гарбер М.Б., Никонов С.В.

Учреждение РАН Институт белка РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 4, Московская обл.

E-mail: katya_nik@vega.protres.ru

Белок L1 – это первично-связывающийся рибосомный белок, который в комплексе с 23S рРНК образует один из боковых выступов большой субчастицы рибосомы. Белок состоит из двух доменов, которые соединены гибкой перетяжкой, образованной двумя противоположно направленными полипептидными цепями различной длины. Ранее было показано, что для бактериального белка L1 из *Thermus thermophilus* (TthL1) характерно наличие двух конформаций: закрытой (в случае изолированного белка) и открытой (в комплексе с РНК). В то же время, белки L1 из архей имеют открытую конформацию, как в изолированном, так и в РНК-связанном состоянии. Сравнение аминокислотных последовательностей архейных и бактериальных белков L1 выявило отличие в длине короткой цепи междоменной перетяжки: у бактериальных белков она состоит из 3 аминокислотных остатков, а у архейных – из двух. Структурный анализ показал, что при укороченной перетяжке переход бактериального белка L1 в закрытую форму может быть затруднен, т.к. укорочение цепи в этом районе на один остаток может значительно уменьшить подвижность доменов. Нами была получена мутантная форма белка TthL1(-A) с делецией аланина в короткой цепи междоменной перетяжки, белок был закристаллизован, его структура определена с разрешением 1.95 Å. Мутация привела к расхождению и повороту доменов белка друг относительно друга. Кроме того, мы получили мутантную форму архейного белка L1 из *Methanococcus jannaschii* MjaL1(+A) с удлиненной на один аланин междоменной перетяжкой. Такой белок был закристаллизован, и его структура была определена с разрешением 3.0 Å. В этом случае открытая конформация белка сохранилась, домены белка сблизились лишь незначительно. По всей видимости, для увеличения гибкости междоменной перетяжки и как следствие, возможности перехода MjaL1 в закрытую конформацию, необходимо удлинить цепь на глицин.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 10-04-00618) и Программы МКБ РАН.

ДЕЛЬТА-СОН ИНДУЦИРУЮЩИЙ ПЕПТИД (ДСИП) И ЕГО АНАЛОГИ В КАЧЕСТВЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ПРОТЕКТИВНЫХ СРЕДСТВ ПРИ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЦИТОСТАТИКОВ

Оноприенко Л.В.[1], Михалева И.И.[1], Прудченко И.А.[1], Ефремов Е.С.[1], Чикин Л.Д.[1], Якубовская Р.И.[2], Немцова Е.Р.[2], Безбородова О.А.[2]

[1]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
[2]ФГУ Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена, Москва, 2-ой Боткинский пр., 3

E-mail: onolv@mail.ru

Ранее нами при изучении онкопротективных свойств ДСИП и группы его аналогов было установлено, что ДСИП повышал противоопухолевую устойчивость животных в условиях инокуляции опухолевых клеток на фоне стрессового воздействия и тормозил метастазирование карциномы Льюиса после хирургического удаления опухоли. Исследования показали, что ДСИП и некоторые аналоги ограничивали также спонтанный канцерогенез и мутагенез при физиологическом старении. Полученные результаты свидетельствовали о перспективности использования соединений этой группы в онкологической практике. В продолжение этих работ было предпринято изучение онкопротективного потенциала ДСИП и родственных пептидов с целью выявления наиболее эффективных производных этой группы. Установлено, что пептиды в дополнение к выраженному непрямому антиоксидантному действию обладают и прямой антиоксидантной активностью на уровне эффектов витамина С и β-каротина. Изучение детоксицирующего действия пептидов проведено на нескольких моделях токсикоза. На модели токсикоза, индуцированного цитостатическим препаратом цисплатином, выявлено, что ДСИП и 3 аналога способствовали выраженному снижению токсичности препарата, что выражалось в 2–1,5-кратном снижении летальности животных. Один из исследованных аналогов проявил наибольший эффект, его 4-ех кратное применение на фоне использования цисплатина приводило к 3-кратному снижению летальности Этот аналог способствовал также уменьшению гепато- и нефротоксичности цитостатика. Сочетанное применение цитостатика с ДСИП или его активным аналогом у животных с карциномой Льюис не приводило к отмене терапевтического действия цитостатика. Таким образом, проведенные исследования показали целесообразность дальнейшего изучения детоксицирующего действия на модели токсикоза, индуцированного различными цитостатическими препаратами.

Работа поддержана Правительством Москвы.

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ МАКРОФАГОВ МОДИФИЦИРОВАННЫМИ ПЕПТИДНЫМИ ФРАГМЕНТАМИ IL-2 ЧЕЛОВЕКА

Оноприенко Л.В.[1], Михалева И.И.[1], Войтенков Б.О.[2], Иванов В.Т.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*
[2]*ООО Исследовательский центр «Комкон», С.-Петербург*

E-mail: onolv@mail.ru

Ранее нами при изучении функциональных свойств модифицированных синтетических пептидов из района последовательности 59-72 интерлейкина 2 человека было показано, что следующие пептиды:

Ac-Leu-Glu-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-OMe (**I**)
Ac-Glu-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-OMe (**II**)
Ac-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-OMe (**III**)

подавляют цитотоксическую реакцию и активный воспалительный ответ макрофагов *in vitro*, индуцированные такими стимуляторами классической активации макрофагов как, липополисахарид, 4-β-форбол-12-β-миристат-13-α-ацетат или бестатин. В серии экспериментов *in vivo* пептиды (**I**)-(**III**) проявили способность к восстановлению функции печени после ее токсического повреждения, а также стимулировали заживление кожных ран и ангиогенез.

Мы предполагаем, что возможным механизмом такой регенеративно-репаративной активности пептидов является их взаимодействие с α-субъединицей рецептора интерлейкина 2 человека (IL-2Rα), так как современные литературные данные указывают, что пептиды (**I**)-(**III**) расположены в одном из районов связывания IL-2 с IL-2Rα. Нашу гипотезу о связывании пептидов (**I**)-(**III**) с IL-2Rα подтверждают и эксперименты с использованием клеточной линии CTLL, которая способна пролиферировать только в присутствии IL-2. В присутствии пептида (**I**) в диапазоне концентраций 1,6–200 мкг/мл наблюдалась стимуляция роста клеток CTLL, предварительно инкубированных без IL-2 в течение 24 ч. При этом эффект пептида (**I**) в оптимальной концентрации (40 мкг/мл) был в 2,7 раза слабее, чем действие самого IL-2. Вероятно, пептиды (**I**)-(**III**), конкурируя с IL-2 за связывание с IL-2Rα, не способны, однако, обеспечить полноценное связывание, так как они лишь частично перекрывают район взаимодействия IL-2 с IL-2Rα. В результате между IL-2 и пептидами (**I**)-(**III**) возможна конкуренция за связывание с IL-2Rα, приводящая к подавлению цитотоксической активности макрофагов, свойственной состоянию их классической активации и индукции у макрофагов состояния, близкого к альтернативной активации.

СТЕРЕОСЕЛЕКТИВНОСТЬ МУТАНТНЫХ ФОРМ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗЫ ИЗ *E.COLI* αS149R И βF71L В РЕАКЦИЯХ АЦИЛИРОВАНИЯ АМИНОСОЕДИНЕНИЙ

Панин Н.В., Щербакова Т.А., Гуранда Д.Ф., Швядас В.К.

Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.73, к.622

E-mail: panin@belozersky.msu.ru

Пенициллинацилаза из *Escherichia coli* (КФ 3.5.1.11) – периплазматический гетеродимер с молекулярной массой 88 кДа, состоящий из α- и *β*- цепей, относится к семейству Ntn-гидролаз и известен, в основном, как катализатор гидролиза амидной связи в антибиотиках пенициллинового ряда. Фермент обладает высокой стереоселективностью по отношению в N-фенилацетильным производным аминокислот и способен эффективно катализировать не только гидролиз N-фенилацетил-L-аминокислот, но и стереоселективный ацильный перенос на L-аминокислоты в водной среде. Эти свойства фермента могут быть использованы для разделения рацематов неприродных альфа- и бета-аминокарбоновых и аминофосфоновых кислот. При переходе к производным аминоспиртов и первичных аминов фермент дикого типа теряет стереоселективность и поэтому была предпринята попытка увеличения стереоселективности пенициллинацилазы методами белковой инженерии. При изучении мутантных форм фермента были обнаружены препараты с улучшенной стереоселективностью по отношению к данному классу аминосоединений. Так, введение мутации αS149R приводила к 4-кратному увеличению стереоселективности в реакции ацилирования 2-аминобутанола амидом S-миндальной кислоты по сравнению с ферментом дикого типа. При введении мутации βF71L, наряду с 3-кратным увеличением стереоселективности в реакции ацилирования 2-аминобутанола амидом R-миндальной кислоты и 5-кратным увеличением стереоселективности в реакции гидролиза N-фенилацетилфенилаланинола, наблюдали существенное (5-кратное) улучшение эффективности ферментативного ацилирования. Изученные одиночные мутанты пенициллинацилазы обладали также более высокой каталитической активностью по отношению к 2-нитро-5-[(фенилацетил)амино] бензойной кислоте и измененным профилем субстратной специфичности по сравнению с ферментом дикого типа. Полученные результаты свидетельствуют о том, что каталитические свойства пенициллинацилазы дикого типа могут быть существенно улучшены путем введения мутаций и могут послужить основой для дизайна препаратов фермента с заданными свойствами.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (госконтракт № 02.740.11.0866)

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДИСТАМИЦИНА А С ХРОМАТИНОМ ЯДЕР ГЕПАТОЦИТОВ КРЫСЫ И ВЛИЯНИЕ НА МОДИФИКАЦИИ ГИСТОНОВ Н1 И Н3

Смирнова Т.А.[1,2], Прусов А.Н.[1], Коломийцева Г.Я.[1], Ванюшин Б.Ф.[1,2]

[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова 119991 Москва, ГСП-2, Ленинские горы, 1, стр.40
[2]Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, 127550 Москва

E-mail: smirnova@belozersky.msu.ru

Известно, что пептидный антибиотик дистамицин А (Дист) взаимодействует с ДНК, встраиваясь в минорную бороздку преимущественно АТ-областей. Дист, добавленный к изолированным интерфазным ядрам печени крысы, вызывает появление пика при 325–340 нм в спектре КД ядер, свидетельствующее об образовании комплекса Дист-ДНК в хроматине. Насыщение достигается при Дист/ДНК (моль/моль нуклеотидов) = 0,11–0,12 и соответствует ~1 молекуле Дист на 6 пар оснований ДНК в хроматине, что всего на ~20–25% меньше, чем для свободной ДНК, и позволяет предполагать, что молекулы Дист могут осуществлять посадку на ДНК в ядрах в присутствии белков. При избирательной экстракции гистона Н1 полиглутаминовой кислотой (ПГ) из обработанных Дист и контрольных ядер установлено, что в условиях насыщения Дист ослабляет взаимодействие с ДНК до 95% молекул Н1. При этом электронно-микроскопический анализ не выявил каких-либо изменений в структуре хроматина обработанных Дист ядер, а также в структуре хроматина таких ядер после их обработки ПГ.

Обнаружено, что в присутствии Дист *in vitro* повышается уровень модификации гистонов Н1 и Н3 в ядрах эндогенной метилтрансферазой, а также эндогенной и экзогенной фосфокиназами. Изменения удельной радиоактивности определялись концентрацией Дист. В частности, при инкубации ядер с [^{3}Н-метил]S-аденозилметионином удельная радиоактивность гистона Н1 по сравнению с контролем возрастала в 6 раз при молярном соотношении Дист/ ДНК ядер = 0,1.

Мы наблюдали также взаимовлияние метилирования и фосфорилирования гистонов в ядре. Таким образом, действие Дист на прочность связи гистона Н1 в ядре может влиять на модификационный статус гистонов и тем самым на функционирование ДНК.

БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ЦИТОХРОМА *C* : ДВА ПОДХОДА К ИЗУЧЕНИЮ САЙТОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С КОМПЛЕКСАМИ III И IV ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ

Черткова Р.В.[1], Островерхова Т.В.[1,2], Некрасов А.Н.[1], Долгих Д.А.[1,2], Кирпичников М.П.[1,2]

[1]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
[2]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.12

E-mail: cherita@inbox.ru

Основная функция гем-содержащего белка цитохрома *c* – перенос электронов от убихинол:цитохром *c*-оксидоредуктазы (комплекс III) на цитохром *c*-оксидазу (комплекс IV) дыхательной цепи. Известно, что ключевую роль в формировании активных комплексов цитохрома *c* с его редокс-партнерами играют электростатические взаимодействия между определенными остатками Lys цитохрома *c* и Asp/Glu редокс-партнеров. С целью максимального подавления способности взаимодействовать с комплексами III и IV нами был сконструирован ряд мутантных вариантов цитохрома *c*, содержащих множественные замены Lys, формирующих универсальный сайт связывания с белковыми редокс-партнерами. В ходе исследований специфической активности полученных белков было показано, что два варианта с шестью и один с восемью заменами неактивны в цитохром *c*-оксидазной реакции, а их способность восстанавливаться в убихинол:цитохром *c*-редуктазной реакции составляет не более 3% по сравнению с цитохромом *c* дикого типа. Полученные варианты цитохрома *c* могут использоваться в качестве детектора некоторых активных форм кислорода.

Второй подход к изучению активных сайтов взаимодействия цитохрома *c* с его редокс-партнерами основывался на методе анализа информационной структуры (АНИС). На основе данных АНИС-метода были сконструированы три варианта цитохрома *c* с мутациями в области остатков 76-83 («до» и «после» остатка Met-80 – лиганда гема). Исследование биологической активности полученных белков позволило обнаружить существенное снижение способности к переносу электрона в дыхательной цепи. Наибольшее снижение сукцинат:цитохром *c*-редуктазной активности митопластов печени крысы наблюдалось в присутствии мутантного варианта T78S/K79P (на 97%), а цитохром *c*-оксидазной активности – в присутствии мутантного варианта I81Y/A83Y/G84N (на 85%). Полученные данные свидетельствуют о наличии находящихся по разные стороны от Met-80 кластеров, избирательно взаимодействующих с белковыми комплексами III и IV дыхательной цепи.

ОЛИГОПЕПТИДНЫЕ АНАЛОГИ ПРОТЕИНА А: ПРОГНОЗ, СИНТЕЗ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С IgG

Шутова И.В., Мартинович В.П., Ермола Е.М., Рудаковская А.Г., Лапко А.В., Макаревич Д.А., Голубович В.П.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, ул. Купревича, 5, к.2, Беларусь

E-mail: shutova2001@mail.ru

Протеин А – это белок, выделенный с поверхности клеточной стенки золотистого стафилококка, который с высокой аффинностью связывает IgG человека. Рекомбинантный протеин А широко используется как в биохимических исследованиях, так и в экстракорпоральных терапевтических методах иммуноадсорбции для избирательного удаления из крови IgG.

Целью работы являлось получение олигопептидных аналогов участка связывания протеина А с Fc-фрагментом IgG человека, способных избирательно взаимодействовать с Fc-фрагментом тяжелой цепи IgG человека.

На первом этапе с помощью разработанных авторами программных средств был выявлен участок связывания протеина А с IgG. Из банка данных ProteinDataBank была импортирована пространственная структура комплекса B-домена протеина А с Fc-фрагментом IgG (PDB ID 1FC2) и определены ключевые аминокислотные остатки Phe124, Gln128, Gln129, Phe132 и Tyr133 протеина А, участвующие во взаимодействии с Fc-фрагментом IgG. Было предложено два структурных аналога участка связывания – тетрапептид Phe-Gln-Phe-Tyr-OMe и пентапептид Phe-Gln-Gln-Phe-Tyr-OMe.

Пептиды были получены классическими методами синтеза в растворе, для пентапептида Phe-Gln-Gln-Phe-Tyr-OMe была разработана восьмистадийная схема, для тетрапептида Phe-Gln-Phe-Tyr-OMe – шестистадийная. В качестве конденсирующего агента при образовании пептидной связи применяли диизопропилкарбодиимид, в качестве противорацемической добавки – 1-оксибензотриазол. Идентификацию целевых соединений выполняли методами количественного аминокислотного анализа и масс-спектрометрии, гомогенность подтверждали методами ТСХ и аналитической ВЭЖХ.

Методом ИФА с использованием набора «IgG общий – ИФА-БЕСТ» («Вектор-БЕСТ», Россия) было показано, что полученные пептиды образуют устойчивые комплексы с Fc-фрагментом IgG. Максимальный процент ингибирования связывания IgG с мечеными антителами составлял ~30% для тетрапептида Phe-Gln-Phe-Tyr-OMe и ~90% для пентапептида Phe-Gln-Gln-Phe-Tyr-OMe. Полученные результаты показывают, что спрогнозированные и синтезированные пептиды способны связываться с Fc-фрагментом IgG человека подобно нативному протеину А.

Секция 7

Химия и биология протеолитических ферментов

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА АДАМАЛИЗИНОПОДОБНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ *BACILLUS PUMILUS 3-19*

Балабан Н.П., Рудакова Н.Л., Данилова Ю.В., Шарипова М.Р.

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

E-mail: NellyBalaban@yandex.ru

Получен рекомбинантный штамм *B. subtilis* путем трансформации в протеиназодефицитный штамм *B. subtilis BG2036* плазмиды pSA1 с геном металлопротеиназы *B. pumilus 3-19.* Аминокислотная последовательность рекомбинантного белка MprBp, полученная на основании последовательности нуклеотидов секвенированного гена *mprBp,* позволила отнести фермент к семейству адамализинов/репролизинов клана метцинкинов.

Подобран состав питательной среды, обеспечивающий высокий уровень продукции металлоэндопептидазы MprBp в культуральной жидкости рекомбинантного штамма. Оптимизация питательной среды позволила повысить уровень активности фермента и продуктивность культуры в 4 раза.

Разработан эффективный способ очистки протеиназы до гомогенного состояния из культуральной жидкости, включающий две стадии: дробное фракционирование сульфатом аммония и хроматографию на гидрофобном носителе бутил-сефарозе. Получен гомогенный препарат металлопротеиназы со степенью очистки 350 и выходом 11%.

Молекулярная масса фермента 19 кДа. Km фермента по гидролизу азоказеина составила 0,06 мМ, *kkat* = 1213 c^{-1}, pI фермента соответствует 5,4. Оптимум pH действия фермента – 8,0, фермент стабилен в интервале pH от 7,3 до 9,0. Температурный оптимум действия фермента – 55ºС, белок стабилен в интервале температур от 22ºС до 55ºС. Металлоэндопептидаза MprBp обладает широкой субстратной специфичностью по гидролизу синтетических и природных субстратов.

Исследуемая металлоэндопептидаза MprBp является первым бактериальным адамализиноподобным ферментом клана метцинкинов, полученным в гомогенном состоянии. Все известные представители данного семейства являются мультидоменными эукариотическими белками.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, НЕСУЩИХ ВСТРОЕННЫЙ ГЕН ИНГИБИТОРА СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ ИЗ СЕМЯН ГРЕЧИХИ

Хадеева Н.В.[1], Дунаевский Я.Е.[2], Яковлева Е.Ю.[1], Белозерский М.А.[2]

[1]Учреждение РАН Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН, 119991 Москва, ул. Губкина, 3
[2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

E-mail: mbeloz@belozersky.msu.ru

С помощью агробактериальной трансформации в растения табака, картофеля и арабидопсиса введен ген ингибитора сериновых протеиназ BWI-1a из семян гречихи под контролем конститутивного 35S промотора вируса мозаики цветной капусты с маркерным геном устойчивости к канамицину *nptII*. Целевой ген активно экспрессировался в тканях всех канамицин-устойчивых ПЦР-положительных растений и их семенного и вегетативного потомства и придавал всем тканям антибактериальную активность, свидетельствующую о синтезе функционального белка. Получена коллекция трансгенных растений и семян арабидопсиса и табака. Индивидуальные независимо полученные трансгенные клоны различались по чувствительности к селективному агенту и степени подавления роста разнообразных бактериальных патогенов: *Pseudomonas syringae, Clavibacter michiganensis, Xantomonas campestris, Ervinia carotovora*. У трансгенных растений табака в ряде случаев показано снижение фертильности пыльцы и изменение качества и размеров семян. Спектр инсерционных мутаций зависел от вида растения и размеров векторной конструкции. Среди трансгенных клонов арабидопсиса обнаружено значительное число морфологических мутантов.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (№ 09-04-00955) и МНТЦ (№ 3455).

РОЛЬ АНТИОКСИДАНТОВ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА И ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ИНВАЗИИ БАКТЕРИЙ, ПРОДУЦЕНТОВ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ

Божокина Е.С., Вахромова Е.А. , Гамалей И.А. , Хайтлина С.Ю.

Учреждение РАН Институт цитологии РАН, 194064 С.-Петербург, Тихорецкий пр. 4

E-mail: bozhokina@yahoo.com

В процессе опухолевой трансформации эукариотических клеток происходит ряд морфологических изменений, в том числе реорганизация структур цитоскелета. Кроме того, трансформация изменяет чувствительность клеток к бактериальной инвазии (Velge et al., 1997; Gamaley et al., 2006). В частности, ранее мы показали, что обработка трансформированных клеток 3T3-SV40 антиоксидантом N-ацетилцистеином вызывала разборку цитоскелета и сохраняла чувствительность клеток к инвазии непатогенными бактериями, продуцентами металлопротеиназ, а последующее удаление антиоксиданта из среды, напротив, вызывало восстановление стресс-фибрилл, свойственных нормальным клеткам, и появление устойчивости к инвазии бактериями (Гамалей и др., 2006). Однако интернализация как природных, так и рекомбинантных бактерий, синтезирующих металопротеиназу гримелизин, внутрь клетки очень низка, поэтому эффекты невозможно анализировать без количественной оценки инвазии. Задача настоящей работы состояла в количественной оценке непосредственного влияния антиоксидантов на чувствительность трансформированных клеток к бактериальной инвазии. Установлено, что бактерии *S.grimesii* 30063 и рекомбинантные *E.coli* K-12, продуценты металлопротеиназы гримелизина, инвазировали не более 10% клеток линии HeLa, как исходных, так и трансфицированных GFP-RhoA и GFP-RhoC ГТФазами. Инкубация клеток HeLa с антиоксидантами N-ацетилцистеином (NAC) или α-липоевой кислотой увеличивала их чувствительность к инвазии бактериями, продуцентами металлопротеиназ, в 2 и 3,5 раза, соответственно. Изменение инвазивности коррелировало с разрушением монослоя, значительной реорганизацией цитоскелета и отсутствием филаментов, актин был сосредоточен преимущественно в кортикальном слое. Кроме того, усиливалась экспрессия Rho ГТФаз в трансфицированных клетках. Полученные данные свидетельствуют о том, что антиоксиданты могут обратимо повышать чувствительность трансформированных клеток к бактериальной инвазии.

Работа поддержана грантами РФФИ (№№ 11-04-00393, 09-04-00467) и Программой РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ЭКСПРЕССИЯ КАСПАЗ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ОБРАБОТКЕ КОМБИНАЦИЯМИ ЦИТОСТАТИКОВ С СИСТЕМНЫМИ КОРТИКОСТЕРОИДАМИ

Волкова Т.О., Багина У.С., Курмышкина О.В., Немова Н.Н.

Петрозаводский государственный университет, 185910 Петрозаводск, пр. Ленина, 33

E-mail: VolkovaTO@yandex.ru

В настоящее время перспективными внутриклеточными мишенями для действия цитостатиков рассматриваются белки и ферменты, играющие центральную роль в передаче сигналов при индукции пролиферации, дифференцировки и апоптоза. Важной группой таких регуляторных молекул являются клеточные каспазы. Каспазы синтезируются в виде зимогенов и активируются путем протеолиза или образования димерных/олигомерных комплексов, что при действии проапоптотического сигнала приводит к деструкции, нарушению и полной дезинтеграции клеточных компартментов. В данном исследовании изучено изменение экспрессии генов каспаз-3, -6 и -9, а также активности ферментов, в эритромиелолейкозных клетках К562 при обработке 5-фторурацилом (5-ФУ), цитозинарабинозидом (ЦА), дексаметазоном и преднизолоном. Оценена степень индукции дифференцировки и апоптоза клеток.

Обработка клеток К562 2 мМ ЦА (или 5-ФА) в течение 2 суток приводила к усилению экспрессии каспазы-3 и активности фермента, каспазы-6 и -9 не индуцировались. Апоптоз регистрировался к 4 суткам на фоне повышения активности каспазы-9, активность каспазы-6 не отличалась от таковой в контрольных клетках. Количество GpA+ клеток в культурах возрастало в 3,2–3,5 раза. Дексаметазон (10 мкМ) достоверно повышал количество CD11c+ и CD14+ клеток к 4 суткам обработки: 36,7±1,9 и 45,8±1,7, соответственно (в контрольных клетках – 24,4±1,3 и 36,3±1,9, соответственно). В данных условиях также индуцировались каспазы-3, -6, -9 и выраженная фрагментация ДНК. При совместном внесении в культуры дексаметазона и ЦА (или 5-ФУ) на 2 сутки обработки наблюдалось изменение активностей каспаз по сравнению с ЦА-обработанными клетками: повышалась активность каспаз-6 и -9, активность каспазы-3 была снижена, индуцировался апоптоз. Аналогичный эффект регистрировался с преднизолоном. Таким образом, при индукции различных путей дифференцировки клеток активируются разные каскады каспаз. Апоптоза при этом может не наблюдаться. Обработка клеток комбинацией индукторов приводит к перераспределению функциональной активности каспаз. Данный факт необходимо учитывать при разработке препаратов нового поколения, специфически ингибирующих каспазы.

Работа выполнена при финансовой поддержке НШ-3731.2010.4.

ДЕЙСТВИЕ ЭНДОГЕННОГО ИНГИБИТОРА ПРОТЕИНАЗ ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА НА КУЛЬТУРЫ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Голышев С.А.[1], Кузнецов С.А.[2], Куранова И.П.[2], Руденская Г.Н.[3]

[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40
[2]Учреждение РАН Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН, Москва
[3]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

E-mail: gnruden@genebee.msu.ru

Новый эндогенный ингибитор (Mr=67kDa) выделен с помощью аффинной хроматографии на грамицидин-силохроме и ёгельфильтрации на Сефадексе G-100 из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camchaticus*. Ингибитор подавляет активность сериновых протеиназ (трипсина, химотрипсина, субтилизина, тромбина, сериновой коллагенолитической протеиназы камчатского краба) и папаина, но не действует на плазмин и глутамилэндопептидазу. Было исследовано влияние ингибитора на прикрепление к субстрату и распластывание клеток HeLa в системе *in vitro*. Клетки суспензировали в среде культивирования (с эмбриональной телячьей сывороткой) с добавлением препарата ингибитора и осаждали на шестилуночные планшеты и на чашки Петри со стеклянным дном. Контролировали прикрепление микроскопически. Для количественной оценки измеряли площади индивидуальных клеток на различные сроки после рассева (100 кл. на каждую экспериментальную точку). Параллельно осуществляли прижизненные наблюдения, используя микроскоп, оснащенный термостатируемым предметным столиком. Показано, что присутствие ингибитора в среде культивирования не влияет на скорость и эффективность прикрепления клеток как к пластику, так и к стеклу. Ингибитор существенно замедляет распластывание клеток. Эффект дозозависимый (площадь клеток через три часа составляет 69% и 74% и 62% 60% от контроля для концентрации 0,25 и 0,5 мг/мл на 90 и 180 минут от рассева соответственно). Эффект перестает выявляться по достижении клеточной популяций субконфлюэнтной плотности. Эффект пролонгируется при замене среды с ингибитором на «свежую» с тем же содержанием ингибитора. Эти данные указывают на то, что ингибитор расходуется при выполнении своих функций или метаболизируется клетками. Ингибитор не запрещает деление клеток. Показан синергический эффект подавления распластывания при совместном содержании в среде ингибитора (0,5 мг/мл) и гепарина (1 мкг/мл). В условиях непрерывных прижизненных наблюдений, в присутствии ингибитора (субстрат – стекло) распластывания клеток блокировано в течение как минимум шести часов. Спустя 24 часа наблюдается цитотоксический эффект, связанный, вероятно, с полной блокировкой распластывания клеток в условиях поставленного эксперимента.

ПРОПЕПТИД ПРОТЕАЛИЗИНА ВЫПОЛНЯЕТ ФУНКЦИЮ ФОЛДИНГ-АССИСТЕНТА

Громова Т.Ю., Демидюк И.В., Костров С.В.

Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН,
123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2

E-mail: tgromova81@mail.ru

Протеализин является прототипом новой подгруппы термолизинподобных протеиназ (ТПП). При существенном сходстве каталитических доменов с классическими представителями ТПП протеализинподобные протеиназы имеют характерное строение пропептида. Это делает ТПП хорошей моделью для исследования механизмов регуляции функциональной активности белков пропептидами. Ранее мы установили пространственную структуру пропротеализина, анализ которой показал, что пропептиды протеализинового типа, блокируют активный центр фермента и, по-видимому, являются внутримолекулярными ингибиторами. Кроме того, мы показали, что удаление пропептидов протеализинового типа, приводящее к формированию зрелого активного белка, в отличие от классических пропоследовательностей ТПП, может происходить только межмолекулярно. Данная работа направлена на изучение способности пропептида протеализина участвовать в формировании активного белка.

Для исследования шаперонных функций пропептидов протеализинового типа был использован подход, заключающийся в исследовании возможности сворачивания фермента без пропептида и с пропептидом не связанным ковалентно. В рамках этого подхода были созданы три экспрессионные системы: для полноразмерного предшественника (система *in cis)*, для зрелого протеализина и для совместной экспрессии зрелого протеализина и пропептида в отсутствии ковалентной связи между ними (система *in trans)*. Протеолитическую активность протеализина детектировали только при наличии пропептида как в составе предшественника, так и ковалентно не связанного. В обоих случаях активация протеализина происходила постепенно после разрушения клеток. Вероятно, это связано с тем, что пропептид в системе *in trans* также как в системе *in cis* связывается с активным центром фермента, а постепенное увеличение активности обусловлено постепенным расщеплением пропептида активным протеализином.

Полученные данные демонстрируют, что пропоследовательность протеализина функционирует *in vivo* в качестве фолдинг-ассистента; пропептид, связываясь с активным центром протеализина, позволяет ферменту находиться в неактивном состоянии внутри клетки и что удаление пропептида является ключевым событием на пути реализации функций протеиназ группы протеализина.

ПЕПТИДАЗЫ ГРИБОВ И ИХ СВЯЗЬ С ПАТОГЕННОСТЬЮ

Дунаевский Я.Е.[1], Дубовенко А.Г.[2], Семенова Т.А.[3], Белозерский М.А.[1], Элпидина Е.Н.[1]

[1]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва
[2]Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва
[3]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Изучение факторов, влияющих на количественные и качественные изменения в составе внеклеточных пептидаз ряда мицелиальных грибов, относящихся к различным экологическим группам, показало, что секреция пептидаз индуцируется или стимулируется присутствием белкового субстрата в культуральной среде. Изменение концентрации белка в среде оказывало различное влияние на уровни различных внеклеточных ферментов. Обнаружены также заметные различия во времени достижения максимального уровня секреции различных внеклеточных пептидаз. Полученные данные позволили предположить, что секреция трипсин-подобных ферментов характерна для фитопатогенных грибов, но не сапротрофов. Для проверки этого предположения в публично доступных геномах грибов и связанных базах данных проведен поиск последовательностей пептидаз, сходных с трипсином по консервативным мотивам, включающим аминокислотные остатки в районе активного центра. Среди 75 исследованных геномов 30 видов *Ascomycota* содержали гены подобных пептидаз и их гомологов. Почти все найденные виды грибов оказались патогенами растений, животных или грибов. Сравнение первичных структур гомологичных белков, включая остатки, ответственные за связывание субстрата и специфичность фермента, выявило три группы гомологичных последовательностей, включающих трипсин-подобные, химотрипсин-подобные и сериновые пептидазы с неизвестной субстратной специфичностью. Анализ полученных данных показал, что присутствие трипсин-подобных пептидаз у грибов может являться маркером грибной фитопатогенности.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (№ 10-04-00739) и МНТЦ (№ 3455).

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОТЕОЛИЗА ФИБРИНОГЕНА ТРОМБИНОМ

Завьялова Е.Г., Копылов А.М.

Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/3
ООО «АПТО-ФАРМ», 142784 Московская обл., Ленинский район, д. Румянцево, 1

E-mail: zlenka2006@rambler.ru

Протеолиз фибриногена тромбином – ключевая реакция, обеспечивающая свертывание крови. В результате протеолиза фибриноген, крупный гликопротеид массой 340 кДа, превращается в фибрин, образующий протяженные фибриллярные ассоциаты. Тромбин отщепляет четыре N-концевых пептида (два фибринопептида А, 14 а.к.о. и два фибринопептида В, 16 а.к.о.). Известно, что накопление фибринопептид А происходит экспоненциально, а фибринопептида В – сигмоидно, что обусловлено эффективным отщеплением фибринопептида В только от ассоциированных интермедиатов реакции. Протеолиз фибриногена и ассоциация фибрина интенсивно изучались многие годы, однако достоверное описание отщепления фибринопептида В не было осуществлено из-за трудностей при описании ассоциации продуктов реакции.

С помощью метода поверхностного плазмонного резонанса измерены кажущиеся константы ассоциации и диссоциации комплекса тромбин-фибриноген и показано, что в используемом далее концентрационном диапазоне скорость образования фермент-субстратного комплекса на порядок выше скорости его диссоциации и каталитического превращения. Таким образом, впервые показана необходимость применять квазиравновесное приближение вместо традиционного квазистационарного.

Из экспериментальных кривых накопления фибринопептида А в квазиравновесном приближении рассчитана каталитическая константа kA=7,8±1,0 c^{-1}. А использование упрощенной модели ассоциации интермедиатов реакции позволило описать сигмоидный характер кривой накопления фибринопептида В, каталитическая константа составила kB=1,7±0,5 c^{-1}, а расчетная степень ассоциации фибрина – δ=0,5±0,2. Для независимого определения степени ассоциации фибрина использовано динамическое светорассеяние, результаты которого хорошо коррелируют с расчетным значением: δ=0,54±0,02.

Осуществлено успешное моделирование протеолиза фибриногена тромбином, учитывающее как димерную природу фибриногена, так и сложную природу ассоциации продуктов реакции.

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ, государственный контракт № 16.512.11.2009, а также грантом РФФИ № 11-04-02084.

L-КАТЕПСИН ИЗ КИШЕЧНИКА ЛИЧИНКИ *DERMESTES MACULATUS*

Калиберда Е.Н., Барановская А.Ю., Румш Л.Д.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: elena.kaliberda@ibch.ru

Методами ионообменной и гель-хроматографий выделен белок из кишечника личинки жука-кожееда *Dermestes maculatus*, который является протеиназой со специфической активностью по хромогенному субстрату с остатком аргинина на С-конце. Активность с хромогенными пептидными субстратами по Р2 положению снижается в ряду Phe>Pro>Gly. Полученная протеиназа проявляет максимум активности при температуре 37–40°C и pH-оптимуме 4.0 и имеет молекулярную массу 25 кДа.

Полное подавление активности этой протеиназы сулемой (10^{-2} M), PMSF и йодацетатом в концентрациях 10^{-4} M, а также проявление максимума активности в слабокислой области pH позволяет отнести ее к L-катепсиноподобным, цистеин-зависимым протеиназам. Выделенная нами L-катепсиноподобная протеиназа не расщепляет нативные белки, но быстро расщепляет природные пептиды: желатин и мелиттин. Преимущественные сайты расщепления находятся межу двумя положительно заряженными (Arg, Lys) и алифатическими (Ala, Ile, Leu) аминокислотными остатками. Определены кинетические параметры расщепления данной протеиназой хромогенного пептида Z-Ala-Phe-Arg-pNa: K_M 212 мкМ, kcat 156 сек$^{-1}$.

Определена N-концевая аминокислотная последовательность выделенной протеиназы: Gly-Val-Pro-Asp-Met-Phe-Gln-Trp-Met-Arg-Ala. Эта последовательность аминокислот в значительной степени подобна N-концевым аминокислотным последовательностям L-катепсинов из кишечника *Dermestes frischi* и овцы (50% и 30%, соответственно).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 10-04-01381.

ЭВОЛЮЦИОННАЯ МОДЕЛЬ СЕКРЕЦИИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ У ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Кудрявцева Н.Н., Гвоздева Е.Л., Иевлева Е.В., Ревина Т.А., Софьин А.В., Валуева Т.А.

Учреждение РАН Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва, Ленинский просп. 33, стр.2

E-mail: valueva@inbi.ras.ru

На примере патогенных грибов *Rhizoctonia solani*, *Fusarium culmorum* и оомицета *Phytophthora infestans* Mont. de Bary показано, что состав секретируемых ими протеолитических ферментов зависит от pH и температуры культивирования, и для эффективной деградации белков эти параметры должны соответствовать условиям среды обитания патогенов.

Установлено, что независимо от состава среды культивирования оомицет *P. infestans* и аскомицет *F. culmorum* секретировали трипсино- и субтилизиноподобные экзопротеиназы. Оказалось, что состав экзопротеиназ, продуцируемых базидиомицетом *R. solani*, зависит от природы источника азота в культуральной среде. Так, при росте в среде, содержащей в качестве единственного источника азота только термостабильные белки картофеля, гриб продуцировал преимущественно трипсиноподобные протеиназы, которые и определяют его патогенность. При внесении в среду 1%-го дрожжевого экстракта подавлялась секреция трипсиноподобных и увеличивалась – субтилизиноподобных ферментов, которая характерна для сапрофитов, обитающих на растительных остатках. Имеются все основания предполагать, что патоген *R. solani*, в зависимости от условий культивирования может изменять свои свойства.

Показано, что разнообразие протеиназ, секретируемых патогенными грибами и оомицетом, относящимся к различным филогенетическим трибам, вне зависимости от положения на филогенетическом древе определяется с одной стороны той естественной экологической нишей, в которой обитает данный патоген (pH и температура), а с другой – растением, с которым он вступает в мутуалистические отношения. При этом наибольшее сходство состава этих ферментов наблюдалось у аскомицета и оомицета, чем у аскомицета и базидиомицета.

Таким образом, есть все основания предполагать, что поражение картофеля фитопатогенными грибами осуществляется по единому механизму с участием секретируемых ими экзопротеиназ с трипсино- и субтилизиноподобной специфичностью действия. Эти экзоферменты являются той метаболической мишенью, на которую направлено действие природных ингибиторов протеиназ, локализованных в клубнях.

УЧАСТИЕ Ca^{2+}-АКТИВИРУЕМЫХ И ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ И ПЕПТИДАЗ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ЛОСОСЯ *SALMO SALAR SEBAGO*

Кяйвяряйнен Е.И., Крупнова М.Ю., Немова Н.Н.

Учреждение РАН Институт биологии КарНЦ РАН,
185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

E-mail: hela_kaiv@mail.ru

Этапы эмбрионального развития рыб характеризуются быстрой чередой биохимических, морфологических преобразований и построений. Регуляция этих процессов осуществляется на уровне клеточного метаболизма, включающего комплекс отдельных биохимических реакций внутриклеточного протеолиза. В лабораторных условиях проанализирована активность протеолитических ферментов, таких как Ca^{2+}-активируемые протеиназы (кальпаины I и II), лизосомальные катепсины B и D, пептидазы, использующие в качестве субстратов содержащие хромогенный компонент п-нитроанилин пептиды L-alanin-p-NA, L-pro-p-NA, L- Arg-p-NA, N-Bzl-L-Arg-p-NA, L-Phe-p-NA, N-Glt-L-Phe-p-NA, Z-Gly-Pro-p-NA, в икре лосося *Salmo salar sebago* на разных стадиях эмбриогенеза: от образования бластодиска до вылупления. Изменение активности исследуемых протеиназ и пептидаз коррелирует со стадиями развития зародыша. «Всплеск» активности исследуемых ферментов на стадии поздней бластулы-ранней гаструлы может быть связан с активацией белкового обмена на этой стадии вследствие интенсивной деградации белков желтка до пептидов и свободных аминокислот и миграции их в зародышевые клетки развивающейся икры, где они используются в процессах синтеза вновь образующихся белков. Следующее увеличение активности исследуемых ферментов наблюдается на стадии пигментации глаз, на которой, как известно, происходит процесс дифференцировки головного мозга перед выклевом зародышей из оболочек. Процесс вылупления зародыша из оболочки связан с деятельностью желез вылупления, которые выделяют вещества, относящиеся к группе протеолитических ферментов типа трипсина и пепсина, с чем, возможно, связано наблюдаемое в эксперименте заметное увеличение активности трипсиноподобной пептидазы, расщепляющей N-Bzl-L-Arg-p-NA. Наблюдаемые изменения в активности исследуемых протеиназ и пептидаз, запасенных в яйцеклетках в ходе оогенеза, по-видимому, свидетельствуют об их активном участии в процессах, сопровождающих эмбриональное развитие оплодотворенной икры лосося вплоть до вылупления, и отражают процессы интенсификации белкового обмена, связанные с дифференцировкой, формообразованием и ростом зародыша.

Работа выполнялась при поддержке гранта Программы Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-3731.2010.04.

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ *PROTEUS MIRABILIS*

Марданова А.М., Бондырева Н.М.

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

E-mail: Mardanovaayslu@mail.ru

Условно-патогенные энтеробактерии *Proteus mirabilis* – возбудители различных гнойно-воспалительных процессов – обладают различными факторами вирулентности, к которым относятся и внеклеточные протеиназы. Однако, роль внутриклеточных протеиназ этих бактерий в патогенезе не известна, не исследованы особенности их биосинтеза. Целью настоящей работы было исследование протеолитической активности во внутриклеточном экстракте *P. mirabilis.* В качестве субстратов использовали Z-Glu-pNa и Z-Ala-Ala-Leu-pNA – специфические хромогенные субстраты для глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобных протеиназ соответственно, казеин, азоказеин и скелетно-мышечный актин, выделенный из ацетонового порошка мышц кролика. Активность по отношению к актину определяли электрофоретически.

Культуру *P. mirabilis* выращивали на среде LB с аэрацией. Для получения внутриклеточного экстракта использовали 16 часовую культуру клеток, находящихся в стационарной фазе роста. В клеточном экстракте, полученном методом замораживания-оттаивания, определяли общую и специфическую протеолитическую активность. Активность по отношению к казеину, азоказеину и специфическим хромогенным субстратам в экстракте не обнаружена. Однако показано, что в экстракте содержится протеиназа, ограниченно расщепляющая актин с образованием 36 кДа фрагмента. Характер протеолиза актина похож на расщепление его протеиназой *Serratia grimesii* (Хайтлина, 2009). Исследование динамики появления специфической активности в клеточном экстракте показало, что синтез внутриклеточной протеиназы, ограниченно расщепляющей актин, начинается на 4 час роста культуры и эта активность присутствует в клетках на всех стадиях роста. Показано, что синтез фермента не ингибируется в присутствии глюкозы или глицерина и таким образом не регулируется по типу углеродной катаболитной репрессии. По-видимому, фермент является конститутивным.

Ингибиторный анализ с использованием о-фенантролина и PMSF показал, что расщепление актина с образованием 36 кДа фрагмента полностью подавляется о-фенантролином и не подавляется PMSF. Согласно полученным данным, исследуемая протеиназа является металлопротеиназой.

Работа выполнена при финансовой поддержке федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.

РОЛЬ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ N И АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА В СИСТЕМЕ ГЕМОСТАЗА ОНКОЛОГИЧЕКИХ БОЛЬНЫХ

Постнова Т.Ю., Генгин М.Т.

Пензенский государственный педагогический университет им. В.Г. Белинского, 440026 Пенза, ул. Лермонтова, 37

E-mail: tatyana_postnova@mail.ru

Онкологические заболевания – недуг, борьба с которым – задача современного общества. Опухоль оказывает воздействие на все обменные процессы в организме, при этом могут происходить нарушения в системе гемостаза, приводящие к различным патологиям. В функционировании системы гемостаза немаловажная роль принадлежит вазоактивным пептидам, в обмене которых принимают участие ангиотензинпревращающий фермент (АПФ) и карбоксипептидаза N (КПN).

Целью нашей работы было изучение роли КПN и АПФ в системе гемостаза у онкологических больных.

У больных со злокачественными новообразованиями в почках активность КПN в сыворотке крови достоверно ниже по сравнению с пациентами с опухолями желудочно-кишечного тракта и легких.

Активность АПФ у больных урологического отделения достоверно выше по сравнению с пациентами абдоминального и торакального отделений.

По данным корреляционного анализа обнаружена положительная корреляция КПN с протромбиновым индексом (R=0,2762*) и уровнем плазминогена (R=0,5773*). Основные карбоксипептидазы крови модулируют процесс фибринолиза путем отщепления концевых остатков аргинина и лизина от частично деградированного фибрина. В раннем послеоперационном периоде активность КПN положительно коррелирует с активностью АПФ (R=0,7035*). Возможно, КПN компенсирует участие АПФ как компонента фибринолитической системы. Активность АПФ отрицательно коррелирует с тромбиновым временем (R=-0,6976*). АПФ вовлекается в физиологический контроль за циркуляцией крови в послеоперационном периоде, регулируя калликреин-кининовую систему. Вероятно участие АПФ в конечных этапах свёртывания крови.

Полученные результаты могут свидетельствовать об участии КПN и АПФ в гемостазе онкологических больных.

ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ОЛИГОМЕРА Lon-ПРОТЕИНАЗЫ *E. COLI* РОЛЬ N-КОНЦЕВОЙ ОБЛАСТИ В РЕАЛИЗАЦИИ ПРОЦЕССИВНОГО ПРОТЕОЛИЗА

Морозкин А.Д.[1], Ротанова Т.В.[2]

[1]*Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ, Институт экспериментальной кардиологии, 121552 Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а*
[2]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

E-mail: andreymorozkin@yandex.ru

АТР-зависимая Lon-протеиназа *E. coli* состоит из пяти доменов: N-концевого (N, остатки 1-123), α-спирализованных (nH, 124-302 и H, 491-584), нуклеотид-связывающего (NB, 303-490) и протеолитического (P, 585-784), соединенных согласно схеме **N-nH-NB-H-P**. Домены NB и H формируют АТР-азный компонент Lon, относящийся к AAA^+-белкам и обладающий анфолдазной активностью. P-Домен представляет серин-лизиновую эндопептидазу, nH-домен содержит характеристическую область (173-280) с coiled-coil (CC)-конформацией. Вторичная структура Lon сформирована 27 α-спиралями и 27 β-тяжами. Трехмерное строение фермента не известно, хотя определена кристаллическая структура его P- и H-доменов, а также фрагмента (1-245). Lon-протеиназа активна в форме гомоолигомера (предположительно, циклогексамер).

Постулируется, что в мономере Lon nH-домен, имеющий вытянутую конфигурацию, ориентирован антипараллельно фрагменту фермента, сформированному доменами NB, H и P, а подвижный N-домен располагается над P-доменом. Периодическое притяжение-отталкивание боковых карбоксилов спирализованных участков (124-185) и (495-562) nH и H-доменов, обусловленное связыванием-высвобождением ионов магния между ними, вызывает механические колебания блока N-nH с отклонением до 2 нм для N-домена, что приводит к периодическому маскированию района активного центра P-домена. Центр колебаний формируется взаимодействием неполярных кластеров (207-221) и (286-299) nH и NB-доменов. Олигомеризации Lon может способствовать предварительное образование комплексов мономер-полифосфат/фрагмент ДНК с участием кластеров NB-домена с высоким содержанием положительно заряженных боковых групп. Самосборка таких комплексов приводит к образованию жесткой циклогексамерной структуры длиной ~16 нм, с поперечником ~12 нм и каналом вдоль оси цилиндра диаметром 1.6 нм. Процессивный протеолиз обеспечивается многоточечным связыванием белка-субстрата с ферментом, в котором участвуют N-домен(ы) и образованная шестью P-доменами дистальная поверхность Lon, несущая активные центры. При этом энергия колебаний N-доменов используется ферментом для конформационного изменения («разворачивания») субстрата.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 11-04-01015).

ЭКСПРЕССИЯ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ – ММП-1, ММП-2, ММП-9 И ИХ ЭНДОГЕННЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЕ ШЕЙКИ МАТКИ

Рыжакова О.С.[1], Завалишина Л.Э.[2], Андреева Ю.Ю.[2], Соловьева Н.И.[1]

[1]Учреждение РАМН НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121 Москва, ул. Погодинская, 10, корп.Б
[2]ФГУ Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена Росздрава, Москва

E-mail: Nina.Solovyeva@ibmc.msk.ru

Матриксным металлопротеиназам (ММП) отводится ключевая роль в развитии процессов инвазии и метастазирования при канцерогенезе. Цель работы – выяснение особенностей экспрессии ММП – ММП-1, ММП-2, ММП-9 и их эндогенных тканевых ингибиторов ТИМП-1 и ТИМП-2 при плоскоклеточной карциноме шейки матки. Работа проводилась на послеоперационных образцах карцином и образцах прилегающей к опухоли морфологически нормальной ткани (контроль). Изучение экспрессии ММП и их тканевых ингибиторов проведено на уровне мРНК (RT-PCR) и белка (иммуногистохимический анализ), а также энзимологической активности. Выраженное увеличение экспрессии мРНК в опухолях на 86%, 66% и 58% обнаружено для ММП-1, ММП-2 и ММП-9 соответственно. В случае ингибиторов наблюдалось снижение экспрессии мРНК – на 60% и 90% для ТИМП-1 и ТИМП-2, соответственно. Исследование экспрессии ММП и их ингибиторов в зависимости от наличия (11образцов) и отсутствия метастазов (13 образцов) были проведено иммуногистохимическим методом. Во всех образцах с метастазами была обнаружена экспрессия ММП-1, причем в большинстве случаев на высоком уровне, в образцах без метастазов экспрессия была в основном низкая или отсутствовала. Такая же картина наблюдалась в случае ММП-9. В случае ММП-2 выраженных отличий в образцах с метастазами и без метастазов обнаружено не было. Преимущественно слабая экспрессия ингибиторов ТИМП-1 и ТИМП-2 была обнаружена в опухолях как с метастазами так и без метастазов Спектр и активность ММП-2 и ММП-9 исследовали методом зимографии. Работа проводилась на 19 образцах карцином и 15 образцах прилегающих к опухоли тканей (норма). Выраженное увеличение экспрессии ММП-9 наблюдалась в 94% образцов опухолей. Активность ММП-2 обнаружена как в опухоли, так и в норме. Полученные данные свидетельствуют о том, что основной вклад в деструктивный (инвазивный) и метастатический потенциалы карцином шейки матки вносит увеличение экспрессии ММП-1 и ММП-9, а также низкая экспрессия ингибиторов – ТИМП-1 и ТИМП-2 и в меньшей степени – увеличение экспрессии ММП-2.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 10-04-01573а.

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ФИТОГОРМОНОВ НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ИНГИБИТОРОВ ТРИПСИНА ПРИ ХОЛОДОВОЙ АДАПТАЦИИ ПШЕНИЦЫ

Титов А.Ф., Фролова С.А., Таланова В.В., Венжик Ю.В.

Учреждение РАН Институт биологии КарНЦ РАН, 185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

E-mail: titov@krc.karelia.ru

Известно, что активность протеолитических ферментов и их ингибиторов под влиянием на растения неблагоприятных факторов среды, включая низкие температуры, может существенно изменяться. Нами установлено, что в листьях проростков пшеницы уже в начальный период действия (первые часы) температуры 5°С (близкой к оптимальной для их холодовой адаптации), происходит усиление активности амидаз, цистеиновых протеиназ и ингибиторов трипсина. В дальнейшем активность амидаз и ингибиторов трипсина снижалась до исходных значений, тогда как активность цистеиновых протеиназ оставалась на повышенном уровне на протяжении всего периода (7 сут) воздействия холода. Очевидно, указанные изменения активности протеиназ, участвующих в деградации белковых молекул и регуляции физиолого-биохимических процессов посредством реакций ограниченного протеолиза, связаны, прямо или косвенно, с формированием повышенной холодоустойчивости пшеницы.

Экзогенные фитогормоны – абсцизовая кислота (АБК, 0.1 мМ) и цитокинин (в форме его синтетического аналога 6-бензиламинопурина – БАП, 0.01 мМ) вызывали в условиях действия на проростки пшеницы низкой температуры значительные изменения в активности протеолитических ферментов и ингибиторов трипсина в их листьях. Причем воздействие АБК и БАП (являющихся антагонистами в отношении ростовых процессов и биосинтеза белка и действующих однонаправленно в отношении устойчивости растений) на активность протеиназ и ингибиторов оказалось разнонаправленным. В частности, обработка проростков АБК приводила к значительному повышению активности протеолитических ферментов (особенно цистеиновых протеиназ) и ингибиторов трипсина, тогда как в присутствии БАП активность протеиназ и ингибиторов трипсина, наоборот, заметно снижалась.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что повышение холодоустойчивости растений озимой пшеницы под влиянием экзогенных АБК и цитокининов в условиях действия на них низкой температуры сопряжено с определенными изменениями в активности протеолитических ферментов и их ингибиторов, по-видимому, носящими защитно-приспособительный характер.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 10-04-00650а).

ВЛИЯНИЕ ЛЕЙ^5-ЭНКЕФАЛИН-АРГ^6 НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ОБМЕНА РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ В МОЗГЕ КРЫС

Фирстова Н.В., Сметанин В.А., Бардинова Ж.С., Стёксова Н.А., Латынова И.В., Генгин М.Т.

Пензенский государственный педагогический университет им. В.Г. Белинского, 440026 Пенза, ул. Лермонтова, 37

E-mail: nfirst@yandex.ru

Изучено влияние про-энкефалина – лей^5-энкефалин-арг^6, на активность ферментов обмена регуляторных пептидов – карбоксипептидазы N (КПN, Кф 3.4.17.10) и фенилметилсульфонилфторидингибируемой карбоксипептидазы (ФМСФ-КП) в гипофизе, среднем мозге, гипоталамусе, стриатуме крыс. Предлагаемое исследование может способствовать выяснению механизмов функционирования энкефалинов, пониманию биологической роли изучаемых ферментов и представляет интерес для выяснения механизмов регуляции активности ферментов *in vivo*. Исследуемые ферменты катализируют реакции отщепления остатков основных аминокислот – аргинина и лизина с С-конца про-пептидов, превращая их в активные формы. После введения про-энкефалина, в дозе 20 мкг/кг веса, животных декапитировали через 0,5, 4, 24 и 72 часа. Активность КПN и ФМСФ-КП определяли флуориметрически, с использованием дансил-фен-ала-арг и дансил-фен-лей-арг, соответственно.

Статистически значимое по сравнению с группой контроля повышение активности КПN обнаружено через 0,5 часа после введения про-пептида в гиппокампе и стриатуме. Через 4 часа активность фермента снижалась во всех структурах мозга и к 72 часам не отличалась от уровня контроля. В то же время, наиболее существенная активация ФМСФ-КП наблюдалась в гипоталамусе, гипофизе и стриатуме. Через 4 часа после введения пептида обнаруживалась тенденция к снижению активности фермента, но в гипофизе, гипоталамусе, стриатуме и среднем мозге она оставалась выше контрольных величин. К 24 часам активность ФМСФ-КП у животных, получавших предшественник энкефалина, не отличалась от таковой у контрольных. Таким образом, динамика изменений активности ФМСФ-КП при инстилляции лей-энкефалин-арг^6 была очень сходной с таковой в случае КПN, но степень активации была выше, чем степень активации КПН.

Лей^5-энкефалин-арг^6 *in vitro* подавлял активность КПN, но оказывал действия на активность ФМСФ-КП. Вероятно, *in vivo* действие пептидов на активность ферментов опосредовано, что предполагает существование механизмов регуляции их активности с участием лей-энкефалин-арг^6.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА СЕКРЕТИРУЕМОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ *B.PUMILUS 3-19*

Шарипова М.Р., Сабирова А.Р., Шагимарданова Е.И., Черемин А.М.

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

E-mail: Margarita.Sharipova@ksu.ru

Протеолитические белки вовлечены во все основные физиологические процессы и являются стратегическими ферментами клеток бактерий. Геном *B. subtilis* содержит 62 гена протеолитических белков, среди которых 35 генов кодируют внутриклеточные, 8 секретируемые, 13 – мембраносвязанные и 6 генов – протеиназы, локализованные в клеточной стенке. Многие из белков, соответствующих этим генам, пока не выделены, их физиологические функции не установлены. Научно-практический интерес представляют ранее не идентифицированные белки протеолитического спектра, что обусловлено необходимостью расширения общих представлений об эволюционном развитии этой группы гидролаз и выявления новых, практически значимых ферментов с полезными свойствами. Цель работы – поиск, изоляция и характеристика гена новой металлоэндопептидазы (*mprBp*) из фрагмента ДНК *B. pumilus* и изучение его экспрессии.

В ДНК *B. pumilus* 3-19 впервые у бацилл выявлен и охарактеризован ген, кодирующий гомолог эукариотических адамолизинов клана метцинкинов (AN EU678894). Экспрессия гена модулируется различными регуляторными системами в период постэкспоненциального роста. Установлено, что белки транспорта аммония GlnK и AmtB совместно с глобальным фактором транскрипции TnrA участвуют в контроле экспрессии гена. Двухкомпонентная система DegS-DegU, ответственная за синтез ферментов биодеградации, оказывает позитивное влияние на экспрессию *mprBp*. Установлено отсутствие регуляторной взаимосвязи между экспрессией *mprBp* и споруляцией. Показано, что активность гена контролируется механизмами углеродной и азотной катаболитной репрессии. В клетках эукариот адамализины выполняют защитную функцию, будучи агрессивными компонентами змеиных ядов. По аналогии бактериальные адамализиноподобные протеиназы бактерий могут выполнять защитную функцию. Бациллы, сталкиваясь с неблагоприятными условиями среды, начинают синтезировать металлопротеиназу как фактор агрессии. Таким образом, экспрессия гена металлопротеиназы является одним из адаптационных ответов в постэкспоненциальный период роста спорообразующих бактерий.

Работа выполнена при финансовой поддержке федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕОЛИЗА НЕКОТОРЫХ АНАЛОГОВ СЕМАКСА

Шевченко К.В., Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Мясоедов Н.Ф.

Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2

E-mail: ATRegister@mail.ru

Замена N-концевой аминокислоты в молекуле семакса на аланин ([Ala1]-Sem), глицин ([Gly1]-Sem), треонин ([Thr1]-Sem) и триптофан ([Trp1]-Sem) значительно сужает спектр ноотропного действия или приводит к полной потере ноотропной активности данных пептидов. Это дает основание предположить, что замена метионина на другие аминокислоты в семаксе может заметно модифицировать их взаимодействие с ферментным комплексом тканей головного мозга, ответственным за их деградацию. Для проверки этой гипотезы в качестве ферментов использовались основные классы пептидаз области носа и мозга крысы: лейцинаминопептидаза, карбоксипептидазы B и Y, дипептидилпептидаза, пепсин, микросомальная фракция мозга крысы (МФМК), а также гомогенат целого мозга крысы (ГЦМК). Исследовался набор продуктов протеолиза этих пептидов. Обнаружено, что степень деградации семакса и его аналогов для разных протеиназ существенно различается. Наибольший протеолиз наблюдается в присутствии карбоксипептидазы B у [Thr1]-Sem, в присутствии карбоксипептидазы Y у [Trp1]-Sem, а в присутствии дипептилпептидазы – у [Ala1]-Sem и семакса. Установлено, что аналоги семакса более устойчивы к протеолизу, чем семакс.

Обнаружено принципиальное отличие протеолиза семакса и его аналогов под действием водорастворимых и мембранносвязанных протеиназ (МФМК). Вероятно, это связано с особенностями взаимодействия данных пептидов с мембранными протеиназами.

При работе с ГЦМК показано, что влияние на ход протеолиза карбоксипептидаз выше, чем это наблюдалось в случае использования МФМК. При анализе продуктов протеолиза, образующихся под действием ГЦМК, оказалось, что из [Ala^1]-Sem, [Gly^1]-Sem, [Thr^1]-Sem и семакса образуется единственный метаболит His-Phe-Pro-Gly-Pro (Sem-5), а в случае [Trp^1]-Sem через 30 минут от исходного пептида остается около 1%, Sem-5 образуется 33%, Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (Sem-6) – 45%, а Trp-Glu-His-Phe – 21%.

Работа поддержана программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная клеточная биология», программой поддержки ведущих научных школ РФ НШ-3438.2010.4 и грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК-2375.2009.4

Секция 8

Создание новых лекарственных средств

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕПТИДОВ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ

Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф.

Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2

E-mail: landr@img.ras.ru

Изучению физиологически активных пептидов уже в течение многих лет уделяется большое внимание ввиду возможности создания на их основе новых лекарственных препаратов, а также с учетом роли этих веществ в механизмах фармакологических эффектов.

Экспериментальной основой всей работы являлись структурно-функциональные исследования новых синтезированных пептидов. Излагается разрабатываемая нами концепция создания пептидов с заданными физиологическими свойствами на основе структурно-функционального анализа природных пептидов. Приводятся данные по синтезу пептидов – структурных аналогов селанка и исследования их противовирусных свойств, которые позволили выделить фармакофор с противовирусной активностью Gly-Pro. Проведены исследования влияния стереоспецифичности аминокислотных последовательностей на механизм их действия на примере синтезированных С-концевых последовательностей дерморфина. На основе фрагмента нейротензина -Pro-Tyr- синтезирована и охарактеризована большая группа пептидов. Проведенный структурно-функциональный анализ этой группы пептидов позволил отобрать наиболее эффективные пептиды с нейролептической активностью для дальнейших комплексных исследований с целью создания на их основе новых лекарственных препаратов с нейролептической активностью. С целью конструирования новых пептидов с нейротропными свойствами, не уступающих пептиду семакс проведен синтез и исследования фрагментов АКТГ$_{4\text{-}10}$. Проведенные структурно-функциональные исследования пептидов на основе фрагмента АКТГ$_{4\text{-}10}$ показали, что они имеют фундаментальное значение с точки зрения подтверждения концепции о наличии в функциональных пептидах фармакофоров и возможность пролонгирования их действия. Проведение комплексных структурно-функциональных исследований являются необходимым при создании новых лекарственных препаратов на основе пептидов.

Работы выполнены при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», гранта Президента РФ для поддержки ведущих научных школ № НШ-3438.2010.4, ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы, ГК № 14.740.11.0179.

ГИДРОЛИТИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ ПЕПТИДОВ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ КРЫСЫ

Безуглов В.В., Назимов И.В., Грецкая Н.М., Дейгин В.И., Акимов М.Г.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: vvbez@ibch.ru

Гидролиз пептидных препаратов в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) является основным препятствием для применения пероральных лекарственных форм. Нами разработаны тест-системы с использованием фрагментов желудка и тонкого кишечника крысы, которые позволяют более адекватно оценить гидролитическую стабильность соединения по сравнению с обычно используемыми искусственными смесями ферментов. В данных системах изучена гидролитическая стабильность пептидов, имеющих терапевтическое значение: даларгина, стемокина и ряда других, в том числе модифицированных ибупрофеном и аспирином циклических производных 2,5-дикетопиперазиновых аналогов трипептидов. Исследована также стабильность оптических и химических изомеров пептида Glu-Trp, содержащих все возможные комбинации L- и D-энантиомеров обеих аминокислот, соединенных пептидной связью через α- или γ-карбоксильную группу глутаминовой кислоты, а также производных пироглутамил-триптофана. Установлено, что устойчивы к гидролизу дикетопиперазины любой структуры, а также трипептиды на их основе, и линейные формы D-D-дипептидов. Даларгин и стемокин устойчивы к действию пепсина, но расщепляются фрагментами ЖКТ. Линейный L-L-дипептид гидролизовался фрагментами кишки полностью; его аналог со связью через γ-карбоксильную группу был более устойчив (42% гидролиза). Для гидролиза дипептидов, соединенных через γ-карбоксильную группу, определяющей оказалась конфигурация первой аминокислоты: L-Glu-(D-Trp) – 57% гидролиза, D-Glu-(L-Trp) – 0%.

Таким образом, показано, что для некоторых пептидов использование искусственного желудочного или кишечного сока, содержащего ограниченный набор ферментов, может приводить к ошибочным результатам, завышающим стабильность пептидных препаратов. Предложенные нами тест-системы с использованием фрагментов желудка и кишечника крысы могут быть применены с фрагментами желудка и кишечника других видов животных, включая человека.

Работа частично поддержана грантом Министерства образования и науки РФ (госконтракт № 14.740.11.0116).

ВЫБОР УСЛОВИЙ ПРОВЕДЕНИЯ ГИДРОЛИЗА ФАРША МОРСКИХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ПРЕСНОВОДНЫХ РЫБ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВОГО ПРЕПАРАТА, ОБЛАДАЮЩЕГО ВЫСОКОЙ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Крупнова М.Ю.[1], Немова Н.Н.[1], Мухин В.А.[2]

[1]*Учреждение РАН Институт биологии КарНЦ РАН, Петрозаводск*
[2]*Полярный НИИ морского рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича, Мурманск*

E-mail: mukrupnova@rambler.ru

Морские беспозвоночные и пресноводные рыбы привлекают внимание исследователей в качестве источника необычных по химическому строению и биологической активности природных соединений. Работы такого рода проводятся, в основном, на морских видах, в то время как исследований, в которых в качестве сырья, используют гидробионты пресноводных водоемов, крайне редки, при этом на долю малоценных видов рыб (ерш, корюшка, уклея) приходится более половины вылова.

Целью данной работы было сравнение условий гидролиза фарша из различных источников, а именно, беспозвоночных Баренцева моря и «потенциально-ресурсных» видов гидробионтов из водоемов Республики Карелия.

На основании полученных данных можно отметить, что предподготовка материала для проведения гидролиза идентична вне зависимости от источника получения гидролизата, а именно: 3 часа при температуре 50–55° в количественном соотношении белоксодержащего субстрата и ферментного препарата 100 г: 0,5–0,7 г и гидромодуле от 0,5 до 1,5. При этом процесс гидролиза можно проводить двумя способами, вводя в гидромодуль единый рассчитанный объем (0,75 мл) препарата протеиназ, полученный из гепатопанкреаса камчатского краба, а в другом случае, он же добавляется порционно (1/3 объема в час). Так, по данным Мухина (Мухин, Новиков, 2001) при кратном введении препарата протеиназ в фарш морских беспозвоночных гидролиз проходит более интенсивно, в то время как при добавлении препарата в фарш пресноводных рыб оптическая плотность гидролизатов практически идентична (корюшка) или несколько снижена (уклея, ерш). Максимальное поглощение продуктов гидролиза белков у исследуемых малоценных видов пресноводных рыб (корюшки, ерша, уклеи) происходит при 300 нм, в то время как у морских беспозвоночных максимальное поглощение продуктов гидролиза белков происходит при 280 нм (Мухин, Новиков, 2001).

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Отделения биологических наук РАН «Биологические ресурсы России: фундаментальные основы рационального использования».

КОРТАГЕН КАК НЕЙРОПРОТЕКТОР ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНСУЛЬТЕ У КРЫС

Гаврилова С.А.[1], Шрам С.И.[2], Новицкая Ю.А.[3], Гранстрем О.К.[3]

[1]*Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*
[2]*Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, Москва*
[3]*ООО «Герофарм», С.-Петербург*

E-mail: sgavrilova@mail.ru

Целью исследования являлось изучение нейропротекторных свойств синтетического тетрапептида (AEDP) кортаген.

Методы. Работу выполняли на самцах крыс популяции Вистар весом 230–250 г, 150–170 г, 300–350 г. в разных сериях экспериментов. Ишемический инсульт моделировали электрокоагуляцией средней мозговой артерии с необратимой перевязкой ипсилатеральной сонной артерии (ОСМА). Размер некроза оценивали в срезах окрашенных трифенилтетразолием хлоридом как % пораженной ткани к общему размеру коры ипсилатерального полушария мозга. Неврологические нарушения, смертность и динамику веса исследовали в модели неполной глобальной ишемии мозга (необратимая перевязка двух сонных артерий – НГИ) по бальной шкале Саркисовой и в модели фотоиндуцированного тромбоза (ФИТ) методом Limb-placingtest. Кортаген вводили внутримышечно, внутрибрюшинно, внутривенно, интраназально в дозах 1, 10, 100, 150, 1000 мкг/кг курсом в течение 3, 5 или 7 дней в разных сериях экспериментов. Контрольные животные получали физиологический раствор эквивалентно.

Результаты. Наиболее яркий защитный эффект при развитии ишемического поражения мозга кортаген оказывал в дозе 10 мкг/кг при внутривенном или внутрибрюшинном введении. Кортаген, примененный в острую стадию развития ишемического инсульта в модели ОСМА, значимо, на 20%, снижал размер некроза коры головного мозга крыс по сравнению с контролем. Оценка неврологического состояния крыс показала более быстрое восстановление координации и двигательной активности лап крыс с ФИТ, получавших кортаген. В модели НГИ препарат значимо увеличивал число животных с легким неврологическим дефицитом, снижал суточную смертность и ускорял нарастание веса в течение 10 суток после операции, улучшая общее состояние крыс. Внутримышечный способ введения был неэффективен.

Заключение. Синтетический тетрапептид (AEDP) кортаген обладает нейропротекторными свойствами. Примененный в острую стадию развития ишемии, пептид снижает тяжесть неврологического статуса, уменьшает суточную смертность, уменьшает размер некроза в модели инсульта, улучшает общее состояние животных.

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОСТАТРОПНОГО ПЕПТИДНОГО ПРЕПАРАТА «ПРОСТАМАКС»

Пахомова А.В.[1], Румпель О.А.[1], Гранстрем О.К.[2], Боровская Т.Г.[1]

[1]Учреждение РАМН НИИ фармакологии СО РАМН, 634028 Томск, пр. Ленина, 3
[2]ООО «ГЕРОФАРМ», С.-Петербург

E-mail: repropharm@yandex.ru

Неинфекционные простатиты и доброкачественная гиперплазия предстательной железы (ДГПЖ) являются в настоящее время наиболее широко распространенными урологическими патологиями. Число пациентов, страдающих данными заболеваниями, с течением времени не снижается. Это побуждает к поиску новых способов терапии данной урологической патологии. К числу перспективных в этом плане лекарственных средств, принадлежит пептидный препарат «Простамакс». В экспериментальных исследованиях установлено, что он задерживает развитие атрофических и склеротических процессов у животных с хроническим воспалением предстательной железы, препятствует развитию ДГПЖ. В плане дальнейшего изучение простатотропного действия препарата представляется целесообразным изучение его влияния на диурез, противовоспалительных, обезболивающих свойств. Учитывая, что ДГПЖ связана с андрогенезацией организма, целесообразно исследование влияния препарата на уровень андрогенов.

Эффективность препарата оценивалась при введении его животным (крысы, мыши) репродуктивного возраста в двух дозах: 20 и 40 мкг/кг. Противовоспалительное действие изучали на модели каррагенинового отека, анальгетическое действие – на модели «уксусные корчи», антиандрогенная активность оценивалась по изменению весовых коэффициентов органов-мишеней у половозрелых крыс, влияние на диурез – в условиях 5 часового диуреза с 5% водной нагрузкой.

Установлено, что препарат «Простамакс» в дозе 20 мкг/кг обладает противовоспалительными свойствами. Масса отека статистически значимо снижалась по сравнению с контролем. Исследование обезболивающего действия показало, что препарат в обеих дозах обладает анальгетической активностью. Болевая чувствительность угнеталась на 54–60%. Препарат «Простамакс» обладает антиандрогенной активностью в обеих дозах. Так, весовые коэффициенты семенных пузырьков снижались на 23,5–42,9%. Наиболее выраженный эффект отмечен в дозе 20 мкг/кг. При изучении влияния препарата на диурез обнаружено, что препарат «Простамакс» в дозе 40 мкг/кг увеличивает диурез. Объем мочи увеличился на 84%.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЕПТИДНОГО ПРЕПАРАТА «КОРТАГЕН» ПРИ ГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННЫХ СНИЖЕНИЯХ КОГНИТИВНЫХ СПОСОБНОСТЕЙ

Румпель О.А.[1], Пахомова А.В.[1], Гранстрем О.К.[2], Боровская Т.Г.[1]

[1]Учреждение РАМН НИИ фармакологии СО РАМН, 634028 Томск, пр. Ленина, 3
[2]ООО «ГЕРОФАРМ», С.-Петербург

E-mail: repropharm@yandex.ru

В клиническую практику последних пяти лет внедрен новый пептидный препарат кортексин, обладающий выраженными ноотропными и нейропротекторными свойствами. Показано, что кортексин является высокоэффективным корректором функционально-метаболических нарушений головного мозга при хронической ишемии. Выявлена его эффективность при когнитивных расстройствах у постинсультных больных, а также у подростков, употребляющих психоактивные препараты. Целью настоящего исследования явилось экспериментальное изучение эффективности препарата «Кортаген», представляющего собой последовательность наиболее тканеспецифически значимых аминокислот (Ala-Glu-Asp-Pro), входящих в состав кортексина, при генетически обусловленных снижениях когнитивных способностей.

Эффективность «Кортагена» оценивалась при его введении в течение 7 дней в дозах 10 мкг/кг, 100 мкг/кг и 1000 мкг/кг крысам (самцам и самкам, возраст 2 мес) – потомство, характеризующегося генетически обусловленным снижением способности к обучению. Последнее моделировалось однократным введением в МПД крысам-самцам ингибитора топоизомеразной активности – этопозида за 3 мес до спаривания с интактными крысами-самками. Способность потомства (F 1) к обучению оценивали в тесте «условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ).

Проведенные исследования показали, что количество животных контрольной группы (потомство интактных самок и самцов, получавших этопозид) с выработанным УРПИ составило 40–55% от такового у интактных крыс. Процент крысят с выработанным УРПИ во всех экспериментальных группах статистически значимо не отличался от такового в группе интактных животных. Наиболее выраженный эффект отмечался у крысят-самок при введении «Кортагена» в дозе 100 мкг/кг, у крысят-самцов – при введении во всех исследуемых дозах. Таким образом, препарат «Кортаген» является эффективным средством коррекции генетически детерминированных когнитивных нарушений у экспериментальных животных.

ИССЛЕДОВАНИЕ АНКСИОЛИТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ СЕЛАНКА ПРИ СОВМЕСТНОМ ВВЕДЕНИИ С БЕНЗОДИАЗЕПИНАМИ

Мешавкин В.К.[1], Балашов А.М.[1], Ларионова А.В.[2], Кост Н.В.[1], Терещенко О.Н.[1], Беляева М.Л.[1], Мешавкина М.А.[1], Хрущова О.Н.[2], Мясоедов Н.Ф.[3]

[1]Учреждение РАМН Научный центр психического здоровья РАМН, 115522 Москва, Каширское ш., 34
[2]ГОУ Российский государственный медицинский университет им. Н.И. Пирогова, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1
[3]Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2

E-mail: Meshavkin@yandex.ru

Бензодиазепины – наиболее распространенные во всем мире и достаточно эффективные анксиолитики. При этом им свойственны побочные эффекты, связанные с развитием толерантности и зависимости (основная проблема хронического приёма), с седативным и миорелаксирующим действием. В настоящее время разработан пептидный анксиолитик селанк, отличающийся высокой степенью безопасности. Это открывает перспективу сочетанного применения бензодиазепинов и селанка с задачей добиться уменьшения скорости формирования и выраженности негативных побочных эффектов транквилизаторов при сохранении высокой терапевтической эффективности.

Белым беспородным мышам-самцам раз в сутки на протяжении 45 дней вводили диазепам (в/б в 0,2 мл дистиллированной воды) в дозах, постепенно возрастающих от 1 до 25 мг/кг и, на фоне тех же доз диазепама (Д), селанк (600 мкг/кг). Контрольным животным эквивалентно вводили дистиллированную воду. Через 2 дня по окончании хронических инъекций животным вводили Д в тестовых дозах 1, 3 и 10 мг/кг и через 30 мин оценивали их поведение в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ). В контроле (хронические инъекции воды) Д дозозависимо оказал противотревожный эффект. При хроническом введении Д снижалась базовая тревожность животных. На этом фоне существенно уменьшалась их чувствительность к анксиолитическому действию малых доз Д (1 и 3 мг/кг), введение препарата в высокой дозе (10 мг/кг) снизило количество выходов в открытые рукава ПКЛ и время нахождения в них мышей, т.е. по-видимому, Д оказывал седативное действие. При хроническом введении транквилизатора совместно с селанком сохранялось снижение базовой тревожности и чувствительности к тестовым дозам Д. Таким образом, селанк, при совместном хроническом введении с Д, не снижал его терапевтическую эффективность.

Работа поддержана РФФИ (грант № 11-08-01327-а).

ШКОЛА МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

ТЕЗИСЫ СТЕНДОВЫХ ДОКЛАДОВ

Секция 1

Выделение, очистка, характеризация белков и пептидов. Пептидомика. Протеомика

ЗАЩИТНЫЕ ПЕПТИДЫ ОДУВАНЧИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО (*TARAXACUM OFFICINALE* WIGG.)

Астафьева А.А., Рогожин Е.А., Егоров Ц.А.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: a-sanya@mail.ru <mailto:vmlipkin@mx.ibch.ru>

Ценным, но пока еще мало изученным источником антимикробных пептидов являются дикорастущие виды растений. Целью данной работы было выделение и характеристика пептидов из одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.), который является злостным сорняком, распространенным в средней полосе России, высоко устойчивым к патогенам и вредителям.

Предварительно были разработаны условия экстракции пептидов из цветков и семян этого вида растений органическими и неорганическими кислотами и их разделения с использованием различных типов хроматографии.

В результате в семенах одуванчика было иденцифицировано 8 пептидов с молекулярными массами от 2,6 до 9,3 кДа. Среди них 2 новых гомологичных пептида с мол. массами 4916 и 5054 Да, содержащих 8 остатков цистеина. Определение N-концевых аминокислотных последовательностей этих пептидов позволило отнести их к семейству дефензинов растений.

В цветках одуванчика иденцифицировано 18 пептидов с молекулярными массами от 3 до 9,5 кДа. Определена полная аминокислотная последовательность 3-х 6-Cys пептидов с мол. массами 4357, 4817 и 4608 Да и показано, что они обладают новым цистеиновым мотивом, ранее не описанным для растительных АМП. Показано, что они ингибируют рост ряда фитопатогенных грибов и оомицетов в микромолярных концентрациях и подавляют развитие возбудителя фитофтороза. В цветках обнаружены также 2 новых гомологичных гликозилированных пептида, не содержащих остатков цистеина. Определены их N-концевая аминокислотная последовательность и аминокислотный состав. Показано, что они содержат 50% пролина и гидроксипролина. Масс-спектрометрическим анализом показано, что они имеют в своем составе 10 и 5 остатков пентоз соответственно. Установлено, что они обладают антимикробной и антифунгальной активностью. При действии на фитопатогенные грибы был отмечен частичный плазмолиз мицелия.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России». Госконтракт № 16.740.11.424.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ, СОДЕРЖАЩИХ ФАКТОР ТРАНСКРИПЦИИ КАИЗО

Байкалова Е.А., Женило С.В., Прохорчук Е.Б.

Учреждение РАН Центр «Биоинженерия» РАН,
117312 Москва, просп. 60-летия Октября, 7, корп.1

E-mail: baykalovaelena@gmail.com

Каизо – это метил-ДНК-связывающий белок, который относится к BTB/POZ семейству белков. Известно, что белок Каизо вовлечен в развитие опухолей кишечника у мыши. Он отличается от других метил-ДНК связывающих белков по двум причинам. Во-первых, он узнаёт как минимум два симметрично метилированных динуклеотида в контексте 5'-мCpGpmCpGp-3' или неметилированную последовательность CTGCNA. Во-вторых, для связывания метилированной ДНК служит домен «цинковые пальцы», вместо MBD-домена. Ранее было показано, что Каизо является компонентом N-CoR комплекса. Однако по нашим данным только минорная часть Каизо вовлечена во взаимодействие с N-CoR комплексом. Одной из проблем при очистке комплекса с Каизо является значительное снижение количества белка по мере очистки комплекса. Для решения данной задачи был разработан следующий подход: провести очистку белкового комплекса из мышиных фибробластов дикого типа и фибробластов с генетическим нокаутом гена Каизо. Использование нокаутных фибробластов в качестве контроля позволяет идентифицировать только специфичные взаимодействия других белковых факторов с Каизо. Разработана модифицированная методика выделения ядерных экстрактов в присутствии ингибитора SUMO-протеаз NEM, что позволяет значительно увеличить количество белка Каизо в экстрактах. Далее происходит очистка комплекса на основе гель-фильтрации и ДНК-аффинной хроматографии: фракции после гель-фильтрации, содержащие белок Каизо, будут использованы на аффинной колонке со смолой BrCN-сефарозой, к которой была пришита в качестве лиганда неметилированная или метилированная последовательность ДНК. Колонка с неметилированным лигандом снижает неспецифические взаимодействия при дальнейшей очистке.

По литературным данным известно, что при исследовании белковых комплексов, содержащих поликомб-белок Ring1b/Rnf2, был обнаружен Каизо. Ring1b/Rnf2 входит в состав PRC1-комплекса. Одним из ключевых компонентов этого комплекса является Bmi1. Мы показали, используя модифицированный нами метод приготовления экстрактов, что Bmi1 и Каизо ко-иммуноперципитируют *in vivo*.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХИТОЗАНА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ β-ЛАКТОГЛОБУЛИНА ИЗ СМЕСИ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ МОЛОКА

Бакулин А.В.[1], Гавриленко Н.В.[2], Червяковский Е.М.[2], Курченко В.П.[2], Варламов В.П.[1]

[1]Учреждение РАН Центр «Биоинженерия» РАН,
117312 Москва, просп. 60-летия Октября, 7, корп.1
[2]Белорусский государственный университет, 220030 Минск, Беларусь

E-mail: alexanderbakulin@mail.ru

Сыворотка молока является побочным продуктом, образующимся при производстве сыра и казеина. Сывороточные белки богаты незаменимыми аминокислотами и являются, таким образом, наиболее биологически ценной частью белков молока. Однако их использование, зачастую, затруднено из-за высокого сенсибилизирующего потенциала. При этом наибольшими аллергенными свойствами обладает β-лактоглобулин. В связи с этим, нами был предложен метод удаления β-лактоглобулина из сыворотки молока с использованием хитозана. В процессе работы было установлено, что в определенных условиях хитозан способен селективно связывать β-лактоглобулин из смеси белков молочной сыворотки, образуя при этом нерастворимый комплекс. Целью данной работы было изучение взаимодействия хитозана с β-лактоглобулином. Установлено, что наиболее эффективно связывание β-лактоглобулина хитозаном происходит при pH 6,0–6,2. Показано, что с ростом молекулярной массы полисахарида (Mv от 20 до 200 кДа), выделение целевого белка проходит более эффективно. Удаление β-лактоглобулина из молочной сыворотки в виде нерастворимого осадка на 95% происходит, лишь в определенной области концентраций хитозана, которая составляет 0,5–0,7 мг/мл. Изучено влияние ионной силы раствора и концентрации ионов $Ca2^{+}$, оказывающих существенное влияние на процесс формирования комплекса белок-полисахарид. Кроме того, были определены энтропия и энтальпия процесса комплексообразования. Исходя из расчетов термодинамических параметров, показано, что β-лактоглобулин имеет один сайт связывания с хитозаном. При этом каждая субъединица белка образует 6 центров связывания с молекулой хитозана с константой связывания $7{,}6 \times 10^{4}$ M^{-1}. Посредством метода динамического светорассеивания определен размер сформированного комплекса, который составил порядка 1,5 μM. Основываясь на полученных результатах исследований, была разработана технология переработки сыворотки молока с использованием хитозана, позволяющая выделять β-лактоглобулин на 95%, без больших временных затрат и применения специального оборудования. При этом данный подход предусматривает получение двух функционально важных продукта: молочную сыворотку со сниженным сенсибилизирующим потенциалом и β-лактоглобулин в индивидуальном виде.

ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ *MYCOPLASMA HOMINIS* PG37 НА СТРЕССОРЫ: СЕКРЕЦИЯ МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ И РЕОРГАНИЗАЦИЯ ПРОТЕОМА

Баранова Н.Б., Медведева Е.С., Музыкантов А.А., Горшков О.В., Шаймарданова Г.Ф., Чернов В.М., Чернова О.А.

Учреждение РАН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111 Казань, ул. Лобачевского, 2/31

E-mail: natalja-b@yandex.ru

Mycoplasma hominis, одна из наиболее распространенных микоплазм, ассоциированных с социально-значимыми заболеваниями человека, является контаминантом клеточных культур. Решение проблемы инфекций, вызываемых *M. hominis,* связывают с успехами изучения механизмов выживания бактерии в стрессовых условиях. Определение особенностей протеома, а также ультраструктуры клеток *M. hominis* PG37, образующихся в неблагоприятных условиях (изменение температуры и голодание), явилось задачей нашей работы.

Для анализа белков микоплазмы использовали 2D-DIGE, MALDI-TOF/TOF и программу Mascot. Ультраструктуру клеток бактерии исследовали с помощью трансмиссивной электронной микроскопии.

В результате проведенных исследований было установлено, что в культуре *M. hominis* PG37 помимо «типичных» клеток микоплазмы присутствуют ультрамикроформы – сферические, окруженные мембраной наноструктуры (диаметр <0,2 мкм), характерные для мембранных везикул бактерий, вовлеченных в секрецию белков и патогенез. Культивирование *M. hominis* PG37 в стрессовых условиях приводит к увеличению количества ультрамикроформ, переходу бактерии в некультивируемое состояние и изменению профиля растворимых белков. 53 белка, количественное содержание которых различалось у *M. hominis* PG37 при культивировании в оптимальных и стрессовых условиях, были идентифицированы и установлено, что ответные реакции микоплазмы на воздействие стрессоров связаны с модуляцией содержания белков, участвующих в фундаментальных клеточных процессах и вирулентности бактерии. Реорганизация протеома *M. hominis* в стрессовых условиях может быть обусловлена особенностями синтеза белков у бактерии в некультивируемом состоянии, а также протеолиза и трафика белков, в том числе секреции их в составе мембранных везикул, участвующих в адаптации микроорганизмов к условиям среды и реализации вирулентности.

Работа поддержана Грантом Президента Российской Федерации МК-4894.2010.4; РФФИ 11-04-01406а.

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛУТАТИОН S-ТРАНСФЕРАЗЫ ПЕЧЕНИ ЩУКИ

Борвинская Е.В., Смирнов Л.П., Немова Н.Н.

Учреждение РАН Институт биологии КарНЦ РАН, Петрозаводск

E-mail: katsu@inbox.ru

Глутатион S-трансферазы представляют собой древнее и мультифункциональное семейство ферментов, основная роль которых заключается в обезвреживании реактивных электрофильных соединений и в защите клетки от окислительного стресса.

Сравнительный анализ показал, что активность ГСТ в жабрах и печени щук *Esox lucius* заметно (в 10–92 раз) превосходит активность в тканях таких пресноводных рыб, как сиг, плотва и форель (в аквакультуре). С целью изучения структурно-функциональных особенностей ГСТ из печени щук нами была проведена очистка этого фермента по схеме, включающей последовательное применение методов гель-хроматографии, аффинной хроматографии и ультрафильтрации.

Пик активности ГСТ с универсальным субстратом 1-хлоро-2,4-динитробензолом, полученный после гель-хроматографии на носителе Sephadex G-100, соответствует кажущейся молекулярной массе 52,8±3 кДа. С аффинным носителем Glutathione Sepharose 4 Fast Flow связывается менее 23% белка, обладающего специфической активностью глутатион S-трансфераз. После процедуры SDS-электрофореза аффинно очищенная ГСТ щук дает одну белковую полосу с молекулярной массой 29,2 кДа. Аналитическое изоэлектрическое фокусирование в ПААГ показало присутствие главной формы ГСТ щуки с pI 6,6.

Таким образом, слабокислая ГСТ щуки представляет собой гомодимер с молекулярной массой субъединиц 29,2 кДа. Дальнейшего изучения требует возможность присутствия в тканях щук изоформ ГСТ, обладающих слабым сродством к аффинному носителю Glutathione Sepharose 4 Fast Flow.

Данная работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ «Ведущие научные школы Российской Федерации» НШ 3731.2010.4; программы ОБН РАН «Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга» на 2009–2011 гг.

ТЕПЛОВАЯ АГРЕГАЦИЯ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА

Борзова В.А.

Учреждение РАН Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва, Ленинский просп., 33

E-mail: koshemysh@mail.ru

Методом динамического светорассеяния изучена кинетика агрегации бычьего сывороточного альбумина (БСА) в широком диапазоне концентраций белка при различных значениях pH. Исследования проводили при фиксированных температурах и в режиме нагревания с постоянной скоростью. Контроль тепловой денатурации БСА осуществляли методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Показано, что термостабильность белка уменьшается при снижении pH в интервале от 7,0 до 5,5. Согласно данным ДСК величина *Tmax* для БСА при pH 7,0 составляет 57,9°C. Установлено, что процесс агрегации БСА включает стадию образования первичных кластеров и следующую за ней стадию слипания первичных кластеров, которая протекает в диффузионно-контролируемом кинетическом режиме. Подобраны условия (температура 80°C, pH 7,0, концентрация белка 0,75 мг/мл и время нагревания 2 ч), при которых могут быть получены наночастицы БСА с гидродинамическим радиусом 18–20 нм. Обнаружено, что размер таких наночастиц остается стабильным, по меньшей мере, в течение двух суток при комнатной температуре. Индекс полидисперсности для частиц, полученных в указанных условиях, составлял 0,23. Проведен подбор условий для получения стабильных наночастиц при прогревании БСА при более низких температурах (60–70°C).

Полученные наночастицы БСА могут быть использованы для создания систем доставки лекарственных препаратов. Главным недостатком существующих в настоящее время методов получения наночастиц БСА является сложность дальнейшей очистки наночастиц от химических агентов, используемых в процессе их получения. Предложенные в настоящей работе методы получения наночастиц БСА лишены этого недостатка.

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 «Поиск и изучение механизма защитного действия искусственных и природных агентов, подавляющих агрегацию белков».

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОТЕОМА И СЕКРЕТОМА БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА *TRAMETES HIRSUTA* ПРИ РОСТЕ НА СРЕДАХ РАЗНОГО СОСТАВА

Васина Д.В., Федорова Т.В., Королева О.В.

Учреждение РАН Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,
119071 Москва, Ленинский просп., 33, стр.2

E-mail: d.v.vasina@gmail.com

Базидиомицеты, являющиеся возбудителями белой гнили древесины, синтезируют комплекс ферментов лигнолитического действия, осуществляющих процесс делигнификации с высокой эффективностью. Несмотря на перспективность использования данных ферментов в биотехнологии, целлюлозобумажной и других отраслях промышленности, их применение ограничено отсутствием рекомбинантных штаммов с высоким уровнем продукции целевых ферментов. Очевидно, это прежде всего связано с недостаточностью знаний о путях их биосинтеза и регуляции экспрессии в клетке. В связи с этим, в настоящее время ведутся активные работы по аннотации геномов и исследованию протеомов и секретомов различных базидиомицетов.

Целью работы являлось проведение сравнительного анализа протеома и секретома базидиомицета *Trametes hirsuta* – эффективного продуцента лакказы, при культивировании гриба на глюкозо-пептонной среде без добавления и с добавлением в среду CuSO4 в качестве индуктора биосинтеза лигнолитического фермента – лакказы. Разработаны протоколы пробоподготовки мицелия гриба *Trametes hirsuta* для разделения белков протеома методом двумерного электрофореза (2DE), позволившие получить белковые карты хорошего разрешения.

Исследованы динамики активностей внеклеточных ферментов лигнолитического комплекса: лакказы, лигнин и марганец зависимой пероксидаз, марганец независимой пероксидазы и арилакоголь оксидазы. Установлено наличие индукции ионами меди для лакказы и марганец независимой пероксидазы. В результате сравнительного анализа белковых карт протеома, полученных при максимальной продукции лакказы *Trametes hirsuta,* показаны значительные отличия в общем количестве и картине распределения белковых пятен. Обнаружено более 10 белковых пятен, соответствующих белкам с молекулярными массами в диапазоне 40–60 кДа и значениями pI – 8.0–9.0, интенсивность которых существенно увеличивалась при разделении белков методом 2DE, выделенных из мицелия гриба при его росте в присутствии индуктора. Проводится идентификация данных белков методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 11-04-01349).

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ ГАПОНИНА И ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА БЫКА *BOS TAURUS*

Воробьева Е.Е.[1,2], Костанян И.А.[2], Гринкевич В.А.[1], Липкин В.М.[2]

[1]*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва*
[2]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

E-mail: e-elena777@yandex.ru

Ранее в лаборатории белков гормональной регуляции ИБХ РАН из митохондриальной фракции клеток линии HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека был выделен новый белок, взаимодействующий с поликлональными антителами к одной из изоформ фактора дифференцировки HLDF (Human Leukemia Differentiation Factor). Этот белок получил название гапонин (haponin, HLDF-alike protein). Анализ аминокислотной последовательности гапонина показал, что исследуемый полипептид представляет собой гипотетический белок NP_115701.2, известный в PubMed еще под именами MGC11102 и eIF1AD. Анализ базы данных бинарных взаимодействий CCSB-HI1 показал, что гипотетический белок MGC11102 является партнером взаимодействия фактора транскрипции STAT1 (Signal Transducers and Activators of Transcription). Поиск партнеров гапонина в клетках линии CHO-K1 показал, что гапонин взаимодействует с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой (GAPDH) – ферментом гликолиза, преимущественно локализующимся в цитоплазме клетки.

С целью уточнения клеточной локализации гапонина было проведено выделение митохондрий из сердца быка (*Bos taurus*), разделение митохондрий на субфракции растворимых белков, внешних мембран и субмитохондриальных частиц и иммуноблот-анализ полученных фракций с использованием поликлональных антител против рекомбинантного гапонина. Параллельно, субфракции митохондрий анализировались на присутствие GAPDH. В результате было установлено, что оба белка присутствуют в субмитохондриальных частицах. Данные иммуноблот-анализа были подтверждены путём выявления исследуемых белков в соответствующих фрагментах акриламидного геля с помощью Maldi-TOF масс-спектрометрии пептидного фингерпринта, а для GAPDH – ещё и анализом N-концевой аминокислотной последовательности.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ОХАРАКТЕРИЗАЦИЯ РИЦИНА И ПРОДУКТОВ ЕГО ДЕГРАДАЦИИ В ВОДНОЙ СРЕДЕ

Гладилович В.Д., Краснов К.А., Подольская Е.П.

ФГУН Институт токсикологии ФМБА России, 192019 С.-Петербург, ул. Бехтерева, 1

E-mail: vdgladilovich@gmail.com

Рицин – белок, образующийся в касторовых бобах (*Ricinus communis*), является токсином, который при отравлении блокирует биосинтез белка и может вызвать летальный исход. Из-за его широкого распространения и высокой токсичности, рицин считается вероятным агентом для биотерроризма. Следовательно, чрезвычайно важной является возможность быстрого и надежного определения рицина в объектах окружающей среды, и в первую очередь в воде. Рицин – гликозилированный белок массой около 65 кДа, состоящий из 2 субъединиц массой примерно 30 кДа каждая. Поскольку масса цельного белка малоинформативна в масс-спектрометрическом анализе, необходимо проводить ферментативный гидролиз (например, трипсином), чтобы получить набор характеристичных надежно идентифицируемых пептидов. Масс-спектрометрический анализ гликозилированных пептидов чрезвычайно затруднен, поэтому необходимо оценить ряд пептидов, по которым можно достоверно определять рицин в образцах. Рицину часто сопутствует агглютинин, белок, гомологически близкий к нему (аминокислотная последовательность совпадает на 90%, близкие молекулярные массы). Соответственно, необходимо также выявить пептиды, по которым можно различить эти два белка. Белки, как правило, нестабильны в воде, поэтому необходимо оценить время, в течение которого рицин и агглютинин можно обнаружить в образцах в неизменном виде, а также охарактеризовать продукты их распада для надежной идентификации этих белков.

В результате работы методом MALDI-TOF-TOF были определены характерные для рицина и агглютинина пептиды, по которым белки могут быть надежно идентифицированы. Наиболее интенсивными являются: для рицина YTFAFGGNYDR (MH^+ 1310.58) и AGNSAYFFHPDNQEDAEAITHLFTDVQNR (MH^+ 3307.50 Да), для агглютинина ENIELGTGPLEDAISALYYYSTC*GTQIPTLAR (MH^+ 3516.72) и SNTDWNQLWTLR (MH^+ 1533.74). С помощью метода SDS-гель-электрофореза показано, что спустя 14 дней в водных образцах, содержащих рицин и агглютинин, эти белки могут быть обнаружены в неизменном виде. Характерные пептиды также были обнаружены масс-спектрометрически. Были охарактеризованы продукты деградации рицин и агглютинина в воде и определены характерные для этих продуктов пептиды.

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЦА БЫКА *BOS TAURUS*. АНАЛИЗ БЕЛКОВ ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЫ

Громова Е.В.[1], Поляков Н.Б.[2], Гринкевич В.А.[1]

[1]*Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,*
119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.12
[2]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

E-mail: Danone2006@yandex.ru

Последние данные показывают, что протеомный анализ целых клеток или тканей с помощью доступных технологий может быть слишком сложным и неприемлемым для изучения белков, представленных в малом количестве копий. Относительно низкий уровень сложности митохондрий в сочетании с особой важностью функций, выполняемых в клетке (энергетический метаболизм, апоптоз, ионный гомеостаз), делают митохондрии очень привлекательными для протеомного анализа. Свою основную функцию, окислительное фосфорилирование, митохондрии выполняют во всех клетках, однако белковый состав митохондрий изменяется в зависимости от типа и состояния клетки. Протеомика может дать ключ к пониманию того, как митохондрии ведут себя в тех или иных физиологических состояниях организма. Настоящая работа является частью широкомасштабного исследования протеома митохондрий сердца быка и включает в себя идентификацию и анализ белков внутренней мембраны. Для выделения фракции внутренних мембран очищенные митохондрии обрабатывали ультразвуком. В результате такой обработки внешние и внутренние мембраны образуют замкнутые везикулы различной плотности (в случае внутренних мембран они носят название субмитохондриальных частиц – СМЧ). Так как белки внутренней мембраны митохондрий располагаются своими частями как в липидном бислое, так и вне его, был разработан подход многостадийного гидролиза белка. Это позволило получить несколько независимых выборок, а сочетание нескольких методов расщепления белков повышало достоверность идентификации при поиске белков по базам данных. В результате триптического расщепления были получены экстрамембранные фрагменты белков. Гидрофобные трансмембранные фрагменты расщепляли с помощью бромциана по остаткам метионина. Далее смесь пептидов подвергалась последовательным катионобменному и обращенно-фазовому фракционированиям, сопряженным с тандемной масс-спектрометрией. В соответствии с полученными масс-спектрами проводилась идентификация белков по различным компьютерным базам данных.

В результате было достоверно определено 298 белков, для которых был проведен анализ их локализации в клетке и выполняемых функций.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТАЛЛ-АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ АЛКИЛИРОВАННЫХ АДДУКТОВ ГЛОБИНА КРЫСЫ

Дубровский Я.А.[1], Гладилович В.Д.[2], Краснов И.А.[2], Мурашко Е.А.[1], Подольская Е.П.[2], Бабаков В.Н.[1], Гончаров Н.В.[1]

[1]ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, г.п. Кузьмоловский, ст. Капитолово, корп. № 93
[2]Учреждение РАН Институт аналитического приборостроения РАН, 190103 С.-Петербург, Рижский просп., 26

E-mail: jar.chem@mail.ru

Перспективными долгоживущими биомаркерами интоксикации для сернистого иприта являются алкилированные ковалентные аддукты с сывороточным альбумином и гемоглобином. Определение нестандартных посттрансляционных модификаций белков крови и определение аминокислотного сайта модификации с использованием масс-спектрометрии позволяет создать метод ретроспективной диагностики отравлений опасными химикатами.

Основной проблемой при выявлении модификаций является очень небольшое количество модифицированного белка (пептида) по отношению к немодифицированному. Поэтому возникает необходимость в разработке методов выделения и обогащения модифицированных белков и пептидов. Нами была предложена методика с использованием метода металл-аффинной хроматографии с хелатированными ионами Cu^{2+}, которая позволяет увеличить чувствительность анализа и может быть успешна применена для выявления посттрансляционных модификаций глобина сернистым ипритом.

В данном исследовании изучалась возможность применения металл-аффинной хроматографии при работе с глобином крысы, инкубированным с сернистым ипритом. Сернистый иприт способен алкилировать глобин крысы в бета-субъединице по С-93 и С-126, а в альфа-субъединице по Е-27. На основании принципа жестких и мягких кислот и оснований Пирсона, было сделано предположение, что пептиды, модифицированные сернистым ипритом, могут образовывать устойчивые комплексы с Cu^{2+}.

Хроматографическое разделение гидролизата глобина крысы, инкубированного с HD, проводили с помощью хелатирующей мембраны, содержащей ионы Cu^{2+}, в формате твердофазной микроэкстракции. После элюирования с сорбента 0,5% пиперидином, с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра (Axima Perfomance, Shimadzu/Kratos Analytical, Великобритания) удалось обнаружить сигнал с массой MH^+ 1444,62 Да. Данный сигнал соответствует пептиду $EFTPC_{HD}AQAAFQK$ который входит в состав бета-субъединицы глобина крысы, модифицированной сернистым ипритом по С-126.

ПРОТЕОМНЫЙ ОТВЕТ КОРНЕЙ ГОРОХА НА ДЕЙСТВИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И МЕТИЛЖАСМОНАТА

Егорова А.М., Яковлева В.Г.

Учреждение РАН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111 Казань, ул. Лобачевского, 2/31, а/я 30

E-mail: aevtinaegorova@gmail.com

Салициловая (СК) и жасмоновая кислоты (ЖК) являются стрессовыми фитогормонами растений, участвующими в защитном ответе на действие абиотических и биотических стрессоров. СК принимает участие в индукции иммунитета растений к биотрофным патогенам, тогда как ЖК эффективна в защите от некротрофов. СК- и ЖК-индукция иммунитета определяется комплексом изменений в метаболизме растений, многие из которых зависят от адаптивных изменений экспрессии генов и синтезе антипатогенных белков. Мы использовали протеомный подход, чтобы проанализировать, какие изменения происходят в белковом спектре корней гороха при действии СК и метилжасмоната (МеЖК).

Так как СК и МеЖК являются индукторами иммунитета, то можно было ожидать, что оба сигнальных соединения вызовут изменения в содержании части защитных белков. Действительно, такие белки были обнаружены, в том числе аскорбатпероксидаза. Обнаружена и значительная специфика в изменении протеомов в ответ на СК и МеЖК. Наиболее заметные изменения под влиянием СК происходили в кислой области, где повышалось содержание ряда белков, которые являются маркерными при действии СК на корни гороха. Также, СК вызывала изменение содержания 14-3-3 белка, полиубиквитина, шапернонина60, глютатион-S-трансферазы и др. МеЖК также вызывала изменение содержания белков, среди которых сильно индуцировались белки в кислой области, но с меньшей молекулярной массой, чем СК-индуцируемые маркерные белки. В отличие от СК-индуцируемых, основная часть МеЖК-индуцируемых белков имела относительно небольшие молекулярные массы – от 16 до 22 кДа. МеЖК вызывала изменение содержания профукозидазы, ABR17 (АБК-зависимый белок) семейства патоген-индуцируемых белков PR 10.

СК и МеЖК вызывают изменения протеома корней гороха, причем, есть белки, индуцируемые обеими сигнальными молекулами и белки, являющиеся характерными на действие того или другого соединения, что объясняет специфику ответа растений на действие биотрофных и некротрофных патогенных микроорганизмов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 10-04-01281 и грантом Президента Российской Федерации по государственной поддержке ведущих научных школ НШ-6992.2010.4.

СЕРПИН Н1, ПРОДУКТ ГЕНА *SERPINH1*, – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ БИОМАРКЕР РАКОВОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ В ЭПИТЕЛИОПОДОБНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЧЕЛОВЕКА

Иванов А.В.[1], Еремина Л.С.[1], Лисицкая К.В.[1], Хряпова Е.В.[2], Торопыгин И.Ю.[2], Ковалева М.А.[1], Ковалев Л.И.[1], Шишкин С.С.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва, Ленинский просп., 33*
[2]*Учреждение РАМН НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Москва*

E-mail: kovalyov@inbi.ras.ru

Серпин Н1 человека – продукт гена *SERPINH1,* известный также как белок теплового шока 47 (HSP47) и коллаген-связывающий белок 2 (CBP2), считается представителем большого семейства серин-аргинин протеазных ингибиторов (serine-arginine protease inhibitor – serpin), в которое объединены на основе структурного сходства белки, как обладающие ингибиторными свойствами, так и без ингибиторных свойств [Silverman G.A. et al. 2001; P50454 UniProt]. В настоящее время серпин Н1 и некоторые другие члены семейства серпинов активно исследуется для выяснения их роли в процессах трансформации клеток и метастазирования раковых опухолей.

В данной работе был проведен сравнительный протеомный анализ ряда эпителиоподобных клеточных линий человека простаты (PZ – норма, BPH-1 – аденома, LNCaP, PC3 и DU145 – рак) и молочной железы (184A1 – норма, MCF, T47 – рак), а также в линиях клеток рабдомиосаркомы RD и A-204. В ходе выполненных исследований по результатам MALDI-TOF масс-спектрометрии во всех изучавшихся клеточных линиях удалось идентифицировать белковую фракцию, принадлежащую серпину Н1 – продукту гена *SERPINH1*. При этом с помощью компьютерной денситометрии было выявлено резкое снижение содержания серпина Н1 в раковых клеточных линиях (от 20 до 100 раз) в сравнении с немалигнизированными клетками, включая клетки аденомы (доброкачественной опухоли). Однако в клетках обеих линий рабдомиосаркомы серпин Н1 присутствовал в количествах, сопоставимых с его содержанием в немалигнизированных клетках и простаты, и молочной железы. Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что резкое падение содержания серпина Н1 в раковых клетках, вероятно, связано с процессом малигнизации именно эпителиоподобных клеток человека и указанный белок можно рассматривать как потенциальный биомаркер такой трансформации.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВОГО ХИТИНАЗОПОДОБНОГО БЕЛКА КРЫСЫ В МОДЕЛИ ОСТРОГО ВОСПАЛЕНИЯ

Ильницкая Е.В., Радченко В.В., Родионова А.С., Шуваева Т.М., Липкин В.М.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: ilnitskaya@mx.ibch.ru

Слизистая оболочка обонятельного эпителия является барьерной тканью, контактирующей с окружающей средой, и осуществляет неспецифическую иммунную защиту организма. Целью нашей работы было исследование новых белков, чей синтез и длительное нахождение в ткани способствует появлению хронического воспаления, лежащего в основе развития старения, злокачественных и аутоиммунных процессов.

В одном из опытов при электрофоретическом анализе белкового экстракта обонятельной выстилки крыс с системным воспалением был обнаружен новый, не описанный в литературе «хитиназоподобный» белок (M ~ 43 кДа), родственный YM-1 мыши и названный нами, в соответствии с местом локализации (epithelium olfacctorium), YM-1olf. Для исследования нового белка была выбрана модель животных с острым эндотоксикозом. Крысам внутрибрюшинно вводили дозу липополисахарида *E.coli* штамма O26:B6 в количестве 1,5 мг/кг и через сутки животных выводили из эксперимента.

Определена полная нуклеотидная последовательность гена, кодирующего новый белок YM-1olf крысы и участки его 5`- и 3`-нетранслируемых областей. Впервые представлена последовательность полноразмерной кДНК белка YM-1olf (включающая 1545 п.о.), экспрессирующейся в обонятельной выстилке крыс с острым эндотоксикозом.

Установлена последовательность предшественника зрелой формы YM-1olf крысы. Полноразмерный белок YM-1olf содержит 380 аминокислотных остатков и имеет молекулярный вес 42986 Да. Получена конструкция, обеспечивающая продукцию рекомбинантного аналога, и осуществлен синтез YM-1olf в прокариотической системе. Нами показано резкое увеличение уровня экспрессии гена данного белка в обонятельной выстилке крыс в моделях с острым эндотоксикозом и болезнью Альцгеймера. Изучена взаимозависимость экспрессии генов YM-1olf и защитного липидпереносящего белка rSec45 в клетках обонятельного эпителия крыс в модели острого воспаления.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (В.М. Липкин) и гранта РФФИ № 11-04-00761.

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРЛЕКАНА ИЗ ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА

Комарова М.С., Ермакова И.И.

Учреждение РАН Институт цитологии РАН, 194064 С.-Петербург, Тихорецкий просп., 4

E-mail: marrgosha@inbox.ru <mailto:marrgosha@inbox.ru>

Протеогликаны (ПГ) – важнейшие компоненты внеклеточного матрикса, базальных или плазматических мембран, а также секреторных гранул клетки. ПГ состоят из корового белка, ковалентно связанного с цепями гликозаминогликанов (ГАГ). Пристальное внимание уделяется изучению перлекана – модулярного ПГ, коровый белок которого имеет сложное мультидоменное строение, а углеводные цепи представлены 3–10 гепарансульфатами и/или хондроитинсульфатами. Перлекан обладает широким спектром биологических свойств, многие из которых до конца не изучены: регулирует активность цитокинов/факторов роста, адгезию, пролиферацию и дифференцировку клеток, стимулирует ангиогенез, играет важную роль в эмбриональном развитии. Перлекан выделяют из органов и тканей, богатых сосудами, например, из EHS-саркомы или плаценты. Целью данной работы было найти оптимальные условия для выделения перлекана из плаценты человека для последующего изучения его биологической активности на культурах клеток.

На первом этапе выделения из плаценты была удалена большая часть белков в результате экстракции буфером TBS. Оставшиеся ПГ экстрагировали буфером на основе 4М гуанидинхлорида. Растворенные ПГ сорбировали на Q-сефарозе, затем проводили ионообменную хроматографию в буфере, содержащем 7М мочевину. Полученные фракции обрабатывали ферментами, расщепляющими цепи ГАГ, после чего коровые белки выявляли с помощью электрофореза в 3–15% градиентном ПААГ. Электрофоретический анализ показал, что во всех фракциях кроме перлекана присутствует еще один ПГ, электрофоретические характеристики которого соответствуют бигликану, принадлежащему семейству «SLRPs» («малых лейцин-богатых ПГ»). Для разделения модулярных и малых ПГ рекомендовано использовать гель-фильтрацию на Superdex 200 или Superose 6. Однако в данном случае эти носители оказались не эффективны: были получены плохо разрешенные пики и выявлено образование высокомолекулярных агрегатов. Использование диссоциативных условий для проведения гель-фильтрации не помогло избежать агрегации. И только применение Sephacryl S-1000 с очень высоким пределом эксклюзии позволило разделить два ПГ плаценты.

ЛЕКТИН ИЗ МИДИИ *MYTILUS TROSSULUS*: ВЫДЕЛЕНИЕ И ОСНОВНЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Кондрашина А.С.[1], Чикаловец И.В.[2], Черников О.В.[2]

[1]*Дальневосточный федеральный университет, 690950 Владивосток, ул. Суханова, 8*
[2]*Учреждение РАН Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, 690022 Владивосток, просп. 100 Лет Владивостоку, 159*

E-mail: kondrashina.alex@gmail.com

Лектины – белки или гликопротеины неиммунной природы, специфически и обратимо связывающие моно-, олигосахариды и гликоконъюгаты, не вызывая их химического превращения. В эволюционном плане лектины морских беспозвоночных являются предшественниками антител и формируют примитивную иммунную систему, демонстрируют антибактериальную, цитотоксическую, противоопухолевую, митогенную, анти-ВИЧ активности. Поиск новых источников и изучение свойств и функций лектинов вносит вклад в фундаментальную науку об углевод-белковом взаимодействии и открывает новые возможности для медико-биологических исследований.

Из экстракта мантии мидии *Mytilus trossulus* методами аффинной хроматографии на гидролизованной сефарозе и гель-проникающей хроматографии выделен лектин (MTL) с молекулярной массой около 18 кДа. Наибольшую гемагглютинирующую активность MTL проявил при взаимодействии с трипсинизированными эритроцитами человека группы А. Методом гемагглютинации было показано, что MTL является металл-независимым лектином, проявляющим наибольшую активность в интервале pH 9-10 и полностью теряющим активность при нагреве до 60°C в течение 30 минут. Методом ингибирования гемагглютинации установлено, что MTL относится к Gal/GalNAc-специфичным лектинам и проявляет аффинитет к гликопротеинам, содержащим цепи муцинового типа: PSM и Fetuin. Ранее из мидии *Crenomytilus grayanus* был выделен и охарактеризован Gal/GalNAc-специфичный лектин (CGL). *Cr. grayanus* и *M. trossulus* принадлежат к одному семейству *Mytilidae*, выделенные из них лектины имеют сходные молекулярные массы. Методом иммуноферментного анализа установлено, что перекрестная реактивность между CGL и MTL составляет 50%. Полученные результаты хорошо согласуется с литературными данными о высокой степени гомологии между лектинами, выделенными из близких видов животных или растений.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОБНАРУЖЕНИЯ АДДУКТОВ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ КРЫСЫ

Краснов И.А.[1], Гладилович В.Д.[1], Дубровский Я.А.[2], Войтенко Н.Г.[2], Бабаков В.Н.[2], Подольская Е.П.[1], Гончаров Н.В.[2]

[1]Учреждение РАН Институт аналитического приборостроения РАН, 190103 С.-Петербург, Рижский пр., 26
[2]ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская обл., г.п. Кузьмоловский

Фосфорорганические соединения (ФОС) используются как пестициды в сельском хозяйстве, антигельминты в медицине, добавки к гидравлическим жидкостям и масло для реактивных двигателей в авиации. Эти соединения токсичны для насекомых, рыб, птиц и млекопитающих. Одним из перспективных долгоживущих биомаркеров интоксикации фосфорорганическими соединениями (ФОС) является ковалентный аддукт ФОС с сывороточным альбумином.

Для идентификации воздействия ФОС на организм может служить поиск белков и пептидов внутренних сред организма, модифицированных токсичным агентом либо его метаболитами, причем наиболее удобным объектом исследования представляется сывороточный альбумин. Альбумин является мажорным компонентом белковой фракции крови, это важнейший белок-переносчик, способный транспортировать соединения различной химической природы. Известно, что многие ФОС способны образовывать прямые аддукты с этим белком, что может быть зафиксировано методами масс-спектрометрии.

При разработке масс-спектрометрической методики обнаружения аддуктов ФОС с альбумином крови был выбран в качестве объектов исследования параоксон. Предложенная методика включает следующие стадии: выделение альбумина из сыворотки крови методом аффинной хроматографии на триазиновых красителях; ферментативный гидролиз белка трипсином (при необходимости контроль прохождения гидролиза осуществляется при помощи МС-анализа гидролизата, также на этой стадии можно проводить предварительный поиск модифицированных пептидов); обогащение образца фосфорсодержащими пептидами с использованием металл-аффинной хроматографии на сорбентах, содержащих Fe^{3+}; МС-анализ пептидов после металл-аффинной хроматографии (при необходимости идентификация модифицированных пептидов методом тандемной масс-спектрометрии).

Показано, что при применении предложенной методики подготовки пробы становится возможным обнаружение пептидов альбумина, модифицированных параоксоном, в частности, обнаружен сигнал, принадлежащий пептиду альбумина, а именно пептид RHPYFYRVXAPELLYYAEK, модифицированный параоксоном по остатку тирозина Y-150.

НОВЫЕ ПОЛИПЕПТИДНЫЕ ИНСЕКТОТОКСИНЫ ИЗ ЯДА ПАУКА *LACHESANA TARABAEVI*

Кузьменков А.И., Василевский А.А., Гришин Е.В.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: anteka@ya.ru

Яд пауков – богатый источник разнообразных биологически активных веществ от низкомолекулярных соединений до больших многодоменных белков, а изучение его отдельных компонентов представляет большой фундаментальный интерес и может иметь практическое значение. В рамках данной работы мы исследовали пять новых полипептидов из яда паука *Lachesana tarabaevi* (семейство Zodariidae, пауки-муравьеды), проявляющих инсектицидные свойства.

Цельный яд *L. tarabaevi* подвергли разделению, используя традиционные методы эксклюзионной и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, полученные фракции тестировали на личинках мясной мухи. В результате удалось получить в индивидуальном виде пять новых полипептидных инсектотоксинов ($ЛД_{50}$ ~ 20 мг/кг), получивших название латартоксинов (LtTx). Молекулярные массы выделенных веществ, по данным масс-спектрометрии, составили ~6,5–8,5 кДа. Полные аминокислотные последовательности LtTx (60–71 остатков) были установлены с помощью комбинации методов автоматического секвенирования по Эдману, масс-спектрометрии и селективного протеолиза. На основании сходства аминокислотных последовательностей LtTx объединены в два семейства, представители которых напоминают описанные ранее токсины CSTX и LSTX из яда пауков *Cupiennius salei* (Ctenidae) и *Lycosa singoriensis* (Lycosidae). Три LtTx содержат восемь остатков цистеина и четыре внутримолекулярные дисульфидные связи, а два других отличаются наличием еще одного S-S-мостика. Кроме того, для трех полипептидов характерно С-концевое амидирование. Интересной особенностью новых токсинов является то, что они имеют цистеин-богатый участок, характерный для множества нейротоксинов из ядов пауков, а также линейную область, напоминающую цитолитические пептиды. Предполагается, что эта линейная область обеспечивает сродство полипептидов к мембранам, затем вследствие латеральной диффузии происходит специфичное взаимодействие токсинов с белковыми рецепторами.

Работа поддержана грантами Президиума РАН (программа фундаментальных исследований «Молекулярная и клеточная биология»), Минобрнауки РФ (Госконтракты №№ П1388 и 16.512.11.2195), РФФИ (№№ 08-04-00454 и 11-04-00706).

АДАПТАЦИЯ МИКОПЛАЗМ К ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ: ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ КЛЕТОК *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* PG8, ВЫРАЩЕННЫХ В ОПТИМАЛЬНЫХ И СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ

Медведева Е.С., Музыкантов А.А., Ефимова И.Р., Давыдова М.Н., Чернова О.А., Чернов В.М.

Учреждение РАН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111 Казань, ул. Лобачевского, 2/31

E-mail: elena-med@list.ru

Acholeplasma laidlawii (класс Mollicutes) – «вездесущая» микоплазма, являющаяся основным контаминантом клеточных культур и возбудителем фитомикоплазмозов. Решение проблемы контроля инфекций, вызываемых *A. laidlawii*, связывают с успехами изучения молекулярных основ адаптации бактерии к различным условиям среды. Выявление стресс-реактивных белков *A. laidlawii* PG8 явилось целью нашей работы.

2D-DIGE и MALDI-TOF/TOF использовали для протеомного профилирования клеток *A. laidlawii* PG8, культивируемых в оптимальных и неблагоприятных условиях (окислительный стресс, снижение температуры, изменение субстрата и голодание).

В результате нашего исследования был идентифицирован 121 стресс-реактивный белок микоплазмы, вовлеченный (согласно COG) в репликацию, репарацию, рекомбинацию, транскрипцию, трансляцию, энергообразование, транспорт и метаболизм углеводов, нуклеотидов и аминокислот, а также промежуточный метаболизм, сигнальную трансдукцию и защитные механизмы, и установлено, что ответные реакции *A. laidlawii* PG8 на стрессоры связаны с модуляцией содержания как специфичных, так и общих, характерных для разных типов стрессов, белков. У микоплазмы в стрессовых условия наблюдалось значительное повышение количества PNPase – глобального регулятора адаптации некоторых патогенных бактерий – и снижение содержания белков, вовлеченных в вирулентность. Адаптация *A. laidlawii* PG8 к стрессовым условиям сопровождалась изменением вирулентных свойств бактерии. Белки, изменение количественного содержания которых возникает у *A. laidlawii* PG8 в неблагоприятных условиях среды, являются элементами механизмов адаптации микоплазмы к стрессорам и потенциальными мишенями контроля инфекций, вызываемых этой бактерией.

Работа поддержана грантами Президента Российской Федерации (МК-4894.2010.4) и РФФИ (№ 11-04-01406а).

ИССЛЕДОВАНИЕ НОВОГО ТРЕХПЕТЕЛЬНОГО ТОКСИНА ИЗ ЯДРА КОБРЫ *NAJA KAOUTHIA*

Мещерякова А.В., Кашеверов И.Е., Крюкова Е.В., Макарова Я.В., Осипов А.В., Уткин Ю.Н.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: iozefkneht@yandex.ru

Структурно-функциональная характеристика нейрорецепторов является важной задачей в связи с вовлеченностью этих рецепторов в патогенез многих заболеваний. Так называемые трёхпетельные токсины змей за счет селективности действия являются незаменимыми инструментами в исследовании нейрорецепторов.

Путем поэтапной жидкостной хроматографии нами был выделен новый трёхпетельный токсин из яда кобры *Naja kaouthia*. Разделение яда включало в себя гель-фильтрацию, катионообменную, анионообменную, обратнофазовую хроматографии и обессоливание после каждого этапа.

Масса выделенного токсина (a21.1) составляет 6845 Да. По первичной структуре a21.1 отнесен к трехпетельным токсинам группы XX (по классификации Fry et al., 2003), так называемых «орфанотоксинов», мишень действия которых на сегодняшний момент не определена.

В экспериментах по конкуренции с альфа-бунгаротоксином за связывание с ацетилхолинсвязывающим белком (АХСБ) моллюска, который является водорастворимым аналогом внеклеточной области н-АХР и других т.наз. цис-петельных рецепторов, a21.1 увеличивал связывание радиоактивно меченного альфа-бунгаротоксина с АХСБ.

В экспериментах по определению острой токсичности для мышей, при измерении цитотоксичности на линиях клеток PC12 (феохромоцитома надпочечников крысы) и HT1080 (карцинома легких человека), а также при взаимодействии с тремя подтипами н-АХР (α7, α4β2 и мышечного подтипов) a21.1 не проявил активности в концентрациях до 10 мкМ.

Таким образом, белок из группы орфанотоксинов способен к взаимодействию с белком, обладающим структурой, подобной внеклеточной области цис-петельных рецепторов, не связываясь при этом с классическими мишенями альфа-нейротоксинов яда змей. Возможно, он действует на другой тип цис-петельных рецепторов, который теперь необходимо установить.

ВЛИЯНИЕ КРАСНОГО ПИГМЕНТА НА АМИЛОИДИЗАЦИЮ ДРОЖЖЕВЫХ БЕЛКОВ

Михайлова Е.В., Артемов А.В., Сойдла Т.Р., Невзглядова О.В.

Учреждение РАН Институт цитологии РАН, 194064 С.-Петербург, Тихорецкий пр., 4

E-mail: mikhailovaev2004@mail.ru

«Протеинопатии» или «конформационные заболевания» человека и животных имеют в своей основе изменения пространственной структуры, ведущие к анормальной агрегации белков с образованием амилоидных фибрилл. Открытие прионов у одноклеточного микроорганизма дрожжей создало новые возможности для изучения конформационных заболеваний. Фракцию амилоидизированных белков, выделенную из штаммов *Saccharomyces cerevisiae*, несущих мутацию в гене *ADE1* или *ADE2* и накапливающих красный пигмент (продукт полимеризации аминоимидазолриботида), изучали, оценивая флуоресценцию красителя тиофлавина Т, селективно связывающегося с амилоидными фибриллами. Было показано, что на среде, содержащей десятикратный избыток аденина, который подавляет синтез пуринов de novo, блокируя образование красного пигмента, флуоресценция тиофлавина, связанного с амилоидом, увеличивается в несколько раз. К аналогичному эффекту приводит возникновение мутаций, блокирующих первые этапы биосинтеза пуринов и подавляющих синтез красного пигмента. Генерация мутаций в генах *ADE1* или *ADE2* в исходно белых прототрофных по аденину штаммах дрожжей приводит к значительному падению флуоресценции. Изучение фракции белковых полимеров посредством электрофореза в агарозном геле позволило предположить, что изменения флуоресценции действительно связаны с понижением количества амилоида в клетках, накапливающих красный пигмент. Опыты на модельных фибриллах инсулина свидетельствуют в пользу того, что красный пигмент взаимодействует с готовыми фибриллами, препятствуя их связыванию с тиофлавином Т. Данные электронной микроскопии выявляют редуцированные по размеру фибриллы инсулина в случае, когда их выращивание происходит в присутствии красного пигмента. Сравнение осадочных белков, выделенных из красных и белых изогенных штаммов в 2D-электрофорезе с последующим масс-спектроскопическим анализом, позволило идентифицировать 23 пигмент-зависимых белка. Среди них преобладают шапероны и белки, участвующие в метаболизме глюкозы, что делает их близкими по составу к прион-ассоциированным белкам, выявленным нами ранее. Предполагается, что красный пигмент, связываясь с амилоидными фибриллами, препятствует образованию прионовых агрегатов.

Работа поддерживалась грантом РФФИ (№ 09-04-00750-а) и программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (2008–2012 гг.)

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЛОБИНА КРЫСЫ И ЧЕЛОВЕКА С АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ *IN VITRO*: МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЦЕТИЛИРОВАННЫХ ЛИЗИНОВ

Мурашко Е.А.[1], Шрейнер Е.В.[2], Дубровский Я.А.[1], Подольская Е.П.[2], Бабаков В.Н.[1], Гончаров Н.В.[1]

[1]ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская обл., Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, ст. Капитолово, корп. № 93
[2]Учреждение РАН Институт аналитического приборостроения РАН, 190103 С.-Петербург, Рижский пр., 26

E-mail: kate.murashko@gmail.com

Важной задачей при проведении фармакокинетических исследований является изучение связывания лекарственных препаратов с белками крови, так как лишь несвязанное компонентами крови вещество способно к проявлению терапевтического эффекта. На сегодняшний день для решения подобных задач успешно привлекаются методы масс-спектрометрии, позволяющие не только зафиксировать факт связывания (модифицирования) белка с лекарственным препаратом, но и идентифицировать модификацию.

Известно, что ацетилсалициловая кислота (АСК) способна ацетилировать не только сывороточный альбумин, но и другой мажорный белок кровеносного русла – гемоглобин.

Целью данной работы было исследование возможности образования ковалентных аддуктов глобина крысы и человека с ацетилсалициловой кислотой с установлением сайтов ацетилирования. Для выявления аддуктов исследовали образцы очищенных глобинов человека, которые подвергали воздействию аспирина *in vitro*. Был проведен триптический ферментативный гидролиз этих образцов. Полученные гидролизаты в дальнейшем исследовали с помощью масс-спектрометра MALDI-TOF-TOF Axima Perfomance (Shimadzu/Kratos Analytical, Великобритания). В масс-спектрах проводили поиск сигналов, соответствующих ацетилированным триптическим пептидам глобинов и имеющих сдвиг m/z в область больших масс на 42,01 Да. Было установлено, что каждый из обнаруженных пептидов содержит неконцевой лизин. Для подтверждения модификации пептиды были проанализированы методом тандемной масс-спектрометрии с фрагментацией CID.

Таким образом, в результате работы был обнаружен ряд пептидов, ацетилированных по лизину, и показано, что глобин крысы способен модифицироваться АСК по К-17 и К-57 в субъединице альфа и по К-96 в субъединице бета, а глобин человека – по К-17, К-41 и К-57 в субъединице альфа и К-18, К-121 в субъединице бета.

ПЕПТИДНЫЙ АНТИБИОТИК МИКРОЦИН С (McC): ТРАНСПОРТ McC И РОЛЬ БЕЛКА MccE МИКРОЦИНОВОГО ОПЕРОНА В КЛЕТКЕ

Новикова М.[1], Серебрякова М.[2], Метлицкая А.[1], Северинов К.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН,*
123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2
[2]*Учреждение РАМН НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН,*
119121 Москва, ул. Погодинская, 10

E-mail: Novimv@mail.ru

Микроцин С (McC) – пептидный антибиотик, который ингибирует синтез белка у представителей семейства *Enterobacteriaceae*. McC представляет собой гептапептид с модифицированным посредством аминопропильной группы аденозинмонофосфатом. В цитоплазме чувствительных клеток пептидная часть антибиотика подвергается процессингу, в результате которого образуется активный ингибитор трансляции – негидролизуемый модифицированный аспартиладенилат. Это соединение является ингибитором аспартил-тРНК-синтетазы. Гены, необходимые для созревания антибиотика, а также обеспечения устойчивости клетки-продуцента к синтезируемому McC, образуют оперон *mccABCDEF*.

Система транспорта McC до конца не изучена. Нами показано, что клетки, содержащие делецию гена *ompF*, кодирующего один из основных поринов *E. coli*, частично устойчивы к антибиотику. Кроме того, идентифицирован ABC транспортёр YejABEF, находящийся во внутренней мембране *E. coli*, который обеспечивает транспорт McC в цитоплазму клетки. Транспорт антибиотика из клетки-продуцента обеспечивает белок MccC. Белок TolC, который экспортирует ряд других известных микроцинов, включая McB и McJ, не является участником системы транспорта McC.

Продукт гена *mccE* микроцинового оперона представляет собой двудоменный белок, который необходим как для синтеза McC, так и обеспечения устойчивости клетки к антибиотику. N-Концевой домен MccE, предположительно, имеет декарбоксилазную активность и участвует в присоединении аминопропильной группы к промежуточной форме синтеза McC. C-Концевой домен белка является гомологом клеточного белка RimL – ацетилтрансферазы, которая ацетилирует рибосомный белок L12. Нами показано, что MccE является ацетилтрансферазой, которая присоединяет ацетильную группу на аминогруппу аспартата в составе процессированной формы антибиотика, и такая модифицированная форма процессированного McC не ингибирует аспартил-тРНК-синтетазу. Масс-спектрометрического анализом показано, что в отличие от RimL MccE не способен модифицировать N-концевой аминокислотный остаток рибосомного белка L7.

ПОЛИПЕПТИДНЫЙ АНАЛОГ БЛОКАТОРОВ ИОННЫХ КАНАЛОВ ИЗ ЯДА МОРСКОЙ АНЕМОНЫ *HETERACTIS CRISPA*

Осмаков Д.И.[1], Козлов С.А.[1], Кошелев С.Г.[1], Козловская Э.П.[2], Гришин Е.В.[1]

[1]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
[2]Учреждение РАН Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток

E-mail: odi.87@mail.ru

Яды морских анемон содержат разнообразные биологически активные компоненты, большинство из которых имеют пептидную природу. Среди последних выделяют группу полипептидов, модулирующих работу ионных каналов.

Из яда морской анемоны *Heteractis crispa* методами гидрофобной и ионообменной хроматографии была получена фракция, ингибирующая работу протончувствительного ионного канала 3 типа (ASIC3). Данный тип канала в основном представлен в сенсорных нейронах, где он отвечает за восприятие и проведение болевого сигнала, возникающего при ацидозе в тканях, например, при воспалительном процессе. Индивидуальный компонент из активной фракции, названный ASTX-1, был выделен с помощью обращенно-фазовой жидкостной хроматографии. Анализ действия активных фракций проводился на основе детектирования изменения проводимости экспрессированных в ооцитах *Xenopus laevis* каналов в электрофизиологических тестах. Первичная структура полученного полипептида была установлена N-концевым секвенированием по Эдману, а также C-концевым секвенированием с использованием карбоксипептидазы Y и методов масс-спектрометрического анализа. ASTX-1 имеет молекулярную массу 4537 Да и содержит в своем составе 41 аминокислотный остаток, среди которых 6 остатков цистеина, образующих между собой 3 дисульфидные связи. Ближайшими гомологами ASTX-1, найденными при помощи программы BLAST, являются пептиды из анемоны *Anthopleura elegantissima* APETx1 (степень гомологии 55%) (блокатор K^+-канала) и APETx2 (степень гомологии 53%) (единственный на сегодняшний день известный селективный блокатор ASIC3 пептидной природы). Для наработки рекомбинантного аналога полипептида в клетках *E. coli* в оптимальных для дальнейших исследований количествах предполагается получить генно-инженерную конструкцию.

Данные о действии и пространственной структуре модуляторов работы рецепторов имеют не только фундаментальное значение в области изучения физиологии рецепторов, токсикологии и в разработке новых тест систем, но также являются ценным материалом для создания эффективных лекарственных препаратов направленного действия.

НОВЫЙ ИНГИБИТОР ХИМОТРИПСИНА ИЗ КЛУБНЕЙ КАТРОФЕЛЯ. ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА ПРИРОДНОГО И РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКОВ

Парфенов И.А., Валуева Т.А.

Учреждение РАН Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,
119071 Москва, Ленинский просп., 33, стр.2

E-mail: valueva@inbi.ras.ru

Белки ингибиторы протеиназ подсемейства PKPI (Kunitz-type proteinase inhibitors) включают группу белков с мол. массами от 20 до 24 кДа, встречающуюся в клубнях картофеля. Среди них присутствуют ингибиторы сериновых, цистеиновых и аспартатных протеиназ. Показано, что белки PKPI принимают участие в защитной системе картофеля при поражении фитопатогенами, а также могут контролировать *in vivo* активности эндогенных ферментов при его прорастании. К сожалению, взаимосвязь структуры ингибиторов и выполняемых ими функций до сих пор остается мало изученной, что не дает возможности полностью понять как механизмы их действия, так и степень их участия в патогенезе.

Из клубней картофеля (*Solanum tuberosum* L., сорт Юбилей Жукова) выделен новый высокоочищенный белок, обозначенный как PKCI-23 (potato Kunitz-type chymotrypsin inhibitor). Определена N-концевая аминокислотная последовательность первых 20 остатков молекулы этого белка. Белок PKCI-23 с одинаковой степенью эффективности подавлял активность химотрипсина и трипсина и был способен образовывать с ними тройные комплексы, содержащие одновременно оба фермента. Образование таких комплексов связано с наличием в молекуле ингибитора второго реактивного центра, в составе которого локализован остаток Met154. Сделано предположение о том, что этот центр ответствен за связывание химотрипсина. Исследована зависимость стабильности ингибитора от pH и температуры. Показано, что белок PKCI-23 в различной степени угнетает рост и развитие патогенных микроорганизмов *Fusarium culmorum* и *Phytophtora infestans* (Mont.) de Bary, поражающих картофель. Из генома этого сорта картофеля был амплифицирован фрагмент гена, кодирующий данный белок, и проведен его сравнительный анализ с последовательностями PKPI из других сортов картофеля, который показал высокую степень гомологии (от 89 до 99% идентичных остатков) между ними.

Получен продукт гетерологичной экспрессии в *E. coli* BL-21(DE3) с мол. массой около 23 кДа, который не обнаруживался в колониях, не несущих вставки. Исследовано действие рекомбинантного белка на протеиназы и фитопатогены.

ВЫДЕЛЕНИЕ ПЕПТИДОВ ИЗ СЕМЯН И ЛИСТЬЕВ ЭФЕМЕРНОГО РАСТЕНИЯ – ЗВЕЗДЧАТКИ СРЕДНЕЙ (*STELLARIA MEDIA* L.)

Рогожин Е.А.[1], Слезина М.П.[2], Егоров Ц.А.[1], Гришин Е.В.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*
[2]*Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.12*

E-mail: rea21@list.ru

Проблемы исследования защитных пептидов растений, прежде всего, связаны с их малым содержанием в растениях. Подобные пептиды, как правило, образуют семейства гомологичных компонентов, выделение которых на фоне большого числа различных органических соединений (полифенолов, фенольных гликозидов, сапонинов, ненасыщенных лактонов, диенов и т.д.) весьма затруднительно. Для прямой идентификации таких пептидов использование одних только методов протеомики часто не эффективно. Наиболее богатыми источниками защитных пептидов являются дикорастущие цветковые растения, которые обладают повышенной устойчивостью к стрессовым факторам внешней среды.

Для выделения пептидов из семян и листьев звездчатки была разработана методика, состоящая из двух стадий. Первая стадия заключалась в экстракции измельченного биологического материала в присутствии ингибиторов протеиназ 10%-ной уксусной кислотой с последующим осветлением суспензии и высаживанием пептидов охлажденным ацетоном. Высушенные осадки перерастворяли в 0,1%-ой трифторуксусной кислоте, полученные растворы обессоливали и концентрировали путем сорбции на носителе с обращенной фазой. На этой стадии достигается обогащение и частичное очищение пептидной фракции. На второй стадии проводили хроматографическое разделение обессоленных белково-пептидных экстрактов семян и листьев звездчатки методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Сравнение хроматографических профилей выявило наличие в экстрактах семян и листьев звездчатки одного идентичного компонента с молекулярной массой 3362 Да, содержание которого в листьях было примерно в 30 раз больше, чем в семенах (в пересчете на сырую массу биологического материала). Все остальные фракции, для которых были определены молекулярные массы, являются константными, то есть они присутствуют только в определенном экстракте.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 08-04-00783-а и Министерства образования и науки РФ (государственный контракт № 16.740.11.0424).

НОВЫЕ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ БАРАНА

Седов С.А.[1], Белогурова Н.Г.[1], Шиповсков С.В.[2], Семёнова М.В.[3], Гитинов М.М.[4], Левашов А.В.[1], Левашов П.А.[1,4]

[1]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1, стр.3
[2]Междисциплинарный центр нанотехнологии (iNANO), Университет города Орхуса, Дания, DK-8000 Aarhus C.
[3]Учреждение РАН Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 117091 Москва, Ленинский просп., 33
[4]ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздравсоцразвития РФ, 121552 Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а

E-mail: sergey.sedov@gmail.com

Бактериолитические ферменты широко распространены в природе и вырабатываются различными организмами, от бактериофагов до высших животных и растений. Изучение данных объектов весьма важно с точки зрения понимания взаимодействия различных организмов, в частности, ряда аспектов функционирования иммунной системы высших животных. Бактериолитические ферменты представляют огромный интерес также в плане медицинского и биотехнологического применения.

В данной работе было проведено исследование различных фракций плазмы крови барана на предмет выявления белковых фракций с литической активностью по отношению к клеткам *Bacillus subtilis, Escherichia coli, Micrococcus lysodeikticus*. Фракционирование осуществлялось гельпроникающей хроматографией, более глубокая очистка проводилась с использованием анионообменной хроматографии. Были обнаружены три ранее не описанные в литературе фермента. Два фермента оказались активными по отношению к *E. coli* и *M. lysodeikticus* и имели молекулярные массы 34±5 и 14±3 кДа, соответственно. Третий фермент, активный по отношению к *E. coli* и неактивный по отношению к *M. lysodeikticus* имел молекулярную массу 14±2 кДа. В ходе работы были получены данные о каталитических свойствах данных ферментов, в частности, зависимости активности от pH и субстратной специфичности.

Обнаруженные ферменты были подвергнуты трипсинолизу и исследованы с помощью масс-спектроскопии MALDI-TOF. Было проведено сопоставление с известными в настоящее время белками барана, представленными в белковых базах данных Swiss-Prot, NCBI, MSDB.

ЦИТОХРОМЫ P450 СЕМЕЙСТВА CYP74 КУКУРУЗЫ

Топоркова Я.Ю., Горина С.С., Мухтарова Л.Ш., Гоголев Ю.В., Гречкин А.Н.

Учреждение РАН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111 Казань, ул. Лобачевского, 2/31

E-mail: yanchens@yandex.ru

В онтогенезе растений и формировании у них ответа на стрессовые факторы важная роль принадлежит ферментам липоксигеназной сигнальной системы. Ключевыми ферментами данной системы являются липоксигеназы и цитохромы P450 семейства CYP74, а именно – алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ) и дивинилэфирсинтазы (ДЭС). Нами был выбран модельный объект – кукуруза (Zea mays) – для получения полной характеристики семейства CYP74 внутри одного вида. Мы обнаружили восемь генов CYP74 и два гена, ранее отнесенных к семейству CYP84. Однако, транслированные аминокислотные последовательности двух последних генов очень схожи с таковыми семейства CYP74 и четко отличаются от последовательностей генов классических монооксигеназ P450, что позволило нам предположить ошибочность классификации их как CYP84. На основании последовательностей были даны следующие обозначения: две изоформы ZmAOS1, три изоформы ZmAOS2, ZmHPL1, ZmHPL2 и две изоформы «ZmCYP84». ZmAOS1 является классической 13-специфической АОС, чьими субстратом и продуктом являются 13-гидроперекись альфа-линоленовой кислоты и окись аллена, соответственно. ZmHPL1 является ГПЛ, проявляющей предпочтение к 13-гидроперекиси альфа-линоленовой кислоты. Набор продуктов реакции данного фермента является необычным и зависит от субстрата. Два гена ZmAOS2 расположены последовательно на первой хромосоме и отличаются по нескольким сайтам, таким образом, подтверждая гипотезу происхождения всего разнообразия семейства CYP74 от единственного предка в результате дупликации генов и случайного точечного мутагенеза. Ранее нами был воспроизведен процесс появления точечных мутаций с помощью сайт-направленного мутагенеза ферментов LeAOS3, MtHPL и LuDES. Единичные замены в последовательностях консервативных доменов приводили к превращению АОС и ДЭС в ГПЛ, но не наоборот, таким образом подтверждая эволюционное происхождение существующего разнообразия ферментов CY74 от единственного предка, проявляющего гидропероксидлиазную активность.

Работа поддержана грантами РФФИ №№ 09-04-00915-а и 09-04-12222-офи_м, ГК № 16.740.11.0197, грантом по программе фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и грантом по программе «Ведущие научные школы» НШ-6992.2010.4.

МОДУЛЬНЫЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКИ НОВЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM KIHARAE*

Уткина Л.Л.[1], Андреев Я.А.[2], Пухальский В.А.[1], Егоров Ц.А.[2], Одинцова Т.И.[1]

[1]Учреждение РАН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991 Москва, ул. Губкина, 3
[2]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: lyuba_utk@mail.ru

Антимикробные пептиды (АМП) – важные компоненты защитной системы растений. Исследование АМП необходимо для создания форм растений, устойчивых к грибным и бактериальным болезням. Также перспективно использование АМП в медицине в качестве альтернативы или дополнения к традиционным антибиотикам.

Ранее в нашей лаборатории из семян пшеницы *Triticum kiharae* были выделены два новых гомологичных пептида X1 и X2, обладающих высокой антигрибной активностью в отношении ряда патогенов.

Установлено, что пептиды X1 и X2 синтезируются в растениях в составе длинных предшественников, кодирующих несколько гомологичных пептидов. Было обнаружено два класса предшественников: кодирующие пять и семь пептидов, соответственно. При этом внутри каждого класса выявлено несколько форм. Каждый предшественник состоит из сигнального пептида и пяти или семи гомологичных АМП, разделенных сайтами специфического протеолиза, и С-концевого продомена. Кроме пептидов X1 и X2, в полученных последовательностях был найден ряд других пептидов, обнаруженных нами ранее в экстракте семян пшеницы при помощи масс-спектрометрии и N-концевого секвенирования по Эдману. Наши исследования позволили установить полную структуру этих пептидов.

Биологическое значение синтеза протяженных предшественников, состоящих из нескольких гомологичных антимикробных пептидов, возможно, заключается в том, что при индукции синтеза одного предшественника одновременно образуется несколько пептидов, по всей видимости, различающихся по спектру антимикробного действия, что повышает эффективность защитной системы растения. Исследование свойств пептидов-гомологов X1 и X2, входящих в состав предшественника, позволит выбрать наиболее активные в отношении фитопатогенов и, как следствие, наиболее перспективные для использования в защите растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогический кадры инновационной России», ГК № 16.740.11.424 и грантами РФФИ №№ 09-04-00250 и 11-04-00190.

Секция 2

Химия белков и пептидов. Методы синтеза, химическая модификация

ИЗУЧЕНИЕ МАСС-СПЕКТРОВ МЕТАСТАБИЛЬНОГО РАСПАДА ПЕПТИДОВ НИЗИНА И ЦЕКРОПИНА

Пыцкий И.С.[1], Федоткина О.С.[2], Буряк А.К.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, 119991 Москва, Ленинский просп., 31, корп.4*
[2]*Химический факультет Самарского государственного университета, 443011 Самара, ул. Ак. Павлова, 1*

Пептидные антибиотики это класс веществ, часть из которых находят широкое применение в медицинской, ветеринарной практике, а другая часть обладает потенциальными возможностями такого применения в различных областях человеческой деятельности (биотехнологии, сельском хозяйстве, пищевом производстве). Объектами нашего исследования служили антибактериальные пептиды: низин, используемый как консервант и в ветеринарии, а также синтетический аналог цекропина B, структурно идентичный (гомологичный) цекропинам A, B, C, D.

Низин в первичной структуре имеет две дисульфидные связи, а аналог цекропина B аминокислоту норлейцин. Данные структурные особенности позволяют предполагать различный механизм биологического действия и масс-спектрометрического поведения в режиме регистрации метастабильных ионов FAST после ионизации методом МАЛДИ. Фрагментация низина (3354 Да) затруднена из-за присутствия дисульфидных связей. В масс-спектре преимущественно наблюдаются ионы серии b, наиболее интенсивны ионы b2, b3, b22, b26, b27, b29, b30, b31, b32. Среди ионов серии y можно выделить ионы y10, y27. Интенсивная b серия обусловлена наличием концевого лизина, который является преимущественным местом локализации протона, что значительно повышает эффективность протонирования и распад пептидных связей на C-конце пептида. С использованием режима FAST установлены основные направления метастабильного распада синтетического аналога цекропина B (3728 Да). Серии ионов y и b представлены не полностью, что, по-видимому, связано с длиной пептида. Особенно интенсивен ион y26, образовавшийся после разрыва пептидной связи между C-концом глутаминовой кислоты и N-концом лизина. В масс-спектре выделяются два комплиментарных иона b12 и y22, возникшие после разрыва пептидной связи между C-концом аргинина и N-концом аспарагина.

Получение подобных масс-спектров может дать ценную информацию для изучения фрагментации и создания физико-химических основ для их анализа.

СИНТЕЗ, ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДОВ, ПРОИЗВОДНЫХ СЕРОТОНИНОВОГО РЕЦЕПТОРА 6-го ТИПА

Шпакова Е.А.[1], Тарасенко И.И.[1], Шпаков А.О.[2], Власов Г.П.[1]

[1]Учреждение РАН Институт высокомолекулярных соединений РАН, 199004 С.-Петербург, Большой пр., 31
[2] Учреждение РАН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223 С.-Петербург, пр. Тореза, 44

E-mail: eshpakova@mail.ru

Одной из актуальных проблем современной эндокринологии является поиск и разработка селективных регуляторов гормональных сигнальных систем. Наиболее перспективным подходом для их создания является синтез пептидов, соответствующих функционально важным участкам сигнальных белков, в том числе сопряженных с G-белками рецепторов серпантинного типа. С целью создания селективных регуляторов серотониновых рецепторов 6-го типа (CP_6), играющих важную роль в функционировании ЦНС, с помощью твердофазного метода были синтезированы три пептида (CP_6-пептида), соответствующие по первичной структуре С-концевому участку третьей цитоплазматической петли CP_6: KHSRKALKASL$^{258\text{-}268}$KA-амид, его пальмитоилированный аналог KHSRKALKASL$^{258\text{-}268}$K(Palm)A-амид и димер (KHSRKALKASL$^{258\text{-}268}$KG)$_2$KA, в котором два пептидных фрагмента соединены при помощи амидных связей между С-концевыми остатками глицина и α- и ε-аминогруппами остатка лизина. Конденсацию аминокислотных остатков проводили карбодиимидным методом, деблокирование и удаление пептидов с полимера осуществляли с помощью трифторметансульфокислоты в трифторуксусной кислоте в присутствии тиоанизола и этандитиола. Исследование вторичной структуры пептидов с помощью КД-спектроскопии показало, что как в водной среде при различных значениях pH (2, 7 и 10), так и в присутствии 10–80% спиралеобразующего растворителя трифторэтанола (ТФЭ) пептиды находятся преимущественно в β-складчатой конформации. Только для пептида, модифицированного пальмитатом, в щелочной среде и в присутствии 40–80% ТФЭ наблюдалось образование α-спиральной структуры. Все CP_6-пептиды стимулировали активность фермента аденилатциклазы и Gs-белков, сопряженных с CP_6, и прерывали передачу гормонального сигнала через CP_6, не влияя на другие типы рецепторов. Наиболее активным был пальмитоилированный пептид. Полученные данные указывают на то, что пептиды, производные CP_6, и их модифицированные производные могут быть использованы для создания нового поколения селективных внутриклеточных антагонистов CP.

Работа поддержана РФФИ (проект № 09-04-00746).

Секция 3

Биотехнология (конструирование и получение рекомбинантных белков и пептидов)

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ АНТИТЕЛ ЧЕЛОВЕКА ПРОТИВ ГАММА-ИНТЕРФЕРОНА

Вихрова М.А.

Учреждение РАН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

E-mail: vikhrova_m@mail.ru

Интерферон-γ (ИФН-γ) принадлежит к семейству плейотропных цитокинов и обладает иммуномодулирующими и антипролиферативными свойствами. Этот цитокин в норме секретируется Т-лимфоцитами и фибробластами; индукторами его синтеза являются вирусы, двуцепочечная РНК, митогены, липополисахариды и прочие антигены. Рецепторы к ИФН-γ существуют практически на всех клетках, исключение составляют эритроциты. Одним из основных биологических эффектов ИФН-γ является усиление экспрессии MHC-I и MHC-II на поверхности клеток, что позволяет этим клеткам эффективнее презентировать антигены. С другой стороны, повышение концентрации ИФН-γ сопровождает развитие рассеянного склероза. Цель данной работы – получение и характеризация панели человеческих мини-антител к ИФН-γ.

В работе использовали «неиммунную» и «аутоиммунную» комбинаторные библиотеки scFv-антител человека, сконструированные на основе мРНК периферических лимфоцитов здоровых людей и больных рассеянным склерозом. Биопэннинг этих библиотек проводили независимо с использованием ИФН-γ человека. Из обеих библиотек отобрали scFv-антитела, специфически связывающие ИФН-γ. Были определены нуклеотидные последовательности, кодирующие отобранные антитела, проанализированы соответствующие им аминокислотные последовательности. Показано, что VH-домены антител к ИФН-γ, отобранных из «неиммунной» библиотеки принадлежали к VH3 семейству, в то время как из «аутоиммунной» библиотеки отбирались разнообразные антитела, принадлежащие к VH1, VH3, VH4, VH5 и VH6 семействам.

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДИВИНИЛЭФИРСИНТАЗЫ NTDES ТАБАКА (*NICOTIANA TOBACUM*)

Ермилова В.С., Осипова Е.В., Ланцова Н.В., Гоголев Ю.В., Гречкин А.Н.

Учреждение РАН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420011 Казань, ул. Лобачевского, 2/31

E-mail: ntdes@mail.ru

Важную роль в процессе защитного ответа растений играют окисленные производные жирных кислот – оксилипины. Эти соединения образуются в ходе липоксигеназного каскада, начинающегося с превращения линолевой или α-линоленовой кислот в гидроперекиси при участии липоксигеназы. Образовавшиеся гидроперекиси метаболизируются рядом ферментов, в том числе ферментами семейства CYP74 цитохромов P450: дивинилэфирсинтазой (ДЭС), алленоксидсинтазой (АОС) и гидропероксидлиазой (ГПЛ). Этим ферментам свойственна высокая степень гомологии аминокислотных последовательностей, не смотря на различающиеся механизмы катализируемых реакций: ДЭС и АОС обладают дегидразной активностью, ГПЛ – изомеразной. Предполагается, что в активном центре этих ферментов имеется ряд аминокислотных остатков, играющих важную роль в механизмах катализа. На основе анализа множественного выравнивания аминокислотных последовательностей этих ферментов мы выявили каталитически важные аминокислотные остатки, по-видимому, играющие важную роль в механизме каталитической реакции при участии ДЭС табака – объекта нашего исследования. Эти аминокислотные остатки были подвергнуты сайт-направленному мутагенезу. В рамках дальнейшей работы мы планируем провести анализ полученных ферментов мутантного типа.

Последовательность гена ДЭС табака была получена нами в не экспрессирующем векторе pBSK. Для получения реомбинантного фермента последовательность гена была субклонирована в экспрессирующий вектор pET-32 Ek/LIC. Нами была оптимизирована система экспрессии ферментов мутантного и дикого типов в прокариотической системе, а также выделение и очистка белка.

Сотрудниками нашей лаборатории было показано участие неклассического субстрата для липоксигеназной реакции – (7Z,10Z,13Z)-гексадекатриеновой кислоты в липоксигеназной реакции с образованием (7S)-гидроперекиси. Впервые нами показано, что продуктом превращения (7S)-гидроперекиси гексадекатриеновой кислоты при участии рекомбинантной ДЭС табака *in vitro* был дивиниловый эфир – динор-колненовая кислота, что предполагает участие этого соединения в гексадеканоидном липоксигеназном каскаде.

ПОЛУЧЕНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *DEINOCOCCUS RADIODURANS*

Есюнина Д.М.[1,2], Кульбачинский А.В.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2*
[2]*Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.12*

E-mail: es_dar@inbox.ru

РНК-полимераза (РНКП) – центральный фермент транскрипции у всех живых организмов, осуществляющий синтез РНК на ДНК-матрице. Основные данные о механизмах транскрипции у бактерий получены при исследовании РНКП *Escherichia coli*. В то же время, данные о пространственной структуре имеются только для РНКП термофильной бактерии *Thermus aquaticus*, которая неродственна *E. coli* и плохо изучена биохимическими методами. Однако, у *T. aquaticus* имеется близкий родственник среди мезофильных бактерий – *Deinococcus radiodurans*, чья РНКП может являться удобной моделью для структурно-функциональных исследований механизмов транскрипции. В данной работе был разработан эффективный метод получения рекомбинантной РНКП *D. radiodurans*. Для этого гены всех субъединиц кор-фермента РНКП (α, β, β', ω) были клонированы в одной экспрессионной плазмиде на основе вектора pET28. Выделение РНКП *D. radiodurans* из экспрессионного штамма *E. coli* BL21(DE3) проводили в несколько стадий с использованием методов аффинной хроматографии, что позволило получить высокоочищенный препарат белка без примесей клеточной РНКП *E. coli*. Показано, что полученная РНКП *D. radiodurans* полностью транскрипционно-активна и по своим свойствам идентична РНКП, выделенной непосредственно из клеток *D. radiodurans*. Полученный белок может использоваться для изучения детальных механизмов транскрипции РНКП *D. radiodurans*, а разработанная методика также будет удобна для получения мутантных вариантов этой РНКП, с их последующим биохимическим и структурным исследованием.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Президента РФ (МД-618.2011.4) и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (госконтракт № 02.740.11.5132).

ЭКСПРЕССИЯ FAB-ФРАГМЕНТОВ АНТИТЕЛ, СВЯЗАННЫХ С МЕМБРАНОЙ, В ДРОЖЖАХ *P.PASTORIS*

Захаров А.В.[1], Смирнов И.В.[1], Бобик Т.В.[1], Пономаренко Н.А.[1], Габибов А.Г.[1,2,3]

[1]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва*
[2]*Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва*
[3]*Учреждение РАН Институт биологии гена РАН, 119334 Москва*

E-mail: a.zackharov@mail.ru

На сегодняшний день проблема терапии аутоиммунных заболеваний стоит особенно остро, вследствие их большого социально-экономического значения. Антицитокиновая терапия – один из современных подходов лечения аутоиммунных заболеваний основанный на направленном выключении воспаления посредством адресного воздействия на выбранный медиатор. ФНО (Фактор Некроза Опухолей) играет важную роль в протекании таких аутоиммунных заболеваний как ревматоидный артрит, болезнь Крона, анкилозирующий спондилоартрит. Нейтрализация его действия в большинстве случаев приводит к ремиссии заболеваний.

Направленная эволюция белков – один из способов получения новых и улучшения уже имеющихся свойств молекул. Наиболее интересно сочетание этого способа с дисплеем макромолекул, в том числе и Fab-фрагментов антител, на поверхности дрожжевых клеток. Представляет интерес применение таких методов к терапевтическим антителам, так как такой подход может значительно улучшить характеристики препарата. Такой эффект может быть достигнут как получением каталитических антител, так и изменением аффинности молекулы.

Целью настоящего исследования является создание системы дрожжевого дисплея для получения каталитических и/или высокоаффинных Fab-фрагментов антител человека к ФНО. Для этого были созданы генетически конструкции, кодирующие легкую цепь антитела к ФНО; вариабельный, первый константный домен, участок шарнирной области тяжелой цепи этого же антитела вместе с последовательностью С-концевой области дрожжевого мембранного белка AGα1. В результате котрансформации и селекции были получены клоны экспрессирующие на своей поверхности Fab-фрагмент. Было показано, что экспонированный на поверхности Fab-фрагмент обладает специфичностью и связывающей способностью сходной с нативным анти-ФНО антителом. Таким образом, результаты данного исследования позволят использовать эффективное сочетание методов клеточного дисплея и направленной эволюции белков для получения терапевтических агентов, обладающих улучшенными характеристиками.

ПОЛУЧЕНИЕ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНОЙ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНОЙ АРХЕИ *THERMOCOCCUS SIBIRICUS*

Зейфман Ю.С.[1], Эльцина А.А.[2], Черкашин Е.А.[1]

[1]*Научно-исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, пл. Ак. Курчатова, 1*
[2]*Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Московская обл.*

E-mail: yulia.zeifman@gmail.com

Алкогольдегидрогеназы (АДГ, КФ 1.1.1.1) катализируют реакции обратимого окисления спиртов в соответствующие альдегиды и кетоны с участием разнообразных кофакторов (NAD(P), FAD и другие). Наибольший интерес для использования в промышленных процессах представляют NAD(P)-зависимые АДГ благодаря их широкой субстратной специфичности (первичные и вторичные спирты, диолы и др.) и энантиоселективности. Однако АДГ, выделенные из мезофильных организмов, являются недостаточно стабильными при высоких температурах, в органических растворителях, и часто теряют свою активность при иммобилизации.

Одним из способов получения высокостабильных биокатализаторов является выделение ферментов из экстремофильных организмов, например, из археи. *Thermococcus Sibiricus* – это термофильный микроорганизм, найденный в нефтяных резервуарах, способный расти на сложных органических субстратах и в широком диапазоне температур 40–88°C и pH 5,8–7,3. Геном этого организма был полностью отсеквенирован и аннотирован в центре «Биоинженерии» РАН. Проведенный нами анализ генома показал, что в нем содержится несколько различных генов АДГ, в том числе три гена короткоцепочечных АДГ. Ген TSIB_1998 (http://www.uniprot.org) кодирует белок, состоящий из 242 аминокислот с расчетной массой 25,9 кДа. Нами было проведено клонирование гена TSIB_1998 (http://www.uniprot.org), подобраны условия экспрессии в *Escherichia coli*, позволившие получить высокий выход целевого белка в растворимой форме.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 16.512.11.2175)

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО ХИТОЗАНА С БЕЛКОМ Aspf2

Зубарева А.А.[1], Свирщевская Е.В[2]., Парыгина Н.А.[2], Варламов В.П.[1]

[1]*Учреждение РАН Центр «Биоинженерия» РАН, 117312 Москва, просп. 60-летия Октября, 7, к.1*
[2]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Разработка наноразмерных систем доставки белков и пептидов носит лавинообразный характер во всем мире, что связано с большим количеством преимуществ наносистем, таких, как направленная терапия; возможность создания мультифункциональных структур; укрупнения комплексов, дающих адъювантный эффект. Хитозан является одним из перспективных полимеров для создания таких систем, поскольку нетоксичен, биосовместим и биодеградируем. Целью нашей работы являлось получение стабильных наночастиц на основе хитозана и изучение их взаимодействия с белком Aspf2 из гриба *Aspergillus fumigatus*.

В ходе работы нами был оптимизирован метод получения наночастиц на основе гексаноильного производного хитозана. Установлено, что введение гидрофобных ацильных группировок в молекулу хитозана позволяет увеличить стабильность получаемых наноструктур. Размер таких частиц измеряли методом атомно-силовой микроскопии, а так же методом динамического светорассеивания. Он составил около 180–200 нм, однако в суспензии имелись агрегировавшие частицы, которые мы отделяли фильтрованием через фильтр с размером пор 0,22 мкм с целью получения суспензии частиц, однородных по размеру.

Следующим этапом было получение комплексов частиц с белком Aspf2. Мы обнаружили, что наночастицы хитозана эффективно сорбируют белок. Процент сорбции равен 60–90% в зависимости от условий формирования комплекса. Количество белка, связанного с носителем, определяли методом электрофореза в 10% ПААГ. Интенсивность пятен на электрофореграммах анализировали с помощью программы ImageJ. Полученные данные коррелируют с данными, полученными по методу Брэдфорд.

Устойчивость и проникновение полученных комплексов в клетке детектировали на клеточных линиях HEK и HaCaT. Установили, что комплекс наночастиц с белком локализуется на клеточной мембране, а затем проникает во внутриклеточное пространство.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг., Государственный контракт № 14.740.11.0548-0724.

ПОЛУЧЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО [LEU1, THR2]-63-ДЕСУЛЬФАТОГИРУДИНА-1 ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ

Костромина М.А., Есипов Р.С.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: esipov@mx.ibch.ru

Уровень элиминации является важной характеристикой предклинического и клинического испытания пептидного или белкового фармацевтического препарата наряду с иммуногенностью и антигенностью. Одним из подходов увеличения периода полувыведения ($T_{1/2}$) является создание химически модифицированных аналогов белковых препаратов. В данной работе была разработана методика пэгилирования и сиалирования [Leu1, Thr2]-63-десульфатогирудина-1 (HIR), рекомбинантного аналога природного антикоагулянта гирудина-1 из *Hirudo medicinalis*.

Ранее была разработана препаративная схема выделения [Leu1, Thr2]-63-десульфатогирудина-1 из клеточной культуры штамма-продуцента *E.coli* ER2566/pER-HIR. В ходе настоящей работы были получены конъюгаты HIR с альдегидами полиэтиленгликоля (5 кДа) и полисиаловой кислоты (14 кДа). Реакции модификации проводили при pH 6.0 при 4х-кратном мольном избытке модифицирующего реагента в присутствии восстанавливающего реагента (цианборгидрид натрия). Сиалирование HIR протекало при 37°C в течение 20 часов на 79%, в то время как пэгилирование происходило практически полностью на 94% за 20 часов при 10°C. Очистку конъюгатов от побочных продуктов проводили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ и гель-фильтрационной хроматографии. На каждой стадии выделения собираемые фракции анализировались с помощью электрофореза в денатурирующих условиях. Конечный выход моносиалированного производного HIR-PSA составил 53% (по HIR). Пэгилирование происходило с образованием двузамещенного производного HIR-PEG2 с выходом 74%.

По сравнению с [Leu1, Thr2]-63-десульфатогирудином-1 антитромботическая активность полученных модифицированных производных, определенная в амидолитическом тесте *in vitro*, была снижена: для HIR активность составила 750 ATU на мг белка, для HIR-PEG_2 – 560 ATU на мг белка, HIR-PSA – 60,9 ATU на мг белка. В дальнейшем планируются фармакокинетические исследования *in vivo* полученных пэгилированного и сиалированного [Leu1, Thr2]-63-десульфатогирудина-1.

ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО МНС КЛАССА II В КЛЕТКАХ НАСЕКОМЫХ И ДРОЖЖАХ

Мамедов А.Э.[1], Воробьева Н.Е.[2], Белогуров А.А.[1], Пономаренко Н.А.[1], Габибов А.Г.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*
[2]*Учреждение РАН Институт биологии гена РАН, 119334 Москва, ул. Вавилова, 34/5*

Комплекс гистосовместимости МНС (Major Histocompatibility Complex) второго класса HLA-DRA 0101 является одной из ключевых молекул, участвующих в развитии рассеянного склероза – широко распространенного демиелинизирующего заболевания аутоиммунной природы. Комплекс располагается на мембране антиген презентирующей клетки. Связываясь с антигеном, МНС презентирует его Т-клеточному рецептору, образуя тем самым тримолекулярный комплекс, что, в свою очередь, вызывает иммунный ответ.

Для наших дальнейших исследований было необходимо экспрессировать внеклеточные домены рекомбинантного HLA-DR в разных системах. В нашей лаборатории была налажена экспрессия МНС класса II в клетках *Drosophila melanogaster* линии S2. Экспрессиионая система насекомых является наиболее подходящей для МНС в связи с тем, что экспрессированный в среду комплекс остается несвязанным с соответствующим антигенным пептидом. Вместе с этим, нам было необходимо иметь альтернативную систему экспрессии для создания в будущем библиотек репертуаров комплексов гистосовместимости. Для этого была налажена экспрессия МНС в дрожжевых клетках *Pichia pastoris* штамма GS. В ходе выполнения данной задачи были получены различные варианты конструкций экспрессионного вектора pPICZα, содержащих α и β цепи МНС с полигистидиновым, FLAG или c-myc эпитопами. В результате трасформации были отобраны клоны с наибольшим выходом экспрессии собранного комплекса.

Помимо экспрессии был налажен метод очистки МНС. Комплекс был эффективно изолирован с помощью аффинной хроматографии с использованием смолы с иммобилизированными моноклональными антителами L243, которые специфически связываются только с полностью собраным комплексом HLA-DR. Анализ взаимодействия HLA-DRA 0101, экспрессированного в различных системах, с пептидом основного белка миелина, подтвердил функциональную идентичность комплесков, полученных в дрожжах и клетках насекомых. Полученные данные позволят в будущем эффективно проводить селекцию и дальнейший структурно-фунциональный анализ МНС второго класса в различных гетерологичных системах с полным сохранением его свойств.

ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ КАТАЛИТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К ГЛИКОПРОТЕИНУ GP120 ВИЧ-1, В ДРОЖЖЕВОЙ СИСТЕМЕ

Мокрушина Ю.А.[1], Смирнов И.В.[1,2], Решетняк А.В.[3], Бобик Т.В.[1], Пономаренко Н.А.[1], Габибов А.Г.[1,2,4]

[1]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва
[2]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва
[3]Йельский университет, Йельская школа медицины, кафедра фармакологии, Нью-Хейвен, CT 06520-8066, США
[4]Учреждение РАН Институт биологии гена РАН, 119334 Москва

E-mail: yuliana256@mail.ru

Создание протеиназ, способных узнавать и гидролизовать избранный белковый эпитоп, является одной из фундаментальных проблем современной биохимии и молекулярной биологии. На основании информации, полученной в последние годы, относительно индукции каталитических антител, а также ассоциированности спонтанного образования этих биокатализаторов с аутоиммунными патологиями предполагается, что каталитические антитела (абзимы) являются перспективной моделью для создания эпитопспецифических протеиназ. Существует вероятность, что протеолитическое расщепление специфическим абзимом поверхностного антигена вируса иммунодефицита человека gp120 в организме пациента позволит преодолеть иммунологическую мимикрию вируса, экспонировать его константные эпитопы и обеспечить возможность ликвидации инфекции ВИЧ иммунной системой пациента. Ранее в лаборатории биокатализа методами реакционной иммунизации и индукцией каталитических антител на фоне аутоиммунного заболевания были получены антитела, обладающие гидролизующей активностью к gp120 и его фрагментам.

Целью данной работы создание генетических конструкций для экспрессии описанных выше антител в дрожжевой системе. Были созданы универсальные вектора для клонирования вариабельных фрагментов изучаемых антител и экспрессии их в виде Fab-фрагментов. На основе полученных векторов были созданы генетические конструкции для экспрессии Fab-антител, специфичных к gp120. После проведения трансфекции в клетки дрожжей линии gs115 и селекции рекомбинантных клонов нами был получен штамм-продуценты, эффективно секретирующие рекомбинантные Fab-фрагменты в культуральную среду. Полученные препараты Fab-фрагментов были хроматографически очищены и определена их функциональная активность.

ВЛИЯНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКА Hfq НА ЕГО СТРУКТУРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ

Мурина В.Н.[1,2], Селиванова О.М.[2], Гарбер М.Б.[2], Никонов С.В.[2], Никулин А.Д.[2]

[1]*Пущинский филиал МГУ им. М.В. Ломоносова, Пущино, Московская обл.*
[2]*Учреждение РАН Институт белка РАН, Пущино, Московская обл.*

E-mail: thyrada@rambler.ru

Бактериальные белки Hfq относятся к семейству Sm-подобных белков, объединяются в него по наличию консервативного структурного Sm-фолда. Первичные структуры белков Hfq высококонсервативны, отличаются в основном С-концевыми участками, вариабельными по длине и аминокислотной последовательности. В растворе белки Hfq формируют четвертичную структуру в виде тороидальных гексамеров, которые далее могут олигомеризоваться в сложные фибриллярные структуры.

Нами исследовано влияние изменений в первичной структуре белка Hfq *Pseudomonas aeruginosa* на формирование гексамеров белка и образование фибриллярных структур. Показано, что уменьшение длины неупорядоченной вариабельной С-концевой части белка приводит к потере способности образовывать высокоупорядоченные фибриллы. При внесении замен в области консервативного Sm2-мотива укороченного белка, была получена новая форма белка, способная образовывать фибриллоподобные структуры нового типа.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» ГК № 02.740.11.0295.

РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНАЛОГИ 4Cys ЗАЩИТНЫХ ПЕПТИДОВ РАСТЕНИЙ

Опарин П.Б., Беркут А.А., Василевский А.А., Гришин Е.В., Егоров Ц.А.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: spud-13@mail.ru

В ходе эволюции высшие растения выработали сложную систему защиты от неблагоприятных условий и естественных врагов. Важной составляющей этой системы являются вещества полипептидной природы, такие как ферменты, лектины, антимикробные пептиды. В последние годы из ряда растительных источников нами были выделены соединения, относящиеся к семейству так называемых «четырехцистеиновых» (4Cys) пептидов. Аминокислотные последовательности 4Cys пептидов содержат два мотива CXXXC, где X – любой остаток; в пространстве эти молекулы формируют α-спиральные шпильки. Среди 4Cys пептидов находят ингибиторы сериновых протеаз и антимикробные пептиды.

В настоящее время в нашей лаборатории ведется работа по получению рекомбинантных аналогов 4Cys пептидов и их структурно-функциональному исследованию. Высокой эффективностью характеризуется бактериальная система экспрессии, основанная на получении целевых пептидов в составе химер с белком-помощником тиоредоксином. С использованием этой системы были получены рекомбинантные аналоги ингибитора трипсина BWI-2c (41 остаток) из гречихи обыкновенной *Fagopyrum esculentum*, антимикробных пептидов Tk-AMP-H1 (27 остатков) из пшеницы *Triticum kiharae* и EcAMP1 (37 остатков) из ежовника обыкновенного *Echinochloa crus-galli*. Выход пептидов составил ~5 мг с 1 л культуры *Escherichia coli*, что позволило провести разнообразные исследования их активности. Кроме того, были получены изотопно-меченые пептиды для исследования их пространственной структуры методами спектроскопии ЯМР.

Работа поддержана грантами Минобрнауки РФ (Госконтракт № 16.740.11.0424), РФФИ (№ 11-04-00190).

МУТАНТНЫЕ OmpF ПОРИНЫ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* С ДЕЛЕЦИЯМИ НАРУЖНЫХ ПЕТЕЛЬ: СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ, ЭКСПРЕССИЯ, ВЫДЕЛЕНИЕ, РЕФОЛДИНГ

Сидорова О.В., Чистюлин Д.К., Хоменко В.А., Портнягина О.Ю., Исаева М.П., Новикова О.Д.

Учреждение РАН Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, 690022 Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159

E-mail: olga_ximik@mail.ru

Как известно, изменяя структуру белка с помощью сайт-направленного мутагенеза и наблюдая за изменением его свойств, можно делать выводы о функциональной значимости тех или иных участков белковой молекулы. Ранее нами был клонирован и экспрессирован OmpF порин возбудителя псевдотуберкулёза *Yersinia pseudotuberculosis* [1], а также исследованы его структурно-функциональные и иммунобиологические свойства. Согласно литературным данным наружные петли неспецифических поринов грамотрицательных бактерий входят в состав антигенных детерминант, а также участвуют в стабилизации тримеров белка и модуляции проводимости пориновых каналов.

На первом этапе исследования для получения мутантных конструкций, несущих *ompF* ген с делециями внешних петель (L1, L2, L4-L8), была использована Pfu Turbo ДНК полимераза (Stratagene, США) с применением мутантных праймеров. Наличие делеций в экспрессионной плазмиде контролировалось при помощи секвенирования. Экспрессия целевых белков проводилась в штамме Rosetta *Escherichia coli* (Novagen, США). Выделение из телец включения и рефолдинг мутантных белков с делециями по петлям L1, L6 и L8 проводились по методике, отработанной для выделения рекомбинантного OmpF порина *Y. pseudotuberculosis* [1]: путем исчерпывающего диализа и ионообменной хроматографии. В результате мутантные белки получены в олигомерной форме. С помощью иммуноблоттинга и техники БЛМ показано, что в случае OmpF порина из *Y. pseudotuberculosis* отсутствие вышеуказанных петель в структуре белка существенно не влияет на его антигенную и функциональную активность.

Работа поддержана грантами РФФИ № 08-08-00823-а «Конструирование и исследование неспецифических порообразующих белков грамотрицательных бактерий с измененными структурно-функциональными свойствами» и ДВО РАН «Конструирование и структурно-функциональное исследование мутантных OmpF поринов наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis*».

Литература

1. Хоменко В.А., Портнягина О.Ю., Новикова О.Д., Исаева М.П., Ким Н.Ю., Лихацкая Г.Н. Вострикова О.П., Соловьёва Т.Ф. *Биоорган. химия*. (2008) 34(2), 177–184.

НОВОЕ МУЛЬТИГЕННОЕ СЕМЕЙСТВО АКТИНОПОРИНОВ (Hct-S) АКТИНИИ *HETERACTIS CRISPA*

Ткачева Е.С., Еськов А.А., Лейченко Е.В., Исаева М.П., Монастырная М.М., Козловская Э.П.

Учреждение РАН Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, 690022 Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159

E-mail: estkacheva@gmail.com

Ранее из тропической актинии *Heteractis crispa* (=*Radianthus macrodactylus*) было выделено и охарактеризовано четыре актинопорина, имеющих большую степень гомологии аминокислотных последовательностей и обладающих высокой гемолитической и канцерпревентивной активностями. Методами молекулярной биологии были установлены нуклеотидные последовательности генов *rtx-sii* и *rtx-s3*, кодирующих аминокислотные последовательности актинопоринов *H. crispa*. На основании этих последовательностей были сконструированы праймеры, которые фланкировали последовательность участка гена, кодирующего зрелый актинопорин. В результате ПЦР-амплификации кДНК актинии *H. crispa* с ген-специфичными праймерами были получены фрагменты ДНК, кодирующие зрелые актинопорины. Пятьдесят клонов, содержащих корректную вставку, были проанализированы и на основании полученных нуклеотидных последовательностей генов были выведены аминокислотные последовательности восемнадцати актинопоринов, отнесенных нами к Hct-S семейству. Структурно-функциональный анализ актинопоринов семейства Hct-S показал, что они обладают высокой структурной гомологией (идентичность аминокислотных последовательностей составила от 89 до 100%) и являются, таким образом, представителями мультигенного семейства Hct-полипептидов.

Два представителя семейства (Hct-S5 и Hct-S6) были экспрессированы в *E. coli* Rosetta как гибридные белки, содержащие GST-белок. Рекомбинантные белки (rHct-S5 и rHct-S6) были очищены с помощью металл-аффинной хроматографии на смоле Ni-CAM в нативных условиях. Было показано, что рекомбинантные актинопорины обладают гемолитической активностью, которая на порядок ниже активности нативного актинопорина. В настоящее время проводится исследование цитотоксической и канцерпревентивной активностей рекомбинантных белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов ДВО РАН № 11-III-B-05-009 и РФФИ № 10-08-00316-а.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЭСТЕРАЗ ИЗ ТЕРМОФИЛЬНОЙ АРХЕИ *THERMOCOCCUS SIBIRICUS*

Черкашин Е.А.[1], Тамаркин М.[2]

[1]*Научно исследовательский центр «Курчатовский институт», 123098 Москва, пл. Ак. Курчатова, 1*
[2]*Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва*

E-mail: e.cherkashin@gmail.com

Липазы (эстеразы) – это ферменты, способные гидролизовать триглицериды. Их систематическое название – триацилглицерол-ацил гидролаза (Е.С. 3.1.1.3). Главное различие между липазами и эстеразами заключается в форме субстрата. Липазы в качестве субстрата используют твердые или жидкие нерастворимые жиры, в то же время эстеразы, в качестве субстрата, используют растворимые жиры. Эти ферменты с каждым годом находят все большее и большее промышленное применение: пищевая, парфюмерная, фармацевтическая промышленности, тонкий органический синтез и др. все эти отрасли промышленности используют различные липазы в больших количествах. Особенно стоит отметить то, что липаза является ключевым объектом при ферментативном производстве биодизельного топлива, производство которого с каждым годом растет как, более экологичная и в некоторых случаях более дешевая альтернатива дизельному топливу. Практически все промышленно значимые липазы и эстеразы являются рекомбинантными ферментами грибного или бактериального происхождения, поскольку способны работать в широком диапазоне температур, pH, а также, обладают широкой субстратной специфичностью. Производство этих ферментов для промышленных целей на территории Российской Федерации отсутствует.

Нами были клонированы три гена липаз из термофильной археи *T.sibiricus*, которая, способна расти в широком диапазоне температур 40–88°C и pH 5,8–7,3. Полностью отсеквенированный и аннотированный геном этого организма описан. Анализ этого генома позволил выделить три гена липаз, которые могут представлять потенциальный интерес в качестве биотехнологически значимых ферментов. Анализ аминокислотной последовательности этих ферментов показал, что они обладают высокой степенью гомологии с ферментами которые осуществляют гидролиз растворимых жиров т.е. эстеразами. Далее была оптимизирована система экспрессии этих ферментов в клетках *E.coli* и получены эти рекомбинантные эстеразы.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 16.512.11.2175)

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ В *E.COLI* ФЕРМЕНТОВ ИЗ ТЕРМОФИЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ

Черкашина А.С.[1], Ларина Д.С.[2], Егоров М.В.[3]

[1]Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123098 Москва, пл. Ак. Курчатова, 1
[2]Факультет нано-, био-, информационных и когнитивных технологий (ФНБИК), Московский физико-технический институт (государственный университет), 141700 Долгопрудный, Московская обл., Институтский переулок, 9
[3]Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, 125047 Москва, Миусская пл., 9

E-mail: Anna.S.Cherkashina
vmlipkin@mx.ibch.ru

Термофильные ферменты не только находят широкое в различных биотехнологических областях, но и являются перспективным источником данных о взаимосвязи структуры и термостабильности ферментов. В качестве объектов исследования были выбраны два фермента: α-амилаза (К.Ф. 3.2.1.1) и L-аспартат оксидаза (К.Ф. 1.4.3.16) из термофильных бактерий *Thermococcus sibiricus*. α-амилаза широко используется при производстве биоэтанола из крахмалистого сырья и является довольно хорошо изученным ферментом. Однако детальное изучение строения, структуры и функций фермента и багаж накопленных литературных данных позволит уточнить взаимосвязь структуры и термостабильности фермента. В тоже время L-аспартат оксидаза, катализирующая окисление L-аспартата с образованием оксалоацетата и перекиси водорода является гораздо менее изученным ферментом. Этот фермент представляет интерес как один из ключевых ферментов участвующих в синтезе NAD в клетке.

В данной работе гены обоих ферментов из термофильных бактерий *Thermococcus sibiricus* были клонированы в клетки *E.coli*. Последовательности обоих генов отсеквенированы по обеим цепям. Тестовая экспрессия рекомбинантных ферментов в клетках *E.coli* показала преимущественное образование белков в нерастворимой форме. Была проведена оптимизация системы экспрессии ферментов по следующим параметрам: экспрессионный штамм, тип и концентрация индуктора, температура экспресии и др. После получения белка в растворимой форме система была масштабирована на экспрессию в ферментерах.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 16.512.11.2175)

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА

Ярославцева А.К., Степаненко В.Н., Есипов Р.С.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: esipov@ibch.ru

Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) является одним из основных факторов, определяющих процессы ангиогенеза и неоангиогенеза в организме. Поэтому создание экспериментальных моделей с использованием VEGF представляет большой интерес для исследований в различных областях медицины – от заболеваний органов зрения до антираковой терапии.

VEGF представляет собой гомодимер с молекулярным весом 38 кДа, с двумя межмолекулярными дисульфидными связями.

В данной работе мы предлагаем биотехнологический способ получения рекомбинантного VEGF165. Нами были получены два штамма-продуцента VEGF *E.coli* ER2566/pER-$VEGF_{165}$ и *E.coli* Origami B(DE3)/pTVG-$VEGF_{165}$. При культивировании первого штамма VEGF получался в нерастворимой форме, в виде тел включения, которые солюбилизировали буфером, содержащим 2 М мочевину. Затем проводили очистку экстракта с помощью тангенциальной ультрафильтрации с последующей ренатурацией VEGF в присутствии окислительно-восстановительной пары глутатион окисленный – глутатион восстановленный (1:10). После двух две хроматографии, ионообменной и гель-фильтрационной белок был получен с чистотой 95%

При культивировании второго штамма-продуцента *E.coli* Origami B(DE3)/pTVG $VEGF_{165}$ целевой белок синтезировался в составе гибридного белка (ГБ), содержащего тиоредоксин и сайт для расщепления протеиназой вируса гравировки табака (TEV протеиназой). Уровень биосинтеза гибридной конструкции достигал 40% от общего клеточного белка, при этом более 90% ГБ было получено в димерной форме. ГБ очищали с помощью ионообменной хроматографии и расщепляли TEV протеиназой. Полученный VEGF отделяли от тиоредоксина ультрафильтрацией.

В результате проведенной работы нами был получен рекомбинантный VEGF двумя способами. Биологическая активность обоих образцов VEGF была подтверждена *in vitro* на культуре эндотелиальных клеток мыши SVEC-4-10.

Секция 4

Физико-химические и компьютерные методы исследования. Пространственная структура и динамика. Биоинформатика

ВЫРАЩИВАНИЕ КРИСТАЛЛОВ РЕКОМБИНАНТНОЙ ТИМИДИНФОСФОРИЛАЗЫ *E. COLI* И ЕЕ КОМПЛЕКСА С ИНГИБИТОРОМ МЕТОДОМ ВСТРЕЧНОЙ ДИФФУЗИИ В НАЗЕМНЫХ УСЛОВИЯХ И В УСЛОВИЯХ НЕВЕСОМОСТИ

Абрамчик Ю.А.[1,2], Тимофеев В.И.[1], Муравьёва Т.И.[2], Есипов Р.С.[2], Куранова И.П.[1]

[1]Учреждение РАН Институт кристаллографии имени А.В. Шубникова РАН, 119333 Москва, Ленинский просп., 59
[2]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: ugama@yandex.ru

Тимидинфосфорилаза *Escherichia coli* (ТФ) катализирует катаболическую реакцию фосфоролиза пиримидиновых нуклеозидов в бактериальных клетках. Она представляет собой белок с молекулярной массой 47.3 кДа и функционирует в форме димера. Тимидинфосфорилаза играет важную роль в росте новых кровеносных сосудов, являясь стимулятором ангиогенеза. Её уровень в опухолевых клетках повышен. В настоящее время ведется активный поиск специфических ингибиторов тимидинфосфорилазы и изучается их взаимодействие с ферментом.

Рекомбинантная тимидинфосфорилаза получена в бактериальном штамме *E.coli* BL21(DE3)/pER-Thy1. На первой стадии очистки супернатант подвергался двойному высаливанию сульфатом аммония. Дальнейшая очистка белка проводилась анионообменной хроматографией на сорбенте Q Sepharose HP и гидрофобной хроматографией на сорбенте Phenyl Sepharose HP.

Для последующего рентгеноструктурного исследования методом встречной диффузии в капиллярах в наземных условиях и в условиях невесомости на МКС выращены кристаллы рекомбинантной ТФ и ее комплекса с ингибитором 3'-NH2-2'-F-2',3'-ddT. Кристаллы выращивали в оборудовании японского космического агентства JAXA. Кристаллы росли из растворов ТФ в калий-фосфатном буфере. Концентрация белка составляла 20 мг/мл, в качестве осадителя использовали сульфат аммония в цитратном буфере. Кристаллы достигали размера 0.30 x 0.30 x 0.20 мм.

От кристаллов ТФ, выращенных в условиях невесомости, на синхротроне SPring8 собраны дифракционные наборы до разрешения 1.52 Å (свободная ТФ) и 1.7 Å (комплекс с ингибитором). Все кристаллы принадлежат к пространственной группе $P4_32_12$ и имеют следующие параметры элементарной ячейки: a=b=129.951, c=67.809, α=β=γ=90° (свободный фермент); a=b=129.691, c=67.905, α=β=γ=90° (комплекс с ингибитором).

Работа выполнена при поддержке ЦНИИМаш Роскосмоса.

СРАВНЕНИЕ ПРОЦЕССА ОБРАЗОВАНИЯ АМИЛОИДОВ МУТАНТНОЙ ФОРМОЙ АЛЬБЕБЕТИНА В СВОБОДНОМ ВИДЕ И В СОСТАВЕ ГИБРИДНОГО БЕЛКА ТИОРЕДОКСИН – АЛЬБЕБЕТИН

Балобанов В.А.[1], Егорова А.Г.[1], Ильина Н.Б.[1], Черткова Р.В.[2], Долгих Д.А.[2], Бычкова В.Е.[1]

[1]Учреждение РАН Институт белка РАН,
142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 4
[2]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: uralm62@rambler.ru

В данной работе проведено исследование процесса амилоидообразования искусственным белком альбебетином с аминокислотной заменой H65F. Эксперименты были проведены как с белком в свободном виде, так и составе гибридного белка. Данный гибридный белок состоит из тиоредоксина и альбебетина, присоединённого к его С-концу через линкер. Эта конструкция первоначально была использована для увеличения уровня экспрессии альбебетина, однако, как показали опыты, такой гибридный белок способен образовывать амилоидные агрегаты.

За появлением кросс-β структуры следили по возрастанию интенсивности флуоресценции красителя тиофлавина Т, скорость роста размеров агрегатов оценивалась по рассеянию света, а изменения в структуре тиоредоксина тестировались методом триптофановой флуоресценции. Показано, что альбебетин с заменой H65F в свободном виде образует амилоидные агрегаты при инкубации при 45°C в течение 2-х недель. При этом наблюдается хорошо выраженная лаг-фаза в начальной стадии процесса. В отличие от свободной формы, альбебетин в составе гибридного белка образует амилоидные агрегаты уже при 37°C в течение суток, и лаг-фаза для него не наблюдается. Тиоредоксин в свободном виде, в составе гибридного белка и в составе амилоида сохраняет способность к кооперативному разворачиванию при повышении концентрации мочевины. Это говорит о том, что он сохраняет свою структуру во всех трёх вариантах, и, следовательно, образование амилоидов гибридным белком идёт только за счет альбебетина, входящего в его состав. Таким образом, можно заключить, что искусственный белок альбебетин с заменой H65F проявляет заметную склонность к амилоидной агрегации, а присоединение к нему тиоредоксина значительно влияет на процесс амилоидообразования.

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

ПОСТРОЕНИЕ И АНАЛИЗ СТРУКТУРНОГО ДРЕВА β-БЕЛКОВ, СОДЕРЖАЩИХ 3β-УГОЛКИ

Бошкова Е.А., Гордеев А.Б., Ефимов А.В.

Учреждение РАН Институт белка РАН, 142290, Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 4

E-mail: boshkova.e.a@rambler.ru

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 корневой структуры древа берётся соответствующий структурный мотив.

Первое структурное древо для белков, содержащих 3β-уголки, было построено в 1997 году. За это время количество расшифрованных пространственных структур белков выросло в несколько раз. Обновление структурного древа для данной группы белков позволяет, во-первых, упорядочить новые белки в соответствии с их пространственной структурой, во-вторых, проверить предсказательную силу ранее построенного структурного древа, в-третьих, дает возможность разработать иерархическую классификацию белков, содержащих 3β-уголки.

Целью данной работы было построение и анализ структурного древа белков, содержащих 3β-уголки. Белки и белковые домены, содержащие 3β-уголки, отобраны визуально из банка белковых данных PDB и системы классификации SCOP 1.75. Созданная база данных включает в себя 573 белка (из них 204 негомологичных), что составляет 2570 PDB-файлов. Построено теоретическое структурное древо, содержащее 358 укладок, из которых 65 соответствуют пространственным структурам известных белков.

На основе полученного структурного древа разработана иерархически организованная классификация белков, содержащих 3β-уголки. В настоящее время ведётся работа по размещению компьютерной версии структурного древа на WEB-сайте http://strees.protres.ru/.

Данная работа поддержана грантом РФФИ № 10-04-00727-а и грантом Федерального агентства по науке и инновациям № 02.740.11.0295.

НОВЫЕ СТРУКТУРНЫЕ ДЕРЕВЬЯ (АЛЬФА + БЕТА)-БЕЛКОВ

Гордеев А.Б., Ефимов А.В.

Учреждение РАН Институт белка РАН, 142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 4

E-mail: gordeew@vega.protres.ru

Структурное древо 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. В качестве стартовой структуры древа берётся соответствующий структурный мотив. Количество расшифрованных пространственных структур белков с каждым годом растёт, что предопределяет необходимость построения обновлённых структурных деревьев для уже описанных групп белков, а также поиска новых структурных мотивов и построения новых деревьев на их основе. Новые структурные деревья можно использовать в качестве удобного инструмента для решения ряда научных проблем, в частности, для создания структурной классификации белков, принципиально отличающейся от других классификаций. Ранее нами был построен ряд структурных деревьев, разработана классификация для соответствующих групп белков, а результаты работы представлены в виде WEB-ресурса PCBOST.

В ходе данной работы в классе (α+β)-белков обнаружены белки, содержащие структуры, сходные с abCd-единицей, но отличающиеся от неё наличием одного или нескольких β-тяжей, находящихся внутри укладки. Для таких белков составлена база данных, в которую вошло 485 белков и доменов, из них взаимная гомология не обнаружена в 199 белках. Всего в белках обнаружено семь структур. В случае пяти структур белки образуют от 3 до 39 различных укладок цепи, поэтому для них можно построить пять новых структурных деревьев, для которых в качестве корневых структур используются: $abCdd_1$-структура, a_1abCd-структура, a_2a_1abCd-структура, $a_3a_2a_1abCd$-структура, $a_2a_1abCdd_1$-структура. Построены соответствующие структурные деревья. Для двух наиболее распространенных групп белков на основе построенных деревьев разработана структурная классификация. Классификация – иерархическая и включает в себя 2 Структурных дерева, 19 Уровней, 63 Укладки, 367 Белков и доменов и 1749 PDB-файлов. Классификация оформлена в виде дополнения к разработанному ранее WEB-ресурсу PCBOST и свободно доступна в Интернете по адресу <http://strees.protres.ru>.

Данная работа поддержана грантом РФФИ № 10-04-00727-а и грантом Федерального агентства по науке и инновациям № 02.740.11.0295.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ

Довидченко Н.В., Галзитская О.В.

Учреждение РАН Институт белка РАН, 142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 4

E-mail: bones@phys.protres.ru

Предложена общая кинетическая модель для описания процесса амилоидообразования, включающая в себя нуклеационный механизм полимеризации с последовательным присоединением мономеров к олигомеру и автокаталитический рост амилоидных агрегатов, под которым подразумеваются все типы экспоненциального роста: ветвление, дробление и рост с поверхности. Компьютерные симуляции показали, что модель корректно описывает наблюдаемые экспериментально стадии роста амилоидных фибрилл и что присутствие стадии экспоненциального роста в модели критично для моделирования образования амилоидных фибрилл. Ключевой особенностью предложенной модели является наличие стадии экспоненциального роста агрегата. Такая стадия может описывать сразу несколько сценариев увеличения агрегата в размерах путем ветвления, дробления или роста с поверхности. На основе данных, полученных с помощью модели, сделаны выводы о значимости каждой из стадий в процессе сборки амилоидных фибрилл.

Авторы благодарны А.В. Финкельштейну за обсуждение результатов. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты №№ 08-04-00561, 11-04-00763), при поддержке Российской академии наук (программы «Молекулярная и клеточная биология» (01200959110) и «Фундаментальные науки – медицине»), Фонда содействия отечественной науке и фонда Дмитрия Зимина «Династия», Федерального агентства по науке и инновациям (02.740.11.0295).

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЛЕЙ НА СТАБИЛЬНОСТЬ БЕЛКА К РАЗРУШЕНИЮ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОМ

Дурденко Е.В., Сабурова Е.А.

Учреждение РАН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 3

E-mail: cathrine.durdenko@gmail.com

В последнее время все больше выявляются мультифункциональные свойства практически всех компонентов клетки – белков, липидов, эндогенных полиэлектролитов, низкомолекулярных метаболитов, а также ионов неорганических солей. Биологическая роль ионов неорганических солей – сульфатов, фосфатов, а также моновалентных ионов – хлоридов, аммония и др. не ограничивается только осмотическим действием, но и включает регуляцию многих метаболических процессов. Так, например фосфатный буфер имеет большее значение в таких биологических жидкостях, как кровь, моча и соки пищеварительных желез. Однако в настоящее время не всегда понятно, какой из двух видов – одно- или двузамещенный фосфат – участвует в метаболических процессах. Также мало известно о влиянии ионов фосфата на стабильность белков к различным денатурирующим воздействиям.

Настоящая работа посвящена изучению влияния моно- и дивалентных анионов солей на стабильность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в комплексе с полистиролсульфонатом (ПСС). Для того чтобы выявить особую роль фосфата в стабилизации структуры ЛДГ по сравнению с другими дивалентными анионами, аналогичные эксперименты были проведены также с сульфатом и ионом хлора. Исследования ингибиторного действия ПЭ на активность ЛДГ были выполнены при двух значениях pH буфера 6,2 и 7,0 поскольку ионы фосфата при этих pH существуют в двух ионизованных формах: [HPO_4^{2-}] и [$H_2PO_4^-$].

Изучение динамики образования комплекса ЛДГ с ПСС показало, что наиболее сильный стабилизирующий эффект фосфата проявился при значении pH буфера 7,0, в то время как в присутствии ионов сульфата и хлоридов различий в скоростях тушения флуоресценции не обнаружено. Кроме того, при pH 7,0 дивалентные анионы фосфата гораздо эффективнее снимают ингибирование фермента, вызванное связыванием с ПСС.

Полученные данные интерпретируются с позиции особой роли анион-связывающих центров в межсубъединичных контактах ЛДГ – два на димер, образующих с участием дивалентного фосфата ионный кластер, стабилизирующий четвертичную структуру белка к разрушению полиэлектролитом.

МЕТОДЫ ЯВНОГО УЧЁТА МОЛЕКУЛ ВОДЫ ДЛЯ ПРЕДСКАЗАНИЯ СВЯЗЫВАНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЛИГАНДОВ С БЕЛКАМИ

Зейфман А.А., Новиков Ф.Н., Строганов О.В., Стройлов В.С., Чилов Г.Г.

Учреждение РАН Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 119991 Москва, Ленинский просп., 47

E-mail: ghermes.chilov@gmail.com

В существующих на сегодняшний день алгоритмах молекулярного докинга и виртуального скрининга молекулы воды рассматриваются континуально. Проведённый нами ранее на тест-сете CSAR анализ основных ошибок предсказания энергии в молекулярном докинге показал, что около трети структур с максимальной ошибкой содержат прочно связанные молекулы воды, явный учёт которых позволил бы добиться повышения точности. Для явного учёта влияния подобных молекул воды первого слоя (прочно связанных с белком) был разработан алгоритм молекулярного докинга с последующей кластеризацией и термодинамическим усреднением поз. Данный алгоритм позволяет точно определять позиции ~80% молекул воды, присутствующих в рентгеновских структурах. Для сравнения, нулевая модель позволяет определять позиции только ~20% рентгеновской воды. Учёт рассчитанных на основе термодинамического усреднения энергий вытесняемых лигандом молекул воды в скоринговой функции позволяет повысить сходимость молекулярного докинга в значительном количестве случаев.

Разработанные алгоритмы были применены для оптимизации найденных ранее ингибиторов поли-(АДФ-рибозо)-полимеразы (ПАРП-1). Предложены структуры ингибиторов на основе 3,5,6,7-тетрагидро-4Н-циклопента[4,5]тиено[2,3-d]пиримидин-4-она, для которых ожидается значительное улучшение связывания с белком за счёт образования водородных связей с мостиковой молекулой воды либо вытеснения её группами, компенсирующими водородные связи данной молекулы.

ПОСТРОЕНИЕ И АНАЛИЗ КОМПЬЮТЕРНЫХ ВЕРСИЙ СТРУКТУРНЫХ ДЕРЕВЬЕВ ДЛЯ βαβψ-МОТИВА И ψβαβ-МОТИВА

Каргатов А.М., Ефимов А.В.

Учреждение РАН Институт белка РАН, 142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 4

E-mail: kargatov@rambler.ru

Структурное древо – это совокупность всех промежуточных и конечных структур, которые могут быть получены из стартовой структуры путём последовательного добавления к ней α-спиралей и β-тяжей. Компьютерные структурные деревья содержат все структуры, разрешённые правилами построения. Кроме того, они являются основой системы структурной классификации белков PCBOST (http://strees.protres.ru), позволяющей не только находить белки по укладке, но и моделировать пути их сворачивания.

К четырём уже имевшимся в системе классификации деревьям (для abcd-единицы, abCd-единицы, 5S-мотива и 7S-мотива) добавлены два новых – для βαβψ-мотива и ψβαβ-мотива. Древо белков, содержащих βαβψ-мотивы, имеет 6 уровней (до структур с 6 добавочными элементами включительно) и содержит 124 укладки, из которых 24 заняты реальными белками; всего в базе данных этого древа содержится 218 белков (655 PDB-файлов). В свою очередь, древо белков, содержащих ψβαβ-мотивы, состоит из 13 уровней (до структур с 13 добавочными элементами включительно) и насчитывает 154 укладки, из которых 25 заняты реальными белками; общее число белков в этой базе – 167 (668 PDB-файлов). Оба древа содержат все разрешённые укладки до 3 уровня включительно, а выше – только те, что приводят к существующим белкам. Таким образом, в шести структурных деревьях, входящих в систему классификации PCBOST, содержится 3847 белков (10547 PDB-файлов).

Данная работа поддержана грантами РФФИ № 10-04-00727 и Федерального агентства по науке и инновациям № 02.740.11.0295.

МОЛЕКУЛЯРНО-СТАТИСТИЧЕСКИЕ РАСЧЕТЫ И МАЛДИ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕПТИДОВ НА УГЛЕРОДНЫХ СОРБЕНТАХ

Кузнецова Е.С., Буряк А.К.

Учреждение РАН Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, 119991 Москва, Ленинский просп., 31, корп.4

E-mail: eskuznetsova8@yandex.ru

В работе продемонстрирован комплексный поход для анализа аминокислот и пептидов с использованием углеродных сорбентов, включающий молекулярно-статистический расчет, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и масс-спектрометрию с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ). Аминокислоты использовали как модельные объекты для предсказания характеристик удерживания пептидов.

Проведен расчет термодинамических характеристик адсорбции (ТХА) ряда протеиногенных аминокислот и ди- и трипептидов на графитированной термической саже (ГТС). Установлено, что ТХА аминокислот и пептидов возрастают с увеличением углеродной цепи этих соединений. Выяснено, что значения константы Генри чувствительны к положению функциональных групп в аминокислоте. Проведен сравнительный анализ рассчитанных значений ТХА аминокислот с экспериментально полученными параметрами удерживания. Показано, что рассчитанные молекулярно-статистическим методом ТХА аминокислот на ГТС коррелируют с их характеристиками удерживания на углеродном сорбенте Гиперкарбе, определенными методом ВЭЖХ.

Продемонстрирована возможность применения углеродных сорбентов с различной удельной поверхностью при идентификации аминокислот и пептидов методом МАЛДИ в варианте хромато-масс-спектрометрическом off-line режиме. В качестве углеродных сорбентов использовали: графитированные сажи – графитированную термическую сажу (ГТС) и печную сажу (ПМ-16Э) с удельной поверхностью 7.6 и 16 $м^2/г$, неграфитированные сажи – ПМ-75 и Vulcan XC 72R с удельной поверхностью 75 и 265 $м^2/г$. Установлено, что увеличение удельной поверхности саж приводит к резкому возрастанию интенсивности регистрируемых пиков протонированных молекулярных ионов и аддуктов с катионами щелочных металлов аминокислот различных классов и пептидов. Предложенный способ применения саж дает возможность получать пики ионов с интенсивностью, на порядок превышающей интенсивность пиков при стандартном варианте проведения эксперимента (нержавеющая сталь).

СВОЙСТВА КСИЛАНАЗЫ Е МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *PENICILLIUM CANESCENS*

Логинов Д.С., Майсурадзе И.Г., Чулкин А.М., Федорова Т.В., Поляков К.М., Королева О.В.

Учреждение РАН Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва, Ленинский просп., 33, стр.2

E-mail: d.s.loginov@inbi.ras.ru

Ксиланазы – это О-гликозид-гидролазы, катализирующие гидролиз 1,4-β-ксилозидной связи по эндодеполимеразному механизму и участвующие в процессе биодеградации гемицеллюлоз (ксиланов), которые являются одними из наиболее распространенных полисахаридов в природе. В геноме грибов – продуцентов ксилазан показано наличие ряда ферментов, относящихся к различным семействам. Большинство из них синтезируются в минорных количествах, и вопрос об их физиологической роли остается открытым. Поэтому целью данной работы являлось исследование роли ксиланазы xylE гриба *Penicilliun canescens*, не синтезирующейся грибом в существенном количестве при глубинном культивировании.

Для достижения поставленной цели с помощью гомологичной экспрессии был получен штамм *P. canescens* – продуцент ксиланазы xylE. Изучение свойств исследуемого фермента проводили на гомогенном препарате фермента (электрофоретическая чистота >90%). Молекулярная масса ксиланазы xylE составила 40 кДа, значение изоэлектрической точки – 6.5. Максимальную активность исследуемый фермент проявлял при pH 6.0 и температуре 70°C. Значения *K*m и *V*m при гидролизе ксилана березы составили 0.52 г/л и 1.25 мМ/(мг·сек), соответственно.

Ксиланаза xylE сохраняла более 80% активности при термостатировании в течение 6 часов при 50°C и около 60% – при 60°C. Исследование процесса денатурации xylE методом ДСК показало, что плавление белковой глобулы происходило при температуре 73°C. Таким образом, полученные данные характеризуют ксиланазу xylE, как высокостабильный фермент. Анализ пространственной структуры, решенной с разрешением 1.5 Å, показал наличие 3-х дисульфидных мостиков внутри белковой глобулы. Возможно, высокое значение термооптимума данного фермента объясняется стабилизацией белковой глобулы дсульфидными связями и углеводными цепями. Исходя из полученных данных, можно предположить, что синтез данного фермента в природном штамме происходит при повышении температуры среды.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (№ 11-04-01539-а); Федеральным агентством по образованию (ГК П1297) и Министерством образования и науки (ГК № 16.512.11.2150).

КРОССРЕАКТИВНОСТЬ АНТИТЕЛ, ОТОБРАННЫХ ИЗ ФАГ-ДИСПЛЕЙНОЙ БИБЛИОТЕКИ БОЛЬНЫХ РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ НА ОСНОВНОЙ БЕЛОК МИЕЛИНА С LMP1 ВИРУСА ЭПШТЕЙНА-БАРР

Ломакин Я.А.[1], Захарова М.Ю.[1], Белогуров А.А.[1], Авакян М.Э.[1], Дубровская В.В.[2], Пономаренко Н.А.[2], Тикунова Н.В.[3], Габибов А.Г.[1]

[1]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва
[2]Исследовательский институт Скриппса, Сан-Диего, США
[3]Учреждение РАН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск

E-mail: yasha.l@bk.ru <mailto:yasha.l@bk.ru>

В последнее десятилетие роль В-клеточного ответа, сопровождающегося образованием антител к собственным антигенам, приобретает все большее значение в понимании этиологии и патогенеза аутоиммунных заболеваний. Среди патологий аутоиммунной природы особое место занимает рассеянный склероз (РС) – хроническое нейродегенеративное заболевание, приводящее к разрушению миелиновой оболочки нервных волокон. Несмотря на огромное количество молекулярно-биологических данных и клинических наблюдений, к настоящему времени не удалось составить полную и однозначную картину механизма индукции большинства аутоиммунных заболеваний. В качестве факторов, влияющих на их возникновение, называются как наследственная генетическая предрасположенность, гормональный статус организма и даже климатические условия местности, так и бактериальные или вирусные инфекции, такие как EBV, HHV6, HSV1, VZV, JCV and Torque Teno virus. В нашей лаборатории была сконструирована фаг-дисплейная библиотека одноцепочечных антител (scFv) на основе генетического материала больных РС для дальнейшего выявления аутоантител, участвующих в развитии заболевания. Антитела, специфичные к основному белку миелина (ОБМ) – один из основных аутоантигенов миелина, отбирали путем биопэннинга на полноразмерную и частично гидролизованную молекулу ОБМ. Анализ 13 отобранных клонов выявил высокую структурную гомологию с антителами из цереброспинальной жидкости больных РС а так же с антителами к latent membrane protein 1 (LMP1) вируса Эпштейна-Барр (EBV). Для 3 scFv была показана специфичность к фрагментам ОБМ 65-92 и 130–156, что соответствует данным по связыванию сывороточных антител при РС. Один из полученных клонов E2 показал одновременное взаимодействие с ОБМ и LMP1 в виде одноцепочечного антитела и полноразмерного IgG человека *in vitro*, что свидетельствует о его кроссреактивности. Таким образом, наши данные подтверждают гипотезу о молекулярной мимикрии в основе механизма развития РС. Возможно предположить, что антитела, первично образованные на LMP1 во время инфекции EBV, потенциально кроссреактивны к ОБМ и тем самым могут служить триггерами развития заболевания.

N-КОНЦЕВАЯ ЧАСТЬ БЕЛКА ТБГ1 ГОРДЕИВИРУСА СОСТОИТ ИЗ ДВУХ ДОМЕНОВ С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ НЕУПОРЯДОЧЕННЫХ СТРУКТУР

Макаров В.В., Добров Е.Н., Калинина Н.О.

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва

Белок ТГБ1 гордеивируса, кодируемый тройным блоком генов, формирует рибонуклеопротеиновый комплекс для межклеточного и дальнего транспорта по проводящей системе растения (Lim et al., 2008). Белок ТГБ1 полулатентного вируса мятлика состоит из трех доменов: N-концевого домена NTD, небольшого центрального домена ID и C-концевого домена с активностью НТФазы/хеликазы (Makarov et al., 2009). Рекомбинантные белки, соответствующие NTD, ID, и N63K, включающий в себя оба домена, были проанализированы при помощи физических и биохимических методов. NTD оказался полностью разупорядоченным доменом, в пользу чего свидетельствовали предсказания, сделанные при помощи различных вэб-сервисов, измерение спектров кругового дихроизма, аномальная подвижность в денатурирующем полиакриламидном геле и аномальный гидродинамический размер, измеренный методом динамического лазерного светорассеяния. Кроме того, NTD характеризуется низким содержанием гидрофобных и полным отсутствием ароматических аминокислот и крайне высоким содержанием лизина (19%) и серина (17%). Напротив, ID имел вторичную структуру с высоким содержанием бета-тяжей (40%) и небольшим количеством альфа-спиралей (около 10%). Однако, согласно вэб-сервису K2D2, КД-спектр ID показывает также высокое содержание неупорядоченных структур. Отсутствие пика избыточной теплоемкости, измеренной методом дифференциальной сканирующей калориметрии, и ограниченный трипсинолиз позволяют предположить, что центральная часть полипептидной цепи ID может иметь слабую третичную структуру. В целом структура ID может быть вариабельной: в присутствии 33% трифторэтанола количество альфа-спиралей в белке значительно возрастает. Но наиболее сильные изменения конформации ID вызывает РНК: при взаимодействии с ней количество бета-тяжей увеличивается до 50%, а альфа-спирали фактически полностью исчезают. N63K, несмотря на наличие ID, обладает всеми свойствами полностью неупорядоченного белка. Согласно нашим предположениям, N63K играет основную роль в структурной организации вирусного РНП-комплекса. ID обладают способностью мультимеры, визуализуемые атомно-силовой микроскопией как протяженные филаменты. Самополимеризация ID может быть индуцирована нуклеиновыми кислотами. Эти свойства показаны и для N63K, и для полноразмерного белка. NTD и ID способны связывать РНК, взаимодействовать с друг другом и фосфорилироваться растительными киназами. Итак, лабильные неупорядоченные структуры N-концевой части белка ТБГ1 позволяют этому белку выполнять различные функции на разных этапах вирусного транспорта и взаимодействовать с различными партнерами как белковой, так и нуклеиновой природы.

Данная работа поддержана грантом РФФИ № 10-04-00522а.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МОЛЕКУЛ ДИОКСАНА НА ГИДРАТНУЮ ОБОЛОЧКУ ПОЛИПЕПТИДОВ

Макшакова О.Н., Файзуллин Д.А, Зуев Ю.Ф.

Учреждение РАН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111 Казань, ул. Лобачевского, 2/31

E-mail: omega12@inbox.ru

Гидратация белков является одним из основных факторов, влияющих на фолдинг белков и проявление их функциональной активности. Низкомолекулярные органические соединения могут выступать как регуляторы активности ферментов, при этом возможно как непосредственное влияние органических соединений на белок через межмолекулярные контакты, так и их опосредованное действие через изменение структуры и динамики гидратной оболочки. Понимание механизмов взаимодействия белков с водой и третьим компонентом представляет собой фундаментальную задачу. В прикладном аспекте органические растворители (в том числе 1,4-диоксан) позволяют оптимизировать биотехнологические процессы, существенно повышая стабильность ферментов, обеспечивая реакционный контакт химическим соединениям различной полярности и др., что зачастую недостижимо в рамках чисто водного окружения. Гомополипептиды являются классической упрощенной моделью белка.

Мы провели исследование механизмов влияния молекул диоксана на гидратную оболочку полипептидов на основе данных ИК-спектроскопии. Сорбцию воды и диоксана проводили на пленках полипептидов с различными свойствами боковых групп и типом вторичной структуры (полиаланин, полилизин, полиглутаминовая кислота в заряженной и нейтральной форме, поли-γ-бензил-глутамат) в области активностей воды 0–0.5, при которых происходит заполнение первого гидратного слоя биополимеров. Чтобы установить центры сорбции воды и диоксана были рассчитаны структуры комплексов полипептид – молекула растворителя на уровне теории функционала плотности DFT PBE. Показали, что абсорбция диоксана в препарате сопровождается: 1) существенным изменением гидратации полипептида, 2) существенным изменением во вторичной структуре полипептида. В присутствии диоксана вторичная структура полипептидов характеризуется увеличением доли упорядоченных структур, преимущественно α-спиралей. Обнаружена корреляция между изменением гидратации и долей вторичных структур. Корреляции между изменением гидратации и количеством сорбированного диоксана обнаружено не было.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и гранта РФФИ № 09-03-00778.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПОКСИГЕНАЗ РАСТЕНИЙ И СВОБОДНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Осипова Е.В., Ермилова В.С., Ермакова Е.А., Гоглев Ю.В., Гречкин А.Н.

[1]*Учреждение РАН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111 Казань, ул. Лобачевского, 2/31*

E-mail: eva-0@mail.ru

Липоксигеназный сигнальный каскад является одним из способов ответа растения на воздействия биотических и абиотических стрессоров. Липоксигеназа – ключевой фермент этого пути – катализирует регио- и стереоспецифичное диоксигенирование свободных жирных кислот, содержащих 1,4-*cis,cis*-пентадиеновое основание. В таких реакциях в качестве субстрата растения используют линолевую и α-линоленовую кислоты, в каждом случае продуктами реакции являются либо 13S- либо 9S-гидроперекиси. Определение специфичности действия липоксигеназ затруднено тем, что в растении содержится большое количество изоферментов, экспрессируемых на разных этапах развития растений и в связи с действием различных факторов окружающей среды. Однако вопрос определение детерминант специфичности действия липоксигеназ остается открытым. В нашей работе использованы высокоочищенная 13S-специфичная липоксигеназа-1 сои (GmLOX1) и рекомбинантная 9S-специфичная липоксигеназа-3 кукурузы (ZmLOX3). Для определения специфичности действия этих ферментов *in silico* построены модели взаимодействия субстратов ((9*Z*,12*Z*)-гексадекадиеновая, (7*Z*,10*Z*,13*Z*)-гексадекатриеновая, (9*Z*,12*Z*)-октадекадиеновая, (9*Z*,12*Z*,15*Z*)-октадекатриеновая, (11*Z*,14*Z*)-эйкозадиеновая, (5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-эйкозатетраеновая, (13*Z*,16*Z*)-докозадиеновая кислоты) с активными центрами липоксигеназ. Для этого использовались данные рентгеноструктурного анализа GmLOX1 и построенная на основании гомологии с имеющимися структурами модель ZmLOX3. Продукты соответствующих реакций *in vitro* были выделены и идентифицированы методами ВЭЖХ и ГХ-МС. Полученные данные подтверждают предложенную модель взаимодействия субстрата с активным центром фермента. Определяющими специфичность действия ферментов факторами стали длина субстрата и положение двойных связей. Так, ZmLOX3 катализировала специфичное превращение жирных кислот, имеющихся в растении ((7*Z*,10*Z*,13*Z*)-гексадекатриеновая, (9*Z*,12*Z*)-октадекадиеновая, (9*Z*,12*Z*,15*Z*)-октадекатриеновая кислоты), хотя GmLOX1 участвовала в специфическом окислении всех имеющихся субстратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ НШ-6992.2010.4, программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО ОКРУЖЕНИЯ НА СИНТЕЗ ХРОМОФОРА В ХРОМОБЕЛКЕ asCP

Пахомов А.А., Мартынов В.И.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: alpah@mail.ru

Для практического применения белков GFP-семейства актуально создание вариантов со спектрами, смещенными в длинноволновую область. Как правило, образование хромофора в красных флуоресцентных белках контролируется посттрансляционной химией синтеза ацилимина, а также его реакционной способностью. В хромобелке из кораллового полипа *Anemonia sulcata* (asCP) на финальной стадии синтеза хромофора происходит гидролиз ацилиминной группы, сопровождающийся фрагментацией основной цепи белка. В данной работе была исследована роль ряда аминокислотных остатков из окружения хромофора в реакции гидролиза ацилимина. Для выявления этих остатков было проведено сравнение пространственной структуры asCP с его близким гомологом eqFP611. Несмотря на высокую гомологию и одинаковую хромофоробразующую триаду (-Met-Tyr-Gly-), в eqFP611 синтез хромофора останавливается на стадии синтеза ацилимина. Были обнаружены аминокислотные остатки, которые могли влиять на стабилизацию конечного состояния, возникновение стерических препятствий, выполнять каталитическую функцию, а также координирующую роль в ходе реакции. Для проверки роли отдельных аминокислотных остатков был проведён сайт-направленный мутагенез по выбранным позициям и проанализированы свойства полученных мутантов. Полученные данные свидетельствуют о том, что протекание реакции гидролиза ацилимина в нативном белке определяется в основном стерическими факторами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 09-04-00212; 10-04-00471).

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФОРМ ПРИ СОЗРЕВАНИИ ХРОМОФОРА ЗЕЛЁНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА

Плетнева Н.В., Лукьянов К.А., Гурская Н.Г., Горячева К.А., Мартынов В.И., Плетнев В.З.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: nadand@mail.ru

Белок aceGFP (мутантный вариант нефлуоресцентного белка дикого типа acGFPL из *Aequorea courelescence)* с остатком Gly вместо каталитического Glu222 характеризуется яркой зелёной флуоресценцией. При замене Gly222Glu в aceGFP образуется незрелый бесцветный вариант aceGFP_G222E, который подвергается необратимой фотоконверсии в зелёное флуоресцентное состояние aceGFP_G222E_UV. Методом рентгеноструктурного анализа высокого разрешения установлены пространственные структуры aceGFP, его бесцветного нефлуоресцентного варианта aceGFP_G222E и фотоконвертированного зелёного варианта aceGFP_G222E-UV.

На основе структурно обоснованного сайт-направленного мутагенеза показано, что созревание зелёного хромофора в aceGFP происходит по альтернативному механизму с участием в качестве каталитического остатка Tyr220 вместо стандартного для всех GFP-подобных белков инвариантного Glu222. Установлено, что хромофор бесцветного нефлуоресцентного aceGFP_G222E представляет собой промежуточное незрелое состояние с неокисленной связью Cα-Cβ тирозина и некопланарным расположением имидазолонового и фенольного циклов. Облучение незрелого aceGFP_G222E приводит к завершению созревания хромофора в конечное зелёное флуоресцентное состояние.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА СОРБЦИИ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ApoAI НА ПОВЕРХНОСТИ ПЕРФТОРУГЛЕРОДНОЙ ЭМУЛЬСИИ, СТАБИЛИЗИРОВАННОЙ ПРОКСАНОЛОМ 268

Покусаева В.О., Жалимов В.К., Склифас А.Н., Кукушкин Н.И.

Учреждение РАН Институт биофизики клетки РАН,
142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 3

E-mail: student-iam@rambler.ru

Ранее нами была показана сорбция различных белков плазмы крови человека на поверхности перфторуглеродной (ПФУ) эмульсии, стабилизированной проксанолом 268. Одним из идентифицированных нами белков оказался ApoAI. Этот белок играет важную роль в метаболизме липидов, а также ответственен за развитие атеросклероза. Нами установлено, что удаление липидов из плазмы при помощи F-113 приводит к увеличению сорбции ApoAI на 210%. Также мы установили, что раствор чистого ApoAI, не связанный в комплексы с липидами, не теряет способности к сорбции на поверхности эмульсии. Из этого можно сделать вывод, что способностью к сорбции могут обладать только не вошедшие в состав HDL комплексов белки. Методом отмывки эмульсии водными растворами веществ, конкурентно замещающих сорбированные белки, мы установили, что сорбция ApoAI основывается на гидрофобном взаимодействии. Однако в настоящий момент остается неизученным, как происходит первичный контакт поверхности эмульсии с белком, гидрофобные группы которого в фосфатном буфере (исходя из наших исследований спектров триптофановой флуоресценции ApoAI) хорошо экранированы от воды (пик приходится на 339нм).

Для исследования структурных изменений в молекуле ApoAI в сорбированном состоянии мы исследовали спектры флуоресценции этого белка. Однако мы выяснили, что в сорбированном состоянии флуоресценция ApoAI полностью потушена. Поскольку эмульсия является многокомпонентной системой, возник вопрос, (1) не является ли отдельные составляющие эмульсии тушителями флуоресценции белков, (2) не является ли светорассеяние на поверхности мелкодисперсных частиц или (3) присутствие растворенного в ПФУ кислорода причиной отсутствия флуоресценции белка. Мы выяснили, что: (1) проксанол не оказывает тушащего эффекта на свободный ApoAI, а также на раствор чистого триптофана, (2) светорассеяние на поверхности частиц эмульсии снижает сигнал флуоресценции на 30%, но не подавляет его полностью, (3) удаления кислорода не оказывает влияния на флуоресценцию сорбированного ApoAI. Исходя из этого, мы считаем, что при сорбции на эмульсии ApoAI входит в непосредственный контакт с поверхностью фторуглеродного ядра, что сопровождается значительными конформационными изменениями в молекуле белка.

IN SILICO ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПОЛИПЕПТИДОВ КУНИТЦ-ТИПА КОМБИНАТОРНОЙ БИБЛИОТЕКИ АКТИНИИ *HETERACTIS CRISPA* С БОЛЕВЫМ ВАНИЛЛОИДНЫМ РЕЦЕПТОРОМ TRPV1

Табакмахер В.М., Чаусова В.Е., Зелепуга Е.А., Монастырная М.М., Исаева М.П., Козловская Э.П.

Учреждение РАН Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, 690022 Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159

E-mail: tabval@piboc.dvo.ru

Методами молекулярной биологии установлены структуры 36 генов актинии *Heteractis crispa*, кодирующих группу полипептидов, структурно гомологичных ингибиторам протеиназ семейства Кунитца, которые имеют точечные замены в аминокислотных последовательностях, что указывает на их принадлежность к мультигенному семейству. GS-полипептиды, представляющие собой комбинаторную библиотеку *H. crispa*, имеют высокую степень гомологии с последовательностями известных представителей семейства Кунитца актиний.

С помощью расчетных методов получены пространственные структуры всех известных на сегодняшний день полипептидов комбинаторной библиотеки *H. crispa*. Анализ электростатических характеристик позволил разделить полипептиды на три группы. Одна из групп включает полипептиды APHC1, APHC2, APHC3, известные тем, что помимо трипсинингибирующей активности они обладают уникальным свойством ингибировать *in vitro* болевой ваниллоидный рецептор TRPV1 и оказывать анальгетическое действие *in vivo* [1, 2]. Однако механизмы ингибирования рецептора и купирования боли до сих пор не установлены. Мы *in silico* исследовали взаимодействие полипептидов APHC1-3 с TRPV1 в его открытом и закрытом состоянии. Молекулярный докинг позволил установить пространственную структуру комплексов и характер связывания с рецептором: по-видимому, происходит увеличение времени релаксации рецептора за счет связывания молекулой полипептида двух его цепей. Это нарушает функционирование TRPV1, что объясняет неполное ингибирование передачи болевого сигнала, обнаруженное ранее [1]. Показано, что аминокислотные остатки Thr14, Tyr16, Phe17, Glu38 и Arg/His48 полипептидов участвуют во взаимодействии с TRPV1 рецептором. Можно предположить, что остальные представители группы обладают аналогичной функциональной активностью по отношению к TRPV1.

Работа поддержана грантом РФФИ 11-04-01179-а.

Литература

1. Y.A. Andreev, S.A. Kozlov, S.G. Koshelev, E.A. Ivanova, M.M. Monastyrnaya, E.P. Kozlovskaya, E.V. Grishin. *J. Biol. Chem.* (2008) 283(35), 23914-23921.
2. Я.А. Андреев, С.А. Козлов, А.Н. Мурашев, Д.И. Скобцов, И.А. Дьяченко, Е.В. Гришин. *Биоорг. химия* (2009) 35(6), 789–798.

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФОСФОПАНТЕТЕИН АДЕНИЛИЛТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* В АПО-ФОРМЕ И В КОМПЛЕКСЕ С КОФЕРМЕНТОМ А И С ДЕФОСФОКОФЕРМЕНТОМ А

Тимофеев В.И.[1], Смирнова Е.А.[1], Чупова Л.А.[2], Есипов Р.С.[2], Куранова И.П.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН, Москва*
[2]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

E-mail: tostars@mail.ru

Фосфопантетеин аденилилтрансфераза *Mycobacterium tuberculosis* (PPAT *Mt*) катализирует предпоследнюю реакцию пятистадийного синтеза коэнзима А (CoA) – образование дефосфокофермента А (ДФСоА). Конечный продукт синтеза – CoA является также природным конкурентным ингибитором PPAT *Mt*: при избытке CoA в клетке, он образует комплекс с PPAT, ингибируя действие фермента. CoA необходим для жизнедеятельности туберкулезной бактерии, поэтому PPAT *Mt*, регулирующая биосинтез CoA, является подходящей мишенью для синтеза антитуберкулезных лекарств. Данные о пространственной структуре PPAT *Mt* и комплексов фермента важны как для понимания механизма функционирования фермента, так и для дизайна ингибиторов PPAT – потенциальных антитуберкулезных лекарств.

Рекомбинантный микобактериальный фермент получен в клетках *E. coli* с использованием сконструированного бактериального штамма-продуцента и очищен до электрофоретически гомогенного состояния. Кристаллы фермента выращены методом встречной диффузии в капиллярах в условиях невесомости в оборудовании японского космического агентства JAXA, в экспериментальном модуле Kibo [1]. От выращенных кристаллов на синхротроне SPring8 собраны дифракционные наборы до разрешения 1.6 Å (свободный PPAT *Mt*) и 1.5 Å (комплексы PPAT *Mt*/CoA, PPAT *Mt*/ДФСоА).

С использованием полученных наборов методом молекулярного замещения решены структуры PPAT *Mt* в апо-форме и в комплексах с лигандами. Структуры уточнены при разрешении 1.69, 1.59 и 1.59 Å, Rf составили 0.1704, 0.1611 и 0.1627, Rfree – 0.2195, 0.2108 и 0.2115 соответственно для апо-формы, комплекса с CoA и комплекса с ДФСоА.

В полученных структурах определены места связывания лигандов, охарактеризовано их окружение, прослежены конформационные изменения, сопровождающие связывание лигандов.

Работа выполнена при финансовой поддержке ЦНИИМаш Роскосмоса.

Литература

1. Tanaka, H., Inaka, K., Sugiyama, S., Takahashi, S., Sano, S., Sato, M., Yoshitomi, S. *J. Synchrotron. Rad*. (2004) 11, 45–48.

ПРИМЕНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИИ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПЕПТИДНЫХ ПРОДУКТОВ

Федоткина О.С.[1], Пурыгин П.П.[1], Буряк А.К.[2]

[1]*Самарский государственный университет, 443011 Самара, ул. Ак. Павлова, 1*
[2]*Учреждение РАН Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина, 119991 Москва, Ленинский просп., 31, корп.4*

E-mail: elektromodel@mail.ru

Ранее нами сообщалось, что в процессе изучения антибактериальных пептидов, индуцированных организмом *Galleria mellonella* в ответ на микробную инфекцию (*E. coli, Bacillus cereus*) мы идентифицировали известные и новые пептиды. Исследование проводили физико-химическими (ВЭЖХ, МАЛДИ-МС/МС) и микробиологическими методами (тестирование антибактериальных свойств пептидов на культурах воздействующих бактерий). В результате дальнейшей работы изучены различные варианты иммунизирующего воздействия, включающие бактерии *E. coli* или *Bacillus cereus,* их совокупность, а также 1.1-диметилгидразин и его производное с ацетоном. Пробоподготовку пептидных продуктов проводили, используя твердофазную экстракцию. Хроматографирование пептидных смесей осуществляли с помощью трех вариантов ВЭЖХ: обращенно-фазового, катионообменного и на пористом графитированном углероде. Полученные пептидные фракции масс-спектрометрически изучали в линейном режиме в случае МАЛДИ-МС и в режиме рефлектрона в случае МАЛДИ-МС/МС.

В результате проведенных исследований разработаны хроматографические режимы, позволяющие эффективно разделять исследуемые пептидные продукты на сорбентах: Zorbax Eclipse XDB-C18 и Zorbax SCX-300. С сорбента Hypercarb удалось осуществить элюирование только анионного пептида лебоцина. Среди всех детектированных пептидных продуктов идентифицированы двадцать известных антимикробных пептидов. Детектирован ряд новых пептидов с антибактериальными свойствами, и для некоторых из них, применяя алгоритмы секвенирования *de novo,* установлены предполагаемые аминокислотные последовательности. Показано, что введение 1.1-диметилгидразина и его производного также вызывает биосинтез антибактериальных пептидных продуктов, поскольку в излучаемых пептидных смесях обнаружены все известные для исследуемого организма антибактериальные пептиды, а также часть не описанных ранее и детектированных нами после иммунизации бактериями. Проведенные исследования показали эффективность и перспективность комплексного использования сочетания физико-химических методов и подходов к разделению и идентификации антибактериальных пептидных продуктов.

КИНЕТИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЦИСПЛАТИНА С ДНК В ПРИСУТСТВИИ БЕЛКА HMGB1

Феофилова М.С.[1,2], Огарков М.А.[2], Чихиржина Е.В.[1], Поляничко А.М.[1,2]

[1]*Физический факультет СПбГУ, 198504 С.-Петербург, Старый Петергоф, ул. Ульяновская, 1*
[2]*Учреждение РАН Институт цитологии РАН, 194064, С.-Петербург, Тихорецкий пр., 4*

E-mail: maria.feofilova@gmail.com

Белок HMGB1 – один из наиболее распространённых негистоновых белков хроматина. HMGB1 принадлежит к семейству белков, содержащих структурно-функциональный домен – HMGB-домен. Отличительной особенностью HMGB-белков является их способность избирательно связываться с неканоническими структурами ДНК, такими, как хиазма Холлидея и аддукты, образованные различными противоопухолевыми препаратами.

Препараты на основе координационных соединений платины являются одними из самых успешных и широко используемых в настоящее время противоопухолевых средств. Один из самых эффективных препаратов этой группы – цисплатин (*цис*-диаминдихлорплатина(II) или *цис*-ДДП). Его действие основано на связывании с ДНК с образованием внутри- и межнитевых сшивок (аддуктов). Существует предположение, что транспорт данного соединения в клетке может быть связан со способностью препарата взаимодействовать с серосодержащими аминокислотными остатками белковых молекул. Одним из наиболее перспективных кандидатов для образования промежуточных комплексов ДДП-белок является негистоновый белок хроматина HMGB1.

Наши исследования посвящены изучению кинетических аспектов взаимодействия белка HMGB1 с ДДП и аддуктами ДДП на ДНК. Используя УФ-спектроскопию, электрофорез, кинетический и термодинамический подходы, мы исследовали взаимодействия ДНК-ДДП и HMGB1-ДДП. Используя хемометрический подход к анализу кинетических данных, нами были определены главные константы скоростей основных протекающих реакций.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты №№ 09-08-01119, 10-04-00092) и Правительства Санкт-Петербурга. Часть работ проводилась в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.

АСИММЕТРИЯ ГИДРОФОБНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ – ОСОБЕННОСТЬ α-МЛЕКОТОКСИНОВ СКОРПИОНОВ

Чугунов А.О.[1], Коромыслова А.Д.[2], Василевский А.А.[1], Полянский А.А.[1], Гришин Е.В.[1], Ефремов Р.Г.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*
[2]*МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.12*

E-mail: batch2k@yandex.ru

Потенциал-чувствительные натриевые каналы (ПЧНК) играют важнейшую роль в проведении нервного импульса и являются мишенью множества нейротоксинов. Полипептидные α-токсины из яда скорпионов, замедляющие инактивацию ПЧНК и продлевающие потенциал действия, различаются селективностью: «классические» α-токсины («млекотоксины») преимущественно действуют на млекопитающих, инсектотоксины – на насекомых, а «α-подобные» токсины – на оба класса животных. Поиск особенностей α-токсинов, определяющих эту селективность, не только важен для фундаментальной нейробиологии, но и открывает путь к созданию новых безопасных инсектицидов.

α-Токсины скорпионов образованы двумя «доменами»: консервативной «сердцевиной», включающей βαββ-мотив, и так называемым RC-доменом, состоящим из скрепленных дисульфидной связью N-концевой петли и C-конца. Вариабельный RC-домен предположительно отвечает за селективность взаимодействия токсинов с разными ПЧНК. В этой работе мы изучали гидрофобную организацию и конформационную подвижность α-токсинов скорпионов при помощи методов молекулярной динамики и расчета молекулярного гидрофобного потенциала. Для «млекотоксинов» была обнаружена асимметрия: RC-домен у них существенно гидрофильнее, нежели консервативная «сердцевина». Уровень гидрофобной «асимметрии» сохраняется в филогенетической группе «млекотоксинов» и коррелирует с высокой токсичностью этих соединений по отношению к млекопитающим. Для двух других групп токсинов такого различия между «доменами» не наблюдалось. Кроме того, у «млекотоксинов» RC-домен конформационно пластичнее в сравнении с другими группами α-токсинов. Эти особенности молекулярной организации помогут выявить основы селективности действия α-токсинов скорпионов и лягут в основу дизайна их биоинженерных аналогов, селективно связывающихся с разными ПЧНК.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (ГК № П818).

Секция 5

Биологическая активность. Методы тестирования

БЕЛОК ЯДРЫШКА ФИБРИЛЛАРИН КАК МАРКЕР ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Барыкина Н.В., Зацепина О.В.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: oleeinar006@rambler.ru

Известно, что окислительные повреждения различных клеточных структур играют большую роль в развитии некоторых нейродегенеративных заболеваний. Кроме того, в последнее время растет количество данных в пользу активного участия ядрышка и его белковых компонентов в осуществлении клеточной реакции на разнообразные виды стрессов, включая вирусную инфекцию, тепловой шок и гипоксию [1]. Специфический белок ядрышка фибрилларин – это ядрышковая метилтрансфераза, необходимая для метилирования 28S, 5.8S и 18S рРНК, которая, исходя из первичной структуры, может являться специфической мишенью окислительного стресса в клетках человека.

Цель настоящей работы – изучение реакции белка ядрышка фибрилларина на окислительный стресс, индуцированный 1–100 мМ перексида водорода (H_2O_2) в клетках культуры HeLa. Исследования с использованием методов клеточной и молекулярной биологии показали, что изменения в состоянии фибрилларина, такие как электрофоретическая подвижность белка на иммуноблотах и динамические свойства белка (доля мобильной фракции и время полувосстановления фибрилларина-EGFP) в живых клетках, изученные методом FRAP (fluorescence recovery after photobleaching), проявляются уже через 1–15 мин после начала обработки клеток пероксидом водорода. Через два часа после воздействия выявляются отчетливые изменения в локализации белка, проявляющиеся в его миграции из ядрышковых фокусов в нуклеоплазму. Эти изменения сопровождаются дополнительным замедлением электрофоретической подвижности фибрилларина, что может свидетельствовать о его фосфорилировании в условиях окислительного стресса. Аналогичные изменения в расположении фибрилларина при других стрессовых воздействий на клетки HeLa в литературе на сегодняшний день не описаны. Таким образом, наши наблюдения впервые показали, что фибрилларин специфичным образом реагирует на действие пероксида водорода и может являться мишенью окислительного стресса в клетках HeLa.

Работа финансировалась Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 08-04-00854).

Литература

1. Severine Boulon, Belinda J. Westman, Saskia Hutten, Francois-Michel Boisvert, and Angus I. Lamond. «The Nucleolus under Stress», *Molecular Cell,* 40.

ВЛИЯНИЕ ФРАГМЕНТА АВП(6-9) И АНАЛОГА АВП(6-9) – Ac-D-SPRG – НА ОБУЧЕНИЕ С ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМ И ОТРИЦАТЕЛЬНЫМ ПОДКРЕПЛЕНИЕМ

Белякова А.С., Угрина А.П., Воскресенская О.Г., Каменский А.А.

МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.12

E-mail: alixletter@yandex.ru

Целью нашего исследования являлось изучение влияния фрагмента аргинин-вазопрессина АВП(6-9) и оригинального структурного аналога АВП(6-9) – Ac-D-SPRG – на выработку условного рефлекса активного избегания болевого раздражителя (УРАИ) и выработку условной пищедобывательной реакции на место. Работа проводилась на половозрелых самцах нелинейных белых крыс массой 220–250 г. Препараты вводили интраназально в объеме 1 мкл/10 г массы тела в дозах 10.0, 1.0, 0.1 и 0.01 мкг/кг за 30 минут до начала тестирования. Контрольным животным вводили эквивалентный объем дистиллированной воды.

Обучение животных в сложном пищевом лабиринте показало, что введение АВП(6-9) приводило к ускорению выработки условной реакции на место. Время реакции достоверно уменьшалось по сравнению с контрольной группой. Наиболее эффективной была доза 10 мкг/кг. Выработанный навык сохранялся во всех группах. Выработка УРАИ показала, что число выполненных реакций в опытной группе достоверно выше, чем в контрольной уже на первый день опыта. Однако к четвертому дню количество выполненных реакций значимо превышало контрольные показатели только в группе животных, получавших пептид в дозе 0,1 мкг/кг. Навык сохранялся во всех опытных группах.

Ac-D-SPRG в указанных дозах не оказывал значительного влияния на выработку условной пищедобывательной реакции на место. При выработке УРАИ введение Ac-D-SPRG в первый день опыта приводило к достоверному увеличению количества выполненных реакций у животных, получавших препарат в больших дозах (1 и 10 мкг/кг). Во второй день обучения количество выполненных реакций значимо возрастало во всех опытных группах, на третий день – у животных, которым вводили Ac-D-SPRG в дозах 1 и 10 мкг/кг, на четвертый день – 10 мкг/кг. Навык сохранялся во всех группах.

Работа выполнена в рамках соглашения о научно-техническом сотрудничестве между ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» и кафедрой физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова и при поддержке ФЦП «Научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (ГК №П1057).

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА ПРОЛИЛ-ГЛИЦИЛ-ПРОЛИНА (PGP) НА РАЗВИТИЕ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ВЕЩЕСТВОМ 48/80

Бондаренко Н.С., Умарова Б.А., Копылова Г.Н., Самонина Г.Е., Гусева А.А.

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

E-mail: n.s.bondarenko@gmail.com

Ранее показано, что регуляторные пептиды семейства глипролинов, в частности, пептид PGP, обладают противовоспалительным действием, сопровождающимся снижением секреторной активности тучных клеток (ТК). Мы предположили, что стабилизирующее действие пептида на ТК может быть одним из механизмов его противовоспалительного действия. В опытах *in vitro* было показано, что PGP препятствует активирующему действию на ТК эндогенного активатора – фрагмента АКТГ$_{1-24}$ – синактена. Однако при активации ТК неселективным экзогенным активатором – веществом 48/80 – стабилизирующий эффект отсутствовал. В то же время in vivo PGP облегчал течение и снижал смертность мышей при анафилактоидной реакции, вызванной введением вещества 48/80 (внутрибрюшинно, 8 мг/кг), а также предотвращал и уменьшал нарушения сократительной активности лимфатических сосудов брыжейки крыс (вещество 48/80 внутримышечно, 1 мг/кг). В экспериментах на модели локального воспалительного отёка лапы крыс, вызванного подкожным введением гистамина (0,2 мг в объёме 0,1 мл), каолина (0,1 мл 10% раствора) или вещества 48/80 (0, 05 мг в объёме 0,1 мл) мы сравнивали действие пептида с известным нестероидным противовоспалительным препаратом диклофенаком (1 мг/кг). Оказалось, что оба вещества в равной степени достоверно уменьшали отёк, вызванный гистамином или каолином, но значительно меньше изменяли величину отёка, вызванного веществом 48/80. Это наводит на мысль о сходстве механизмов противовоспалительного действия PGP и диклофенака. Однако этот вопрос требует дальнейших исследований.

Возможность пептидной коррекции нарушений, вызванных веществом 48/80, может свидетельствовать о наличии в защитных свойствах пептида механизмов, не связанных со стабилизацией тучных клеток.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 09-04-00669-а).

ДЕЙСТВИЕ НОВЫХ АНАЛОГОВ НОЦИЦЕПТИНА НА ДВИГАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ БЕЛЫХ КРЫС

Иванова Е.А.[1], Сарычева Н.Ю.[1], Дубынин В.А.[1], Каменский А.А.[1], Андреева Л.А.[2], Мясоедов Н.Ф.[2]

[1]МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/12
[2]Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2

E-mail: katya.kilgor@gmail.com

Ноцицептины – относительно недавно обнаруженное семейство пептидов, родственных опиоидам, лиганды рецептора ORL_1. Они участвуют в регуляции многих физиологических процессов, в том числе разных видов поведения; в ряде случаев механизмы действия ноцицептинов рассматриваются как антиопиоидные. При однократном введении i.c.v. природный ноцицептин NC(1-17) снижает двигательную активность у мышей и крыс. Ранее нами было изучено влияние амида NC(1-4), FGGF-NH_2, на поведение крыс. Было установлено, что этот пептид, как и NC(1-17), влияет на двигательную активность и уровень тревожности (направленность изменений зависит от многих факторов, в частности, от пола и возраста животных).

В представленной работе были исследованы новые устойчивые к пептидазам аналоги ноцицептина FGGFPGP и FGGFVGP. Пептиды вводили взрослым самцам белых беспородных крыс (1 мг/кг, в/б). Поведение животных исследовали в тестах «открытое поле» и «О-лабиринт» (модификация «приподнятого крестообразного лабиринта»). У крыс, которым был инъецирован пептид FGGFVGP, достоверно уменьшился пробег в «открытом поле». В «О-лабиринте» у животных этой же группы было значимо меньше выходов на открытые участки лабиринта, чем у контрольных. У крыс, получивших FGGFPGP, существенных изменений поведения не обнаружено. Таким образом, показано, что FGGFVGP, но не FGGFPGP, способен подавлять локомоторную активность экспериментальных животных. Уменьшение числа выходов на открытые участки «О-лабиринта» с учётом результатов «открытого поля» объясняется скорее снижением подвижности, чем изменением уровня тревожности. Отсутствие эффектов от введения FGGFPGP связано, очевидно, с тем, что первичная структура этого пептида затрудняет его присоединение к рецептору ORL1. В то же время более гибкая молекула FGGFVGP способна взаимодействовать с данным рецептором, запуская изменения поведения, схожие с эффектами природного лиганда. В дальнейшем планируется исследовать возможность использования пептидов этой группы для ослабления гиперактивности животных при некоторых типах нейропатологии и наркотической зависимости.

БЕЛОК ТЕПЛОВОГО ШОКА 70 ИНГИБИРУЕТ ИНДУЦИРОВАННУЮ LPS ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ NK-КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА

Каневский Л.М., Коваленко Е.И.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: lmkanevski@rambler.ru

К настоящему времени было обнаружено, что экзогенный белок теплового шока 70 кДа (Hsp70) оказывает активирующее действие на натуральные киллеры (NK-клетки) человека. Однако не исключено, что стимулирующий эффект Hsp70 может быть вызван примесью бактериальных липополисахаридов (LPS), содержащихся в препаратах рекомбинантного белка. Целью данной работы было оценить действие LPS и Hsp70, очищенного от LPS, на продукцию цитокинов NK-клетками человека.

NK-клетки выделяли из фракции мононуклеаров периферической крови здоровых доноров путём магнитной сепарации. Фенотип клеток определяли методом проточной цитометрии; уровень продукции IFN-γ и TNF-α оценивали методом иммуноферментного анализа. В опытах использовали рекомбинантный человеческий Hsp70. LAL-тест показал, что такой белок содержит высокий уровень примесей LPS, порядка 25000 ед./мг белка. Hsp70 был очищен от LPS с помощью колонки с полимиксином B; содержание LPS в очищенном белке было около 30 ед./мг. NK-клетки инкубировали с Hsp70, Hsp70low $_{lps}$ (5 мкг/мл) и LPS из *E.coli* (1 мкг/мл) в течение 18 ч в присутствии IL-2, после чего проводили анализ цитокинов в супернатантах.

Чистота популяции NK-клеток ($CD3^-CD56^+$-лимфоцитов) составляла не менее 97%. Как неочищенный Hsp70, так и LPS заметно стимулировали продукцию цитокинов (эффект составлял 30–90% по сравнению с клетками, стимулированными только IL-2), в то же время Hsp70low $_{lps}$ не проявлял стимулирующего действия. Более того, при инкубации NK-клеток одновременно с Hsp70low $_{lps}$ и LPS наблюдалось снижение продукции цитокинов по сравнению с действием только LPS. Таким образом, было показано, что активирующее действие экзогенного Hsp70 на NK-клетки зависит от присутствия примесей бактериальных липополисахаридов. Рецептор LPS – TLR4 – практически отсутствовал (0,1–0,3% $TLR4^+$ клеток) на поверхности NK-клеток. Возможно, Hsp70 способен связывать и тем самым инактивировать LPS. Полученные данные позволяют говорить об антисептическом действии Hsp70.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», проект № 16.740.11.0200.

КОРРЕКЦИЯ «ТИМОГЕНОМ®» ИЗМЕНЕНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ В КРОВИ КРЫС ВОЗДЕЙСТВИЕМ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОЙ ГИПОКИНЕЗИИ И НИЗКОИНТЕНСИВНЫМ γ-ОБЛУЧЕНИЕМ

Лузянина А.А.[1], Шевченко А.С.[1], Изместьева О.С.[1], Семин Ю.А.[1], Жаворонков Л.П.[1], Дейгин В.И.[2]

[1]Федеральное государственное бюджетное учреждение МРНЦ Минздравсоцразвития РФ, 249036 Обнинск, Московская обл., ул. Королёва, 4
[2]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

E-mail: a.luzyanina@mail.ru

При исследовании последствий пролонгированного воздействия на крыс низкоинтенсивного γ-облучения (мощность дозы 5 мкГр/мин, суммарная поглощенная доза 4,8 мГр) и антиортостатической гипокинезии (АНОГ) показано, что каждый из этих факторов вызывает развитие у животных стрессорных реакций, о чем свидетельствует, в частности, изменения в антиоксидантной системе (АОС) и системе красной крови. Для лекарственной коррекции нарушений, вызываемых совместным воздействием на крыс АНОГ и γ-облучения, был применен фармакопейный иммуномодулятор «Тимоген®», созданный на основе синтетического дипептида Glu-Trp. Препарат вводили облученным животным, находящимся в состоянии гипокинезии, внутрибрюшинно в дозе 100 мкг/кг в 0,25 мл физиологического раствора четырехкратно с интервалом в сутки, сразу после последнего сеанса облучения. Анализ состояния крови с помощью метода кислотных эритрограмм, подсчета количества ретикулоцитов и определения активности ферментов АОС проводили до начала воздействия, после окончания облучения до введения «Тимогена®», а затем через 1, 6 и 15 суток после последней инъекции иммуномодулятора. Анализ эритрограмм показал, что через 6 суток после последнего введения «Тимогена®» происходит резкое омоложение состава эритроцитов, при этом в крови отсутствуют функционально незрелые, аномально стойкие эритроциты. Количество ретикулоцитов в крови животных, получавших «Тимогена®» статистически значимо возрастает по сравнению с группой контроля в два раза, что также свидетельствует об активации кроветворения. По-видимому, как следствие омоложения состава эритроцитов в периферической крови, на 6 сутки возрастает активность супероксиддисмутазы, которая нормализуется концу срока наблюдения на 15 сутки. Таким образом, помимо «Тимогена®» и, возможно, другие пептидные иммуномодуляторы могут быть использованы для коррекции нарушений, вызываемых в организме животных совместным действием АНОГ и пролонгированным γ-облучением с малой мощностью дозы.

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА КИОТОРФИНА НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У МЫШЕЙ

Мартынов А.А.[1], Попова С.С.[1], Шумилов А.С.[2], Захарова Н.М.[2]

[1]*Филиал МГУ им. М.В. Ломоносова, Пущино, Московская обл.*
[2]*Учреждение РАН Институт биофизики клетки РАН,*
142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 3

E-mail: Aleksey.Martynov@mail.ru

Пептид киоторфин (КТ) был исходно выделен из тканей головного мозга быка (Takagi et al., 1979) и позднее обнаружен в мозге других млекопитающих. В дальнейшем, было показано, что КТ обладает не только анальгетическим эффектом, но также оказывает влияние на температуру тела и, возможно, является ингибитором сердечной деятельности и дыхания в процессе гибернации (Емельянова и др., 1992, Игнатьев и др., 2009). Представления о механизмах действия КТ на настоящий момент являются не однозначными (Закуцкий и др., 2008). Предполагается, в частности, что тормозящее влияние КТ на ЦНС реализуется через серотонинергическую (5-НТ) систему мозга (Kolaeva et al., 2000).

Целью настоящей работы является исследование влияния КТ на фоне активации 5-НТ-системы мозга линейных мышей (BALB/c) на жизненные показатели: частоту дыхания (ЧД), частоту сердечных сокращений (ЧСС) и насыщение кислородом крови в процентах функционального артериального гемоглобина. Измерения сделаны с помощью системы MouseOx (Starr Life Science, USA), которая позволяет проводить неинвазивную регистрацию в режиме реального времени. КТ («Sigma», 50 мкг/кг), прекурсор серотонина – 5-гидрокситрептофан (5-ГТ) («Fluka», 2 мг/кг) и дистиллят (контроль) вводили интраназально. Предварительно, с помощью фальш – зажимов все мыши адаптировались к сенсорному датчику, помещаемому для регистрации показателей на воротниковую зону. В результате проведенных экспериментов выявлено, что введение КТ через 10 минут после предварительной инъекции 5-ГТ вызывает достоверное устойчивое понижение содержания кислорода в крови мышей (на 2%) и подавляет ЧСС на 12%. Изменение частоты дыхания не наблюдается. КТ, 5-ГТ или дистиллят сами по себе не вызывают достоверных изменений данных показателей.

Таким образом, можно предположить, что эффекты КТ в наших экспериментах опосредованы взаимодействием с 5-НТ-системой мозга.

ВЛИЯНИЕ НАТРИЙУРЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ НА АКТИВНОСТЬ РЕЦЕПТОРНЫХ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗ У КРЫС С НЕОНАТАЛЬНЫМ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВЫМ ДИАБЕТОМ

Мойсеюк И.В., Шпаков А.О., Деркач К.В., Чистякова О.В., Бондарева В.М.

Учреждение РАН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223 С.-Петербург, пр. М. Тореза, 44

E-mail: sun787@mail.ru

В условиях сахарного диабета (СД) и его осложнений меняется функциональная активность гормональных сигнальных систем и их чувствительность к регуляторному действию гормонов. Нами изучена регуляция натрийуретическими пептидами ANP и CNP активности рецепторных форм гуанилатциклазы (рГЦ) в тканях самок крыс с неонатальным стрептозотоциновым СД 2-го типа продолжительностью 240 дней и влияние на нее интраназального введения инсулина и серотонина (6 недель, суточная доза 0.48 IU инсулина или 20 мкг серотонина на крысу). У диабетических крыс наблюдалось повышение базальной активности рГЦ в миокарде и ее снижение в матке и яичниках, в то время как в мозге заметных отличий от контроля выявлено не было. Введение диабетическим крысам инсулина снижало базальную активность рГЦ в миокарде и восстанавливало ее до нормального уровня в яичниках. Введение серотонина вызывало менее выраженное в сравнении с инсулином снижение базальной активности рГЦ в миокарде и незначительно повышало ее в мозге. Натрийуретические пептиды стимулировали базальную активность ГЦ во фракциях плазматических мембран тканей крыс, причем ANP был наиболее эффективен в миокарде (10^{-6} M ANP, +106%), CNP – в яичниках и матке (10^{-6} M CNP, +89 и +73%). В миокарде диабетических крыс ослаблялся стимулирующий ГЦ эффект ANP и, напротив, усиливался эффект CNP, в яичниках отчетливо снижался стимулирующий ГЦ эффект CNP и, в меньшей степени, соответствующий эффект ANP. В матке и мозге диабетических крыс чувствительность рГЦ к гормонам практически не менялась. Введение инсулина диабетическим крысам вызывало повышение эффекта ANP в миокарде до его значений в контроле и снижало эффект CNP, а также частично восстанавливало эффект CNP в яичниках. Введение серотонина вызывало некоторое усиление эффектов ANP и CNP в мозге контрольных и диабетических крыс. Таким образом, в условиях СД 2-го типа в миокарде и тканях репродуктивной системы крыс меняется функционирование рГЦ, чувствительной к натрийуретическим пептидам, причем интраназальное введение инсулина в значительной степени восстанавливает активность рГЦ.

Работа поддержана Программой «Фундаментальные науки – медицине» (2009–2011 гг.).

АКТИВИЗАЦИЯ СИНТЕЗА ГЛИАЛЬНОГО ФИБРИЛЛЯРНОГО КИСЛОГО БЕЛКА В АСТРОЦИТАХ СЕТЧАТКИ ПРИ РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ У КРЫС

Недорубов А.А.[1], Недзвецкий В.С.[2], Шрам С.И.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт молекулярной генетики, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2*
[2]*Днепропетровский национальный университет им. Олеся Гончара, Днепропетровск, Украина*

E-mail: scienceAN@rambler.ru

Диабетическая ретинопатия – одно из осложнений сахарного диабета, характеризующееся поражением сосудов сетчатки, а также дегенеративными изменениями в нейрональных слоях сетчатки. Ключевую роль в генезе ретинопатии играют астроциты. В модели сахарного диабета исследовали влияние хронической гипергликемии на морфологические показатели и состояние промежуточных филаментов, характеризующие уровень астроглиоза в сетчатке.

Эксперименты проводились на самцах крыс Вистар весом 220–250 г. Хроническую гипергликемию вызывали однократным внутрибрюшинным введением животным стрептозотоцина в дозе 60 мг/кг. Уровень сахара в крови крыс с гипергликемией составлял 26,0±3,4 ммоль/л, а в контрольной группе – 7,8±0,5 ммоль/л. Через 12 недель после введения стрептозотоцина содержание гликозилированного гемоглобина у крыс с гипергликемией достигало 10,2±0,7%, тогда как в контрольной группе – 4,8±0,4%. Гистологический анализ и окрашивание срезов методом TUNEL выявили значительные изменения нейродегенеративного характера в сетчатке крыс, подвергшихся 12-недельной гипергликемии. Иммуногистохимическое окрашивание сетчатки на маркер астроглии, глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), выявило значительное увеличение плотности и размеров астроцитов у крыс с гипергликемией по сравнению с контрольными животными. Количественная оценка растворимой и нерастворимой форм GFAP в сетчатке методом иммуноблоттинга показала, что содержание этих форм белка у крыс с гипергликемией было примерно в 3 раза выше, чем у контрольных животных. Более того, у крыс с длительной гипергликемией наблюдали значительное возрастание низкомолекулярных фрагментов GFAP (<49кДа), что свидетельствует об активной перестройке цитоскелета и развитии астроглиоза.

Полученные результаты подтверждают наличие значительных цитологических изменений в астроглии при хронической гипергликемии, и указывают на необходимость проведения более подробного изучения функции астроцитов в процессах нейродегенерации и репарации сетчатки при диабетической ретинопатии.

РОЛЬ АНТИТЕЛ К ДЕСМОГЛЕИНАМ И ДЕСМОКОЛЛИНАМ В АКАНТОЛИЗЕ ПРИ ПУЗЫРЧАТКЕ

Прохоров А.В., Свирщевская Е.В.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: sashapro2006@yandex.ru

Белки кадгеринового семейства десмоглеины (ДСГ) 1-4 и десмоколлины (ДСК) 1-3 формируют межклеточный контакт десмосомальных бляшек многослойного эпителия кожи и слизистых оболочек. В эпидермисе кожи десмосомы формируются преимущественно ДСГ1, 3 и ДСК1, 3. Появление в сыворотке крови больных антител к ДСГ1 и 3 приводит к развитию аутоиммунной патологии – пузырчатки, которая клинически проявляется в формировании внутриэпидермального расслоения – акантолиза. Целью данной работы был анализ роли антител к ДСГ и ДСК, а также типирование потенциальных патогенных эпитопов ДСГ3.

Для анализа кожу здорового донора помещали в лунки планшета и добавляли: смесь моноклональных антител к ДСГ1-4; к ДСК1-3; IgG от больных пузырчаткой; IgG здоровых доноров; антисыворотки кроликов, иммунизированных ДСГ3 пептидами: 25-37, 78-90, 89-98, 54-73 и 148-158, а также сыворотку здорового кролика. Эксплантаты кожи инкубировали 24 ч, после чего фиксировали параформальдегидом и заливали парафином. Парафиновые срезы окрашивали геманоксилин-эозином.

IgG больных, но не здоровых, доноров вызывали полное отслоение эпидермиса от базальной мембраны. Аналогичное действие оказывали пулы антител к ДСГ и ДСК. Для анализа патогенности пептиды выбирали из функционально значимых участков молекулы ДСГ3, принимающих участие в транс- и цис-взаимодействии. Кроликов иммунизировали пептидами в ПАФ. Продукцию антител оценивали с помощью ИФА и конфокальной микроскопии. Только антисыворотка против пептида 25-37 вызывала выраженный акантолиз.

Впервые показано, что антитела к ДСК могут вызывать акантолиз кожи. Среди потенциальных эпитопов ДСГ3 наиболее патогенным явился пептид 25-37, принимающий участие в транс-взаимодействии ДСГ3 соседних клеток. Таким образом, при добавлении в культуру антител к любым десмосомальным кадгеринам наблюдается акантолиз, что свидетельствует о нарушении структуры десмосом. Следовательно, формирование антител к ДСГ3 при пузырчатке является следствием генетической предрасположенности, а не преимущественной патогенности антител к ДСГ3 и 1.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (Госконтракт № 14.740.11.0454) и Регионального общественного Фонда содействия отечественной науке.

ВЛИЯНИЕ PRO-GLY-PRO И ACETYL-PRO-GLY-PRO НА ТРАНСКРИПЦИЮ ЦИТОКИНОВ ПРИ ЭТАНОЛОВОМ И СТРЕССОРНОМ ПОВРЕЖДЕНИЯХ ЖЕЛУДКА У КРЫС

Сангаджиева А.Д.,[1] Бакаева З.В.,[1] Самонина Г.Е.,[1] Мезенцева М.В.[2]

[1]*МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*
[2]*ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития России, Москва*

E-mail: sanganna@mail.ru

Целью данной работы является изучение влияния глипролинов – Pro-Gly-Pro (PGP) и acetyl-Pro-Gly-Pro (acPGP) – на экспрессию генов ряда цитокинов при этаноловом и стрессорном язвообразовании.

Эксперименты проводили на самцах белых беспородных крыс (этаноловая модель) и самцах крыс линии Wistar (стрессорная модель). Животным опытных групп за час до проведения эксперимента интраназально вводили PGP или acPGP в дозе 3,7 мкм/кг в объеме 10 мкл/200 г, контрольной группе – физиологический раствор в том же объеме. Этаноловые повреждения слизистой оболочки желудка (СОЖ) вызывали внутрижелудочным введением 96°-го этанола (1 мл/200 г веса). Стресс вызывали 30 -минутным плаванием в «холодной воде» при температуре 21°С. Площадь язвенных повреждений СОЖ (мм^2) рассчитывали с помощью бинокулярной лупы с окуляр-микрометром. Статистическую обработку результатов рассчитывали по критериям Стьюдента и Манна-Уитни. Для определения активности мРНК 11 цитокинов в мононуклеарах периферической крови использовали методы обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции.

Этанол и стресс вызывали повреждения СОЖ, площадь которых в среднем составила 144,46 мм^2 и 0,88 мм^2, соответственно. Противоязвенный эффект (ПЭ) PGP на этаноловой и стрессорной моделях язвообразования был равен 52% и 76%, соответственно. AcPGP не проявил противоязвенного действия. Введение этанола сопровождалось угнетением транскрипции интерлейкина (ИЛ)-12. Нами показаны некоторые механизмы действия пептидов при язвообразовании. На фоне PGP и acPGP этаноловые повреждения сопровождались достоверным понижением уровня транскрипции ИЛ-12. Также наблюдались следующие тенденции: угнетение транскрипции ИФН-γ у животных, получавших PGP, активация транскрипции интерферона (ИФН)-α – при AcPGP. Стресс вызывал у крыс активацию экспрессии гена противовоспалительного цитокина ИЛ-4 ($p<0,05$) и гена ИЛ-12, а также угнетение экспрессии генов ИЛ-1β, ИЛ-18. PGP активировал транскрипцию ИЛ-4 и угнетал экспрессию ИЛ-6. AcPGP подавлял экспрессию гена ИЛ-1β.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 09-04-00669-а).

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА 70 кДа НА МОДЕЛИ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНОГО СЕПСИСА У КРЫС

Сапронова А.А., Остров В.Ф., Мурашев А.Н.

Филиал Учреждения РАН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Московская обл.

Сепсис – инфекционная болезнь, обусловленная различными возбудителями, которая развивается у лиц с резко сниженными защитными силами организма. Сепсис может быть вызван различными микроорганизмами преимущественно бактериальной природы. В случае грамположительных бактерий ведущим звеном патогенеза являются молекулы тейхоевых и липотейхоевых кислот, которые являются структурными компонентами бактериальной клеточной стенки. Липотейхоевая кислота (ЛТК) является суперантигеном и способна стимулировать иммунный ответ организма. Также она связывается с TLR-рецепторами (Toll_like receptor) на поверхности моноцитов и нейтрофилов и стимулирует выброс в кровоток провоспалительных цитокинов. Один из возможных путей борьбы с септическими патологиями – блокирование бактериальных молекул агрессии. Таким средством могут являться белки теплового шока с молекулярной массой 70 кДа, которые могут конкурировать с ЛТК за TLR-рецепторы на клетках-мишенях. Внутриклеточные БТШ70 являются универсальной защитой клетки от стрессовых воздействий. Однако, при выходе во внеклеточное пространство экзогенные БТШ70 способны стимулировать неспецифический иммунный ответ.

Целью данной работы явилось изучение протекторного действия БТШ70 на организм животных при моделировании у них грамположительного сепсиса.

Предварительное введение БТШ70 оказывает выраженное защитное действие и уменьшает токсические эффекты ЛТК. Выживаемость животных увеличивается с 50% в группе с ЛТК до 90% в группе, животные в которой предварительно получали БТШ70. Введение БТШ70 за 10 минут до ЛТК предотвращает паление артериального давления, депрессию гемокоагуляции и нарушения в фибринолитической системе. Введение БТШ70 здоровым животным не оказывает влияния на изучаемые параметры крови.

Таким образом, можно сказать, что БТШ70 является перспективным антисептическим средством и может быть рекомендован для дальнейшего изучения.

ВЛИЯНИЕ АНАЛОГА АВП(6-9) – Ac-L-MPRG – НА ДЕПРЕССИВНЫЕ СОСТАВЛЯЮЩИЕ ПОВЕДЕНИЯ БЕЛЫХ КРЫС

Синюшин А.А., Белякова А.С., Воскресенская О.Г., Каменский А.А.

МГУ им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Ленинские горы, 1, стр.12

E-mail: alixletter@yandex.ru

Ноотропное действие аргинин-вазопрессина (АВП) было продемонстрировано в различных поведенческих тестах на животных разных видов и в настоящее время не вызывает сомнения. Под действием пептидаз АВП распадается в организме на несколько линейных фрагментов, включающих с 4-го по 9-ый аминокислотные остатки. На основании конформационного анализа был синтезирован тетрапептид N-Ac-L-Met-Pro-Arg-Gly-NH2 (Ac-L-MPRG). Нами исследовалось влияние острого введения Ac-L-MPRG на ориентировочно-исследовательское поведение, уровень тревожности и степень депрессивности белых крыс. Препарат вводили интраназально в объеме 1 мкл/10 г массы тела за 5 мин до тестирования в дозе 10,0 мкг/кг. Контрольным животным вводили эквивалентный объем растворителя.

Ac-L-MPRG не оказывал влияния на ориентировочно-исследовательское поведение и уровень тревожности животных, однако обладал выраженным антидепрессантным действием. В тесте «принудительное плавание» введение Ac-L-MPRG оказало влияние практически на все исследуемые показатели. Было зарегистрировано достоверное увеличение как продолжительности первого периода активного плавания, так и суммарного времени активного плавания; увеличение суммарного времени и средней продолжительности периода пассивного плавания; суммарное время иммобилизации и количество ее периодов снижалось.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что замена аминокислотного остатка Cys6 в молекуле АВП(6-9) на L-Met привела к потере влияния пептида на ориентировочно-исследовательское поведение и уровень тревожности животных, однако этот тетрапептид обладал выраженным антидепрессантным действием.

Работа выполнена в рамках соглашения о научно-техническом сотрудничестве между ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» и кафедрой физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова и при поддержке ФЦП «Научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (ГК №П1057).

ИНТРАНАЗАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ ИНСУЛИНА ВОССТАНАВЛИВАЕТ ДОЛГОВРЕМЕННУЮ ПАМЯТЬ У КРЫС С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-го ТИПА

Сухов И.Б., Чистякова О.В., Шипилов В.Н., Бондарева В.М., Шпаков А.О.

Учреждение РАН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223 С.-Петербург, пр. Тореза, 44

E-mail: suhov_ivan88@mail.ru

Инсулин регулирует метаболические и ростовые процессы не только в периферических тканях, но и в ЦНС. Нарушения в инсулиновой сигнальной системе, возникающие при сахарном диабете 2-го типа (СД2), для которого характерна резистентность тканей к инсулину, вызывают нейродегенеративные процессы в ЦНС, что является причиной развития когнитивного дефицита. Цель работы состояла в изучении влияния интраназально введенного инсулина на формирование и сохранение пространственной памяти у крыс с неонатальной моделью СД2. Для изучения когнитивных функций был использован водный тест Морриса, который позволяет быстро провести обучение животных, оценить формирование и консолидацию у них пространственной памяти. Интраназальное введение инсулина (ежедневно, 0.48 IU на крысу) начинали за неделю до обучения и продолжали в процессе тестирования. Для проверки формирования пространственной памяти тест повторяли ежедневно на протяжении 5 дней (1-ая серия) и через месяц оценивали консолидацию пространственной памяти (2-ая серия). Диабетические животные в 1-ой серии затрачивали на поиск платформы в два раза больше времени, чем контрольные крысы. Во 2-ой серии и латентный период и динамика снижения его продолжительности у диабетических крыс были в 3–4 раза ниже, чем в контроле. Эти данные указывают на ухудшение показателей пространственной памяти у крыс с СД2. Интраназальное введение инсулина диабетическим крысам в три раза сокращало латентный период в обеих сериях экспериментов. Это свидетельствует о том, что интраназальное введение инсулина улучшает показатели долговременной пространственной памяти у диабетических крыс, приближая их к таковым у здоровых животных. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что крысы с неонатальным СД2 могут быть использованы в качестве перспективной модели для изучения процессов формирования памяти в условиях толерантности к глюкозе, а методически доступный интраназальный способ введения инсулина может быть применен для исследования роли этого гормона и других полипептидных гормонов в функционировании ЦНС.

Работа поддержана Программой «Фундаментальные науки – медицине» (2009–2011 гг.) и РФФИ (проект № 09-04-00746).

ВЛИЯНИЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ НА КАТАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФЕРМЕНТОВ

Тихоненко С.А.[1], Шабарчина Л.И.[1], Сабурова Е.А.[1], Аполонник Н.В.[2]

[1]Учреждение РАН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 3
[2]МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.3

E-mail: tsa83@rambler.ru

Изучение взаимодействия ферментов с полиэлектролитами имеет огромное прикладное значение для биотехнологии, медицины, так и фундаментальное значение для понимания механизмов внутриклеточной регуляции, биологических феноменов выживания организмов и происхождения некоторых патологических явлений в высших организмах.

Целью настоящей работы было исследовать влияние полиэлектролитов, различных по знаку заряда и структуре мономера на каталитические и структурные свойства уреазы и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) для выявления параметров ферментов, определяющих их способность к комплексообразованию со структурными компонентами клеток, а также для выявления условий сохранения их функций в этих комплексах.

Показано, что из четырех исследованных нами полиэлектролитов – двух отрицательно заряженных – полистиролсульфонат (ПСС) и декстрансульфат (ДС), и двух положительно – полиаллиламингидрохлорид (ПАА) и полидиаллилдиметиламмонийхлорид (ПДАДМАХ), только ПАА является сильным ингибитором уреазы: 0,5 мкг/мл ПАА вызывает 50% ингибирование фермента при нейтральных значениях pH. При этом методами собственной флуоресценции белка и методом кругового дихроизма показано, что ингибирование уреазы в комплексе с ПАА не ведет к разрушению α-спиральной структуры. Кроме того, показано, что ингибирование уреазы полиэлектролитом ПАА обратимо и это ингибирование снимается в растворах соли, при этом механизм снятия ингибирования у одновалентных и двухвалентных солей отличался.

В случае с ЛДГ сильным ингибитором фермента является ПСС, При этом ингибирование сопровождалась разрушением вторичной структуры фермента. Однако в присутствии солей при комплексообразовании ингибирование фермента снижается. Рост активности может быть объяснен ослаблением электростатических взаимодействий между заряженными группами белка и ПЭ за счет экранирования зарядов противоионами соли. Об основном вкладе электростатических взаимодействий в этот эффект свидетельствует совпадение кривых для моно- и дивалентных солей, если их представить как функцию от ионной силы.

РЕДОКС-СТАТУС ГЛУТАТИОНА КАК ПОКАЗАТЕЛЬ АДАПТАЦИОННЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ

Хаертдинова Л.Р., Сибгатуллина Г.В., Румянцева Н.И.

Учреждение РАН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111 Казань, ул. Лобачевского, 2/3

E-mail: nigmatullinalili@mail.ru

В животных клетках трипептид глутатион играет роль окислительно-восстановительного буфера и отношение содержания его восстановленной формы к окисленной форме (показатель GSH/GSSG) отражает изменение редокс-статуса клеток и является индикатором стресса. В нормальных условиях (при отсутствии стресса) этот показатель значительно смещен в сторону восстановленной формы. В своей работе мы попытались оценить возможность использования редокс-статуса глутатиона для оценки адаптационной возможности каллусных культур с разной морфогенной способностью при индукции окислительного стресса. Окислительный стресс индуцировали введением в среду культивирования клеток 3-амино-1,2,4-триазола (АТ) – специфического ингибитора каталазы – основного фермента, разрушающего пероксид водорода. Каллусные культуры гречихи татарской выращивали на среде с ингибитором в течение 7 сут.

Проведенные исследования показали, что общее содержание глутатиона в неморфогенном каллусе (НК) было несколько большим, чем в МК. Однако в НК преобладала окисленная форма глутатиона, т.е. соотношение GSH/GSSG всегда было ниже 1, а в морфогенном каллусе (МК) соотношение GSH/GSSG колебалось от 1.5 до 2.5. При воздействии АТ общее содержание глутатиона в обеих культурах снижалось уже через 1 сут культивирования, а его увеличение наблюдали только на 7 сут культивирования. При этом увеличение общего глутатиона в НК было меньше максимального значения в контроле, а в МК – выше, чем в контроле. Влияние АТ выражалось также в снижении показателя GSH/GSSG в обеих культурах уже через 1 сут культивирования. Но при дальнейшем культивировании, если в НК этот показатель падал к 3 сут почти до 0, то в МК он увеличивался до 2.5, что коррелировало в МК с ранней активацией глутатионредуктазы (на 1–3 сут). Некоторое увеличение соотношения GSH/GSSG в НК на 7 сут культивирования (до 0.5), вероятно, было обусловлено как активацией синтеза глутатиона, так и значительным увеличением активности глутатионредуктазы (возможно вследствие синтеза нового изофермента). Следует подчеркнуть, что содержание окисленной формы глутатиона в НК всегда было выше восстановленной формы, как в контроле, так и в опыте. В МК, напротив, как в контроле, так и в опыте, содержание восстановленной формы глутатиона превышало окисленную. Принимая во внимание данные по жизнеспособности, которая снизилась в НК за 7 сут культивирования на 20%, тогда как в МК – всего на 10%, можно утверждать, что изменение редокс-статуса глутатиона отражает адаптационные возможности культуры и согласуется с ранее полученными данными о большей чувствительности неморфогенных культур к различным стрессовым факторам.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 09-04-97039-р_Поволжье_а).

АКТИВНОСТЬ ЦИТОХРОМ *С* ОКСИДАЗЫ И УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СУБЪЕДИНИЦ *COX* I И COX *IV* В БЕЛЫХ МЫШЦАХ АТЛАНТИЧЕСКИХ ЛОСОСЕЙ (*SALMO SALAR* L.) РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТОВ

Чурова М.В., Мещерякова О.В., Немова Н.Н.

Учреждение РАН Институт биологии КарНЦ РАН, 185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

E-mail: mchurova@yandex.ru

Цитохром *с* оксидаза (ЦО) – важнейший фермент дыхательной цепи митохондрий, состоит из 13 субъединиц: 3 основных каталитических (*COX* I, II, III), кодируемых митохондриальным геномом, и 10 минорных, которые кодируются ядерным геномом. Предположительно функции ядерных субъединиц связаны с регуляцией активности цитохром *с* оксидазы, а также определяют тканевую специфичность фермента. В частности, субъединица IV является необходимой для сборки структуры и аллостерической регуляции активности фермента. В связи с этим, большой интерес представляет собой изучение механизма регуляции активности фермента на уровне экспрессии генов различных субъединиц.

Исследовали уровень экспрессии генов митохондриальной субъединицы I (*COX* I), ядерной субъединицы IV (*COX* IV) и уровень активности ЦО в белых мышцах лососей различных возрастов (0+, 1+, 2+). Показано, что с возрастом снижались активность ЦО и уровень экспрессии мРНК *COX* IV, а уровень экспрессии гена каталитической субъединицы *COX* I не изменялся. Взаимосвязь активности ЦО с экспрессией мРНК *COX* IV была сильнее, чем с мРНК *COX* I, при этом значение коэффициента корреляции увеличивалось с возрастом лососей. Эти наблюдения позволяют сделать предположение о том, что одним из механизмов регуляции активности цитохромоксидазы является изменение уровня экспрессии ядерных субъединиц, в частности субъединицы IV (*COX* IV), при этом с возрастом роль этого способа регуляции возрастает.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ НШ-3731.2010.4, РФФИ № 11-04-00167_а, проекта программы ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.».

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕМОСТИМУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ «СТЕМОКИНА®» И ЕГО АНАЛОГА НА ОСНОВЕ 2,5-ДИКЕТОПИПЕРАЗИНА

Шевченко А.С.[1], Лузянина А.А.[1], Семин Ю.А.[1], Изместьева О.С.[1], Жаворонков Л.П.[1], Дейгин В.И.[2]

[1]*Федеральное государственное бюджетное учреждение МРНЦ Минздравсоцразвития РФ, 249032 Обнинск, Московская обл., ул. Королёва, 4*
[2]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

E-mail: ashevchenko87@mail.ru

Проведен сравнительный анализ влияния на гемопоэз двух пептидных соединений: фармакопейного препарата «Стемокин®» – трипептид Ile-Glu-Trp и созданного на его основе циклического производного 2,5-дикетопиперазина - cyclo{Glu(IleNH2)-Glu(Trp)}. Биологическую активность пептидов определяли в тесте селезёночных экзоколоний (КОЕ-С) в двух экспериментальных моделях: 1 – на облучённых *in vitro* клетках костного мозга с последующим их введением облученным реципиентам для определения радиомодифицирующих свойств; 2 – в модели *in vivo* определяли активность соединений по отношению к костному мозгу интактных мышей. Животные получали препараты внутрибрюшинно, перорально, подкожно и внутривенно, в диапазоне доз 10–10000 мкг/кг (0,2–200 мкг/мышь). Результаты экспериментов свидетельствуют, что циклический пептид в широком диапазоне доз ослабляет повреждающее действие радиации на КОЕ-С при введении его мышам-реципиентам как внутрибрюшинно, так и перорально вслед за облученным in vitro костным мозгом. «Стемокин®», для которого также характерно радиотерапевтическое действие, обладает более узким диапазоном эффективных доз, при этом стимулирует восстановление клеток костного мозга только при парентеральном введении. При введении циклопептида интактным донорам за 48 часов до извлечения костного мозга регистрируется выраженная стимуляция популяции КОЕ-С как при инъекционном, так и при per os введении, в отличие от «Стемокина®», который не влияет на костный мозг интактных животных и стимулирует восстановления гемопоэза только после воздействия повреждающих факторов. В работе показано что циклические аналоги обеспечивают стабилизацию линейных предшественников без потери функциональных свойств. Высокая стабильность производных 2,5-дикетопиперазина делает возможным их пероральное применение, а также позволит изучить спектр их действия на систему кроветворения при различных путях введения в организм.

Секция 6

Взаимосвязь структура – функция. Механизмы действия

НЕОБХОДИМОСТЬ ВЗАМОДЕЙСТВИЯ РИБОСОМНОГО БЕЛКА L25 С 5S рРНК ДЛЯ РАБОТЫ БАКТЕРИАЛЬНОГО АППАРАТА ТРАНСЛЯЦИИ

Аникаев А.Ю., Коробейникова А.В., Корепанов А.П., Никонов С.В., Гарбер М.Б., Гонгадзе Г.М.

Учреждение РАН Институт белка РАН, 142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 4

E-mail: anikaev.al@rambler.ru

Рибосомный белок L25 и его гомологи являются особенностью рибосом бактерий. Отсутствие этого белка в рибосоме *Escherichia coli* приводило к снижению эффективности ее функционирования. По совокупности биохимических и кристаллографических данных белок L25 взаимодействует в рибосоме только с двумя молекулами – 5S рРНК и белком L16. Ранее нами было изучено взаимодействие данного белка с 5S рРНК *in vitro*. Было показано, что белок с одиночной заменой (Y31A или H88F) в его РНК-связывающем модуле не образовывал комплекса с изолированной 5S рРНК. Мы решили проверить, будут ли такие мутантные формы белка L25 встраиваться в рибосому *in vivo*. Соответствующие изменения были внесены непосредственно в хромосомный ген белка. Оказалось, что клетки мутантных и контрольного штаммов не отличаются по скорости роста, а мутантные формы белка L25 эффективно встраиваются в рибосому *in vivo*. Вероятно, одиночные изменения в РНК-связывающем модуле белка L25 не полностью исключили его взаимодействие с 5S рРНК в рибосоме. Для создания стерического препятствия, исключающего образование плотного контакта между белком L25 и 5S рРНК в рибосоме, мы внесли несколько массивных аминокислотных остатков в область взаимодействия этого белка с РНК. Оказалось, что одно из внесенных изменений в белок L25 (S17L/Y31L/H88F) по эффекту на рост клеток и функционирование аппарата трансляции было сравнимо с нокаутом гена данного белка (ΔL25 штамм). Другая мутантная форма белка (S17L/I29F/D90Y) оказывала меньший эффект на рост клеток и обнаруживалась в рибосоме. Однако высокие концентрации этих мутантных форм белка при экспрессии их генов *in trans* в клетках ΔL25 штамма значительно восстанавливали рост клеток. При этом обе мутантные формы белка обнаруживались в рибосоме, но слабо удерживались в ней. Таким образом, впервые продемонстрирована необходимость специфического контакта белка L25 с 5S рРНК для функционирования бактериальной рибосомы в клетке.

Работа поддержана грантом РФФИ № 08-04-00459-а и Программой «Молекулярная и клеточная биология» РАН.

АГРЕГАЦИЯ БЕЛКОВ, ИНДУЦИРУЕМАЯ АМФИФИЛЬНЫМИ ПЕПТИДАМИ

Артемова Н.В., Штейн-Марголина В.А., Гурвиц Б.Я.

Учреждение РАН Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,
119071 Москва, Ленинский просп. 33, к.2

E-mail: ximikk@gmail.com

Исследования молекулярных механизмов взаимодействия пептидов с нативными или развернутыми в денатурирующих условиях белками и образования надмолекулярных структур, обладающих биологической активностью, становятся особенно актуальными при решении медицинских и биотехнологических задач.

В настоящей работе на основании изучения кинетики агрегации нативной дрожжевой алкогольдегидрогеназы, а также α-лактальбумина коровьего молока и лизоцима куриного яйца, денатурированных дитиотреитолом, с использованием методов динамического лазерного светорассеяния, турбидиметрии, флуориметрии и спектрометрии кругового дихроизма обнаружен феномен агрегации белков, индуцируемой амфифильными лигандами. При исследовании кинетики дитиотреитол-индуцированной агрегации модельных белковых субстратов показано, что в присутствии амфифильных лигандов происходит ускорение процесса агрегации. Данный эффект проявляется, главным образом, в значительном сокращении продолжительности лаг-периода. Показано торможение лиганд-индуцируемой агрегации белков в присутствии известного шапероноподобного белка α-кристаллина, а также аргинина.

С помощью электронной и атомно-силовой микроскопии показано, что при агрегации α-лактальбумина и лизоцима, индуцированной под действием противоположно заряженных пептидов Arg-Phe и Asp-Phe соответственно, происходит образование надмолекулярных структур, состоящих из глобулярных частиц диаметром 2–5 нм, способных выстраиваться в нитевидные цепочки длиной около 200 нм. В отсутствие пептидов наблюдалось формирование лишь аморфных агрегатов (20–50 нм).

Полученные данные, затрагивающие молекулярные механизмы агрегации белков, индуцируемой амфифильными низкомолекулярными пептидами, могут быть использованы при разработке эффективных добавок с целью оптимизации процесса рефолдинга рекомбинантных белков, а также при формировании белковых наноструктур с заданными свойствами.

Работа поддержана программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 11-04-00932-а), а также ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (государственный контракт № 02.740.11.0765).

КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ АРХЕЙНОГО ФАКТОРА ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ 2 С ФРАГМЕНТОМ мРНК

Архипова В.И., Столбоушкина Е.А., Никонов О.С., Никонов С.В., Гарбер М.Б.

Учреждение РАН Институт белка РАН, 142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 4

E-mail: avalenti@rambler.ru

У эукариот и архей гетеротримерный фактор инициации трансляции 2 (e/aIF2αβγ) в ГТФ-связанной форме доставляет инициаторную метионил-тРНК на рибосому. Кроме того, e/aIF2 способен связывать мРНК. В эукариотических клетках с мРНК взаимодействует β-субъединица eIF2. Архейный фактор инициации трансляции 2 тоже способен образовывать комплекс с мРНК, но только посредством γ-субъединицы. При этом aIF2γ связывается с 5'-концом мРНК и защищает такие мРНК от 5'-3' направленной деградации. Нами ведутся исследования фактора инициации трансляции 2 из гипертермофильной археи *Sulfolobus solfataricus*.

Центральная γ-субъединица aIF2 является G-белком, и ее домен I (или G-домен) содержит нуклеотид-связывающий сайт, с которым могут связываться либо ГТФ, либо ГДФ. В нашей лаборатории был обнаружен второй (неканонический) сайт связывания ГТФ на поверхности домена II aIF2γ. Мы предполагаем, что обнаруженный нами неканонический сайт связывания ГТФ может являться местом взаимодействия белка с 5'-концом мРНК, потому что в наших экспериментах ГТФ и мРНК конкурируют между собой за связывание с γ-субъединицей aIF2.

Кристаллизация и определение структуры комплекса aIF2γ с мРНК позволят выявить расположение цепи мРНК относительно белка и ответить на вопрос, является ли дополнительный ГТФ-связывающий сайт aIF2γ местом связывания 5'-конца мРНК. Ранее мы уже пытались закристаллизовать комплекс aIF2γ с фрагментом мРНК, но получили только несовершенные микрокристаллы такого комплекса. Поэтому для кристаллизации комплекса с мРНК мы решили использовать мутантные формы γ-субъединицы aIF2, содержащие мутации в области неканонического сайта связывания ГТФ и, тем не менее, способные связывать мРНК. Такое решение было принято, поскольку сами по себе мутантные формы aIF2γ кристаллизуются лучше, чем белок дикого типа. В результате впервые были получены кристаллы комплекса одной из мутантных форм aIF2γ с фрагментом мРНК. Однако кристаллы оказались нестабильными и чувствительными к температуре. В настоящее время, мы оптимизируем условия кристаллизации, чтобы получить стабильные кристаллы комплекса.

Работа финансировалась Программой МКБ РАН.

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ СВОЙСТВ ДОМЕНА I БАКТЕРИАЛЬНОГО РИБОСОМНОГО БЕЛКА L1

Баженова М.В., Корепанов А.П., Костарева О.С., Тищенко С.В., Гарбер М.Б.

Учреждение РАН Институт белка РАН, 142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 4

E-mail: mvbaz@rambler.ru

Рибосомный белок L1 в комплексе со специфическим участком 23S рРНК формирует L1-выступ рибосомы, который способствует высвобождению тРНК из Е-сайта. Кроме того, в *Escherichia coli* белок L1, связываясь со специфическим участком на мРНК, ингибирует трансляцию L11 оперона, в котором находится его собственный ген и ген рибосомного белка L11. Ранее в нашей группе были определены кристаллические структуры двухдоменного рибосомного белка L1 как в изолированном состоянии, так и в комплексе со специфическими фрагментами рРНК и мРНК. На моделях кристаллических структур комплексов видно, что белок L1 взаимодействует с РНК в основном за счет своего первого домена. Был получен первый домен белка L1 из *Thermus thermophilus* и определена его пространственная структура как в изолированном состоянии, так в комплексе со специфическим фрагментом мРНК. Целью данной работы является исследование регуляторных свойств домена I рибосомного белка L1 в системе *in vivo*.

Был получен штамм *E.coli*, в котором отсутствует ген белка L1 (ΔL1 штамм) В хромосоме данного штамма находится «слитый» ген, состоящий из регуляторной области L11 оперона и репортерного гена β-галактозидазы. Таким образом, мы оценивали регуляторные свойства белков L1 по уровню синтеза β-галактозидазы (в условиях регулируемой экспрессии соответствующих генов *in trans*).

Нами было показано, что домен I белка L1 L1 из *E. coli* и *T. thermophilus* как и целый белок, ингибирует синтез репортерного белка, что свидетельствует о способности домена I регулировать *in vivo* экспрессию генов оперона L11 *E.coli*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук и программы МКБ Президиума РАН.

ВЛИЯНИЕ ДЕЗОКСИХОЛАТА НАТРИЯ НА АКТИВНОСТЬ ЛИПАЗЫ *CANDIDA RUGOSA*

Богданова Л.Р., Идиятуллин Б.З., Ермакова Е.А., Зуев Ю.Ф.

Учреждение РАН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111 Казань, ул. Лобачевского, 2/31

E-mail: chemli@mail.ru

Липазы – ферменты, катализирующие гидролиз водонерастворимых субстратов, содержащих сложноэфирную связь и функционирующие на поверхности раздела фаз вода-масло. Существенное влияние на процесс гидролиза оказывают амфифильные соединения, способные образовывать в водных растворах надмолекулярные структуры и модифицировать границу раздела фаз.

В настоящей работе исследовано влияние амфифильного дезоксихолата натрия на активность липазы *Candida rugosa* в реакции гидролиза п-нитрофенилового эфира лауриновой кислоты. Методом триптофановой флуоресценции показано, что в присутствии амфифила происходят изменения структуры фермента. Методом ЯМР-самодиффузии и солюбилизационной емкости показано образование смешанных агрегатов дезоксихолата натрия и субстрата.

На основе анализа температурных зависимостей параметров уравнения Михаэлиса-Ментен для буферного раствора и для растворов дезоксихолата натрия определены константы скорости и энергии активации элементарных стадий каталитической реакции (образование фермент-субстратного комплекса (k1), распад фермент-субстратного комплекса (k_{-1}) и ацилирование фермента (k2)). Установлено, что амфифил оказывает преимущественное влияние на процесс распада фермент-субстратного комплекса, существенно ускоряя его.

СТРУКТУРНОЕ СОСТОЯНИЕ И КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ В РАСТВОРАХ ГЕМИНАЛЬНЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Валиуллина Ю.А., Файзуллин Д.А., Ермакова Е.А., Зуев Ю.Ф.

Учреждение РАН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111 Казань, ул. Лобачевского, 2/31

E-mail: valiullina@mail.knc.ru

Для изучения молекулярных механизмов функционирования ферментов необходимо использование систем, моделирующих их комплексы с различными лигандами. В работе исследовано влияние амфифильных лигандов (алкиламмонийных геминальных поверхностно-активных веществ (ПАВ)), различающихся строением головных групп, длиной спейсерного фрагмента и алкильных радикалов, на структуру и каталитическую активность сериновых протеиназ: трипсина и альфа-химотрипсина. Использовали геминальные ПАВ следующего строения:

$$[CmH2m_{+1}(CH_3)RN^+ - (CH2)_n - N^+R(CH_3)CmH2m_{+1}]\ 2Br^-,$$

где m=10, 12, 16, n= 6, 10, 12, а в качестве R использовались метильные и гидроксиэтильные радикалы.

Каталитическую активность ферментов контролировали по реакции гидролиза специфических субстратов в присутствии различных концентраций геминальных ПАВ. Методом молекулярного докинга определены наиболее вероятные комплексы ферментов с геминальными ПАВ. Определены кинетические параметры исследуемых реакций. Изменение структурного состояния ферментов под действием структурных модификаторов контролировали методами флуоресценции триптофановых остатков и ИК-спектроскопии.

Показано, что при добавлении геминальных ПАВ в случае трипсина наблюдается небольшое ингибирование активности фермента. В случае альфа-химотрипсина наблюдается как ингибирование, так и значительная активация действия фермента в зависимости от строения геминальных ПАВ. Проведенные ИК-спектрометрические исследования показали, что трипсин и альфа-химотрипсин взаимодействуют с молекулами геминальных ПАВ в растворе, что вызывает различные по интенсивности изменения в состоянии белков – от частичной дегидратации до частичной денатурации. Выполнен сопоставительный анализ структурных изменений белков и их каталитической активности и предложена модель действия геминальных ПАВ на структуру и функциональную активность ферментов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 09-03-00778а).

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ РАЗЛИЧНОЙ СТРУКТУРЫ НА СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НА ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ КЛЕТОК МОЗГА

Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Шевченко К.В., Мясоедов Н.Ф.

Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН,
123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2

E-mail: p2@list.ru

Огромный интерес к нейропептидам, возникший еще в прошлом столетии, приобретает сегодня всё большую практическую направленность. Проблема создания высокоэффективных, не вызывающих побочных эффектов лекарственных препаратов на основе пептидных регуляторов становится одним из приоритетных направлений в области биологии и медицины. Несмотря на успешное клиническое применение уже существующих препаратов, механизм действия последних до конца не ясен. Ключевыми моментами данного молекулярного механизма являются протеолиз пептидов в различных биологических средах под действием комплексов протеолитических ферментов, а также специфические взаимодействия регуляторных молекул на плазматических мембранах клеток-мишеней мозга.

В представленной работе было показано влияние ряда синтетических регуляторных пептидов на специфическое связывание радиоактивно меченых эффекторных молекул с их рецепторами. В качестве лигандов были использованы радиоактивно меченые (тритием) соединения: неселективные агонисты CB1 и CB2 рецепторов [^{3}H]CP-55,940 и [^{3}H]WIN 55,212-2, агонист ванилоидных рецепторов дигидрокапсаицин [^{3}H]2HCapsaicin, неселективный агонист дофаминовых рецепторов [^{3}H]Dopamine и ряд других молекул. В качестве исследуемых биологически активных пептидов были использованы синтетические аналоги эндогенных нейропептидов, принадлежащих к нескольким различным группам: глипролины меланокортинового ряда, глипролины (Pro-Gly-Pro, Pro-Gly, Gly-Pro и др.), производные тафтсина (Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro и др.), аналоги нейротензина (Met-Pro-Tyr-Trp-OCH3 и др.), производные дерморфина (Tyr-(D)Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH3, Tyr-Pro-(L,D)Ser и др.), некоторые пептиды, не относящиеся к указанным типам. Представленное исследование является одним из первых шагов на пути к созданию модели, позволяющей охарактеризовать важнейшие межмолекулярные процессы, происходящие на поверхности клеток-мишеней мозга в присутствии биологически активных пептидов.

Работа поддержана Грантом Президента Российской федерации для государственной поддержки молодых российских ученых № МК-282.2011.4.

ХАРАКТЕРИСТИКА ДИВИНИЛЭФИРСИНТАЗЫ LuDES ЛЬНА – НОВОГО ПРЕДСТАВИТЕЛЯ НЕКЛАССИЧЕСКИХ ЦИТОХРОМОВ P450 ПОДСЕМЕЙСТВА CYP74B

Горина С.С., Топоркова Я.Ю., Гоголева Н.Е., Мухтарова Л.Ш., Чечеткин И.Р., Гоголев Ю.В., Гречкин А.Н.

Учреждение РАН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111 Казань, ул. Лобачевского, 2/31

E-mail: luzdeamor@yandex.ru

Ключевое место в растительном липоксигеназном каскаде метаболизма жирных кислот занимают ферменты уникального семейства CYP74 цитохромов P450: алленоксидсинтазы (AOC), гидропероксидлиазы (ГПЛ) и дивинилэфирсинтазы (ДЭС). Результатом их деятельности является образование биоактивных соединений – оксилипинов.

Ранее в листьях льна-долгунца нами были выявлены новые оксилипины, в том числе дивиниловый эфир – (ω5*Z*)-этероленовая кислота, – и было показано, что синтез данного соединения происходит при участии одного из малоизученных ферментов – дивинилэфирсинтаз. Последовательность установленного нами функционального гена ДЭС льна опубликована в базе данных GenBank (идентификационный номер HQ286277.1 (GI: 310687282)). Новый фермент был отнесен к данному подсемейству и получил название LuDES (CYP74B1). Ранее подсемейство CYP74B включало лишь 13-специфичные ГПЛ. Характеристика каталитических свойств рекомбинантного белка подтвердила его принадлежность к ДЭС, но в отличие от большинства изученных ДЭС, обладающих 9-региоспецифичностью, LuDES обладает 13-региоспецифичностью. Для определения гипотетических детерминант катализа LuDES методом биоинформационного анализа был выбран ряд достоверно различающихся аминокислотных остатков в центральном домене I-спирали (IHCD), соответствующем кислород-связывающему домену классических монооксигеназ P450, который, как было ранее нами показано, участвуют не в связывании кислорода, а непосредственно в катализе. Методом сайт-направленного мутагенеза была проведена замена глутаминовой кислоты (E) в 292 позиции на глицин (G), характерный для ГПЛ и AOC. В результате инкубации мутантного фермента LuDES E292G с 13-гидроперекисью α-линоленовой кислоты вместо ожидаемого продукта ДЭС реакции был обнаружен продукт, характерный для ГПЛ реакции.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 09-04-00915-а и ГК 16.740.11.0197.

ИНГИБИРОВАНИЕ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА КОРОТКИМИ ГИДРОКСИПРОЛИН-СОДЕРЖАЩИМИ ПЕПТИДАМИ

Данюкова Т.Н.[1], Биневский П.В.[2], Шрам С.И.[1], Кост О.А.[2]

[1]*Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2*
[2]*МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

E-mail: danyukova_tn@mail.ru

Ферментные гидролизаты различных белков пищи обладают некоторым гипотензивным действием, что может быть связано со способностью содержащихся в них пептидов ингибировать ангиотензин-превращающий фермент (АПФ; КФ 3.4.15.1). При пероральном введении гидролизатов коллагена и желатина в крови обнаруживаются, главным образом, гидроксипролин(Hyp)-содержащие ди- и трипептиды со структурой Xxx-Hyp и Xxx-Hyp-Gly. Однако исследований ингибиторной активности подобных пептидов в отношении АПФ ранее не проводилось. В данной работе мы сравнивали АПФ-ингибиторную активность ряда коротких синтетических пептидов (2-4 а.о.), содержащих на С-конце остаток Pro или Hyp.

Исследования проводили на очищенном ферменте, выделенном из легких быка. Ингибиторную активность пептидов оценивали по их способности замедлять скорость гидролиза синтетического субстрата Hippuryl-His-Leu при 37оС. Показано, что ингибиторная активность пептидов снижается в ряду: Hyp-Gly-Pro>Gly-Pro>Leu-Pro-Gly-Pro>Leu-Pro-Gly-Hyp>Gly-Pro-Pro>Gly-Hyp>Pro-Gly-Pro>*acetyl*-Pro-Gly-Pro>Pro-Pro>Gly-Pro-Hyp>Pro-Gly-Hyp>Pro-Hyp. При этом в концентрации 100 мкМ перечисленные пептиды (за исключением трех последних) подавляли активность АПФ на 25–85%. Нужно отметить, что ингибиторная активность пептидов с С-концевым остатком Pro была всегда выше активности их Hyp-аналогов. Таким образом, в результате проведенного исследования выявлены важные взаимосвязи между АПФ-ингибиторной активностью и структурой пептидов, содержащих остатки Pro и/или Hyp.

Работа выполнена при частичной поддержке проектов РФФИ (гранты №№ 08-04-01760-а и 09-04-13813-офи_ц).

ЦИТОСКЕЛЕТНЫЙ БЕЛОК ЗИКСИН ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С ТРАНСКРИПЦИОННЫМ ФАКТОРОМ Gli1 В РАННЕМ РАЗВИТИИ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ

Ермолина Л.В., Мартынова Н.Ю., Зарайский А.Г.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: lutiklutik@mail.ru

В результате поиска белковых партнёров LIM-доменного цитоскелетного белка зиксина у шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*) при помощи двугибридной дрожжевой системы мы идентифицировали транскрипционный фактор Gli1, являющийся основным эффектором сигнального каскада, запускаемого белками семейства Hedgehog. Данный каскад является одним из ключевых каскадов, контролирующих клеточную дифференцировку в эмбриогенезе. В частности, Hedgehog сигнализация необходима для нормальной дорсо-вентральной регионализации нервной трубки и сомитов. Связывание зиксина с Gli1 в клетках развивающихся эмбрионов лягушки было показано методом ко-иммунопреципитации. Для локализации областей взаимодействия этих белков были созданы делеционные мутанты Gli1 и проанализировано их связывание с тремя LIM-доменами зиксина (455-664 а.о.) в дрожжевой двугибридной системе, соосаждением на глутатион-сефарозе и ко-иммунопреципитацией. В результате установлено, что за связывание с зиксином отвечает область Gli1, содержащая пять доменов типа «цинковые пальцы» (242-415 а.о.). С помощью люциферазной репортерной системы на эмбрионах шпорцевой лягушки мы показали, что зиксин подавляет транскрипционную активность Gli1. Следовательно, зиксин может быть одним из факторов, которые регулируют экспрессию генов – мишеней Hedgehog каскада. Как известно, основная функция зиксина – регуляция динамики актинового цитоскелета и морфогенетических движений клеток. Однако в некоторых случаях зиксин может перемещаться в ядро и модулировать экспрессию специфических генов. Таким образом, можно предположить, что обнаруженное взаимодействие зиксина с Gli1 является звеном механизма координации морфогенетических движений и клеточной дифференцировки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ ГОМОЛОГИЧНЫХ ГОМЕОБОКСОВЫХ ГЕНОВ В ГЕНОМАХ ЧЕЛОВЕКА РАЗУМНОГО, ДОМОВОЙ МЫШИ И ПЛОДОВОЙ МУШКИ С УЧЁТОМ ДНК-СПЕЦИФИЧНОСТИ ГОМЕОДОМЕНОВ

Желтухин Е.И.[1], Сивожелезов В.С.[2], Полозов Р.В.[1]

[1]Учереждение РАН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 3
[2]Учереждение РАН Институт биофизики клетки РАН, 142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 3

E-mail: orthoptera@iteb.ru

На сегодняшний день гомеобоксовые гены обнаружены в геномах всех представителей эукариот. Многие из них имеют по несколько ортологов сходной архитектуры гена, сходного расположения в хромосомах, сходной структуры гомеобокса (гомеодомена). Во многих работах отмечена высокая степень подобия среди гомеобокс-содержащих генных кластеров HOX и POU в геномах мыши и мухи. Для некоторых гомеобоксов установлены паралоги в геномах млекопитающих, членистоногих, нематод, растений и грибов.

В данной работе мы приводим дополненый и обновлёный список гомеобокс-содержащих генов в геномах человека разумного (около 350), домовой мыши (около 350) и плодовой мушки (около 100). С использованием базы данных гомологичных генов/белков HomoloGene (и других баз) найдены паралоги и ортологи аннотированных гомеобоксовых генов.

Анализ доменной архитектуры гомеобоксовых и организации генов в хромосоме (очерёдность, направление, кластеризация генов) выявил аналогичную организацию гомеобоксовых генов в рассматриваемых трёх геномах. Такой анализ позволил логически объединить несколько разноимённых ортологов в подсемейства гомеобоксовых генов со сходной архитектурой и в подсемейства гомеобелков со сходной структурной и функциональной организацией. Нами отмечено много сходного в организации гомеобоксовых генов млекопитающих и членистоногих.

Привлекая данные по классификации гомеодоменов, мы установили, что каждое из рассматриваемых подсемейств гомеодоменов образует белок-белковый (гомеодомен-содомен) комплекс, характерный только для него. Принимая во внимание характер организации многодоменных комплексов на палиндроме ДНК и специфичность гомеодоменов к мотиву нуклеотидов 5`-TNANNN мы сформулировали принцип о непререкрываемости (non-overlapping) областей узнавания.

С привлечением данных по ДНК-мотив-специфичности гомеодоменов и данных о характере образования белковых комлексов гомеодоменов с содоменами можно заключить, что каждая выявленная нами классификационная группа гомеобоксовых генов имеет характерный только для неё гомеодомен и содомены, а значит и специфичность к определённому мотиву ДНК и образуемый ими многодоменный белковый комплекс. На основании этих результатов предложена структурно-функциональная классификация гомеобоксовых генов.

БЕЛОК GP39, КОДИРУЕМЫЙ БАКТЕРИОФАГОМ P23-45 *THERMUS THERMOPHILUS*, ПОДАВЛЯЕТ ИНИЦИАЦИЮ ТРАНСКРИПЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ

Жилина Е.В.[1], Кульбачинский А.В.[1], Минахин Л.С.[2]

[1]*Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2*
[2]*Waksman Institute for Microbiology, Piscataway, NJ 08854, USA*

E-mail: katerina-zhilina@rambler.ru

Бактериофаги – вирусы бактерий, – выработали эффективные механизмы, способные подчинить хозяйскую систему транскрипции своим нуждам и переориентировать ее на экспрессию собственных генов. Одним из способов такой регуляции является экспрессия специальных белков, связывающихся с бактериальной РНК-полимеразой (РНКП) и изменяющих ее транскрипционные свойства. Несмотря на огромное разнообразие бактериофагов, на сегодняшний день в мире известны механизмы действия на РНКП лишь примерно десятка подобных регуляторных белков. В данной работе мы впервые охарактеризовали белок gp39 (молекулярная масса 16,5 кДа), кодируемый бактериофагом P23-45 термофильной бактерии *Thermus thermophilus* и связывающийся с хозяйской РНКП в процессе инфекции. Белок gp39 был клонирован, экспрессирован в клетках *E. coli* и получен в очищенном виде. Показано, что белок gp39 подавляет активность холофермента РНКП *Thermus thermophilus* в тестах по транскрипции *in vitro*. Анализа действия gp39 на разных стадиях транскрипции показал, что он подавляет стадию инициации транскрипции, вероятно, нарушая взаимодействие РНКП с промоторами. Сила ингибирующего действия gp39 зависит от структуры промотора: наибольший эффект наблюдается в случае классических -10/-35 промоторов, и зависит от силы взаимодействия РНКП с промотором, в то время как инициация транскрипции на промоторах с удлиненным -10 элементом подавляется в меньшей степени. Мутации в N- и C-концевых районах сигма-субъединицы не влияют на чувствительность РНКП *T. thermophilus* к белку gp39, в то время как удаление C-концевых доменов альфа-субъединиц РНКП усиливает его действие. Полученные данные показывают, что подавление взаимодействий РНКП с промоторами при помощи достаточно коротких белков является одним из эффективных способов подавления клеточной транскрипции бактериофагами.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (госконтракт № 02.740.11.5132).

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИЙ ДОМЕНОВ ИНСУЛЯТОРНОГО БЕЛКА ДРОЗОФИЛЫ dCTCF

Ивлиева Т.А., Бончук А.Н., Кырчанова О.В.

Учреждение РАН Институт биологии гена РАН, 119334 Москва, ул. Вавилова, 34/5

E-mail: ivlieva.tatiana@gmail.com

Регуляция экспрессии генов высших эукариот обеспечивается специфическими *цис*-регуляторными элементами активирующими (энхансеры) и репрессирующими (сайленсеры) транскрипцию, а также инсуляторами, которые изолируют активные домены экспрессии от репрессированных. dCTCF является одним из белков, обеспечивающих функциональную активность инсуляторов у *Drosophila melanogaster*. В его состав входят 11 цинковых пальцев, которые гомологичны соответствующему домену основного инсуляторного белка позвоночных – CTCF.

С помощью генетических методов нами было показано, что dCTCF необходим для сближения удаленных участков хроматина в ядре, что является характерным свойством инсуляторов. Мутирование сайтов связывания dCTCF в инсуляторах приводит к полной потере их функций. Однако мультиплицированные сайты связывания dCTCF не проявляют изолирующих свойств. Это указывает на существование белковых партнеров dCTCF, необходимых для формирования полноценного инсуляторного комплекса. В настоящее время описан один белок, взаимодействующий с dCTCF – это CP190. CP190 ранее был описан как компонент различных инсуляторных комплексов.

С помощью дрожжевой двугибридной системы мы протестировали dCTCF на способность к гомодимеризации, а также провели скрининг делеционных производных dCTCF для выявления домена, ответственного за это взаимодействие. Для этого был использован штамм pJ694A, имеющий два репортерных гена – *HIS3* под промотором GAL1 и *LacZ* под промотором GAL7. С помощью обоих репортерных генов мы подтвердили способность dCTCF к гомодимеризации и выявили, что за это взаимодействие отвечает N-концевой домен белка. Способность N-концевого домена образовывать димеры была подтверждена методом белок-белковых сшивок.

Аналогичным образом был проведен поиск участка dCTCF, отвечающего за взаимодействие с CP190, и было показано, что за это взаимодействие отвечает C-концевой домен dCTCF. Данный результат был подтвержден с помощью ко-преципитационного анализа (метод GST-pulldown).

Работа выполнена при поддержке программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКОГО АНТИТЕЛА А.17, ГИДРОЛИЗУЮЩЕГО ФОСФОРООРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

Казначеева А.В.[1], Куркова И.Н.[1], Бобик Т.В.[1], Смирнов И.В.[1,2], Пономаренко Н.А.[1], Габибов А.Г.[1,2,3]

[1]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва
[2]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва
[3]Учреждение РАН Институт биологии гена РАН, 119334 Москва

E-mail: avkaznacheeva@gmail.com

Ранее в нашей лаборатории в результате скрининга полусинтетической библиотеки вариабельных фрагментов генов иммуноглобулинов человека с использованием п-нитрофенил 8-метил-8-азабицикло[3.2.1]октан фенилфосфоната, было отобрано рекомбинантное одноцепочечное антитело А.17, ковалентно взаимодействующее с необратимыми ингибиторами сериновых гидролаз. Поскольку данные ингибиторы по механизму действия являются аналогами фосфорорганических токсинов (ФОТ), нами было сделано предположение, что антитело А.17 будет способно их связывать и, в свою очередь, являться матрицей для создания панели мутантов, обладающих улучшенными характеристиками взаимодействия с ФОТ.

На основе анализа кристалла антитела А.17 был проведен сайт-направленный мутагенез, в результате которого была создана панель мутантов, включающая в себя антитела с заменами как в легкой (Ser35Arg, Ser35His, Ser35Glu, Leu47Arg, Leu47His, Gly90Thr, Phe100Tyr), так и в тяжелой (Ile38Lys, Trp100Tyr, Asp106Ala, Asp106Glu) цепях, которые, предположительно, будут обладать улучшенными кинетическими параметрами.

В качестве системы экспрессии антител была выбрана система экспрессии *Pichia pastoris*, поскольку создание репертуара мутантных форм и их экспрессия в культурах клеток млекопитающих представляет собой большую практическую проблему.

На основе созданных в нашей лаборатории универсальных векторов для экспрессии Fab-фрагментов иммуноглобулинов в *P. pastoris* были получены экспрессионные конструкции, содержащие тяжелую и легкую цепи Fab-фрагментов антитела А.17 и панели его мутантов. В результате селекции были отобраны рекомбинантные клоны, эффективно секретирующие Fab-фрагменты соответствующих антител в культуральную среду. Препараты антител были хроматографически очищены и определена их функциональная активность.

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ МИЦЕЛЛ БЕТА-КАЗЕИНА В ВОДНО-ЭТАНОЛЬНЫХ РАСТВОРАХ

Коннова Т.А.[1], Файзуллин Д.А.[1], Захарченко Н.Л.[1], Зуев Ю.Ф.[1], Haertlé T.[2]

[1]Учреждение РАН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111 Казань, ул. Лобачевского, 2/31
[2]Национальный институт агрономических исследований, Нант, Франция

E-mail: ktatiana333@gmail.com

Бета-казеин – один из основных молочных белков. В последнее время, в силу высокой важности мицелл бета-казеина с точки зрения функциональных свойств молочных продуктов, активно изучается их природа и структура. Этанол используется в пищевой промышленности для регуляции свойств и повышения стабильности молочных продуктов, но молекулярные основы этих процессов до сих пор мало исследованы. В данной работе мы приводим результаты структурных исследований (методами флуоресцентной спектроскопии, динамического светорассеяния и кругового дихроизма) бета-казеина в водно-этанольных растворах. Обнаружено, что стабильность коллоидных структур бета-казеина строго зависит от концентрации этанола и температуры. Введение небольшого количества этанола стабилизирует мицеллы бета-казеина, в то время как дальнейшее увеличение концентрации спирта вызывает их дестабилизацию. Показано, что при стабилизирующих концентрациях этанола во вторичной структуре бета-казеина увеличивается содержание бета-слоев, что приводит к образованию более компактного и менее доступного растворителю мицеллярного ядра. Напротив, диссоциирующие концентрации этанола способствуют непосредственному взаимодействию спирта и гидрофобных белковых групп, приводя к мономеризации казеина и вызывая повышение содержания альфа-спиральных структур. Физико-химический анализ водно-этанольных смесей показал, что, будучи макроскопическими растворами, они все же обладают некой структурированностью (клатратная организация), которая зависит от концентрации и температуры, таким образом, определяя качество растворителя. В докладе обсуждается значение данного явления для ассоциативных свойств амфифильных молекул бета-казеина.

РОЛЬ РИБОСОМНОГО БЕЛКА L5 В ФОРМИРОВАНИИ ЦЕНТРАЛЬНОГО ПРОТУБЕРАНЦА БОЛЬШОЙ СУБЧАСТИЦЫ РИБОСОМЫ

Корепанов А.П.[1], Коробейникова А.В.[1], Шестаков С.А.[1], Бубуненко М.Г.[2], Гарбер М.Б.[1], Гонгадзе Г.М.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт белка РАН, Пущино, Московская обл.*
[2]*National Cancer Institute, Фредерик, США*

E-mail: kav-20@rambler.ru

Специфический комплекс 5S рРНК с несколькими рибосомными белками (в *Escherichia coli* – белки L5, L18 и L25) участвует в формировании центрального протуберанца большой субчастицы рибосом всех ныне живущих организмов. Недавно нами было показано, что нокаут гена рибосомного белка L5 летален для бактериальной клетки. Цель данной работы – выяснить, какой эффект оказывает на сборку большой рибосомной субчастицы отсутствие этого белка в клетках *E. coli*. Для этого хромосомный ген белка L5 был нокаутирован в присутствии плазмиды, обеспечивающей регулируемую экспрессию гена этого белка. Оказалось, что в клетках полученного штамма после прекращения синтеза белка L5 появляются дефектные большие рибосомные субчастицы, количество которых со временем увеличивается. Установлено, что эти субчастицы имеют коэффициент седиментации 47S и неспособны ассоциировать с 30S субчастицами. Анализ белкового состава 47S частиц показал, что они лишены не только белка L5, но и других компонентов 5S рРНК-белкового комплекса (5S рРНК, белков L18 и L25). При этом 5S рРНК, белки L18 и L25 присутствуют в цитоплазме исследуемых клеток в форме стехиометрического комплекса. Полученные данные впервые демонстрируют, что *in vivo* рибосомный белок L5 необходим для встраивания в большую рибосомную субчастицу всего 5S рРНК-белкового комплекса. Кроме того, было обнаружено, что в 47S частицах количество белков L16 и L27, которые также являются компонентами центрального протуберанца, сильно редуцировано. Эти данные свидетельствуют о том, что отсутствие 5S рРНК-белкового комплекса в большой субчастице рибосомы приводит к дестабилизации структуры ее центрального протуберанца. Таким образом, *in vivo* белок L5 прямо или опосредованно влияет на формирование целого структурно-функционального домена рибосомы.

Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-01747-а и Программой «Молекулярная и клеточная биология» РАН.

ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТНЫХ ФОРМ $G\alpha_O$ СУБЪЕДИНИЦЫ ГЕТЕРОТРИМЕРНОГО G-БЕЛКА ИЗ ДРОЗОФИЛЫ

Костарева О.С., Тин У.Ф., Тищенко С.В., Гарбер М.Б.

Учреждение РАН Институт белка РАН,
142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 4

E-mail: zelle@rambler.ru

Гетеротримерные G-белки участвуют в системе переноса сигнала от рецепторов, расположенных на поверхности клеток, к эффекторным молекулам в цитоплазме. G-белки состоят из трех субъединиц: Gα, Gβ и Gγ. При взаимодействии с сигнальными рецепторами мембраны эукариотической клетки Gα субъединица связывается с ГТФ, субъединицы диссоциируют и взаимодействуют с эффекторными белками для передачи сигнала.

При исследовании ассиметричного клеточного деления в нейробластах дрозофилы был идентифицирован белок Pins, содержащий GoLoco мотивы и относящийся группе рецептор-независимых регуляторных белков. Недавно были получены данные, свидетельствующие о том, что Pins может служить мишенью в процессе передачи сигнала от связанных с G-белками рецепторов. Такие белки, как правило, взаимодействуют с $G\alpha_o$/ГДФ (неактивной формой белка) и управляют активацией G-белков. Однако в клетках дрозофилы белок Pins может связываться как с $G\alpha_o$/ГДФ формой белка, так и с $G\alpha_o$/ГТФ (активная форма). Необходимым и достаточным для взаимодействия Gαo и Pins является GoLoco1 фрагмент белка Pins. Определение кристаллической структуры $G\alpha_o$/ГДФ, $G\alpha_o$/ГТФ из дрозофилы в свободном состоянии и в комплексе с GoLoco1 доменом белка Pins позволило бы определить молекулярные основы этого взаимодействия.

К настоящему времени мы не смогли получить кристаллы $G\alpha_o$ субъединицы. Поскольку известно, что N-концевая часть белка $G\alpha_o$ в свободном состоянии неупорядочена, мы решили получить четыре мутантные формы белка $G\alpha_o$, в которых отсутствуют 17, 21, 24 и 32 N-концевые аминокислоты. Данные генетические конструкции были получены, белки выделены, ведётся поиск условий их кристаллизации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 11-04-00859) и программы Президиума МКБ РАН.

ЗАМЕНЫ АМИНОКИСЛОТ В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ЙОТА УВЕЛИЧИВАЮТ ТОЧНОСТЬ СИНТЕЗА ДНК

Макарова А.В.

Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН,
123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2

E-mail: amakarova-img@yandex.ru

ДНК-полимераза йота (Pol i) человека – специализированная ДНК-полимераза Y-семейства с самой низкой точностью синтеза среди ДНК-полимераз эукариот. Предполагается, что *in vivo* Pol i может участвовать в репликации и репарации поврежденной ДНК, а также соматическом гипермутагенезе генов иммуноглобулинов. Нарушения регуляции активности Pol i в организме могут быть причиной злокачественных новообразований. Недавно расшифрованые структуры активного центра Pol i позволили предположить возможный механизм катализа высоко ошибочного синтеза ДНК этим ферментом. С помощью методов сайт-направленного мутагенеза мы исследовали роль отдельных аминокислотных остатков активного центра ДНК-полимеразы, образующих контакты с матричной ДНК и встраивающихся дНТФ (Y39, Q59, K60, L62, L62, Y61, L78), а также участвующих в координации ионов металла при катализе (D126, E127). Тестирование эффективности и точности включения дНТФ вариантами ДНК-полимеразы с заменами аминокислотных остатков активного центра позволяет предположить ключевую роль аминокислот Y39 и Q59 в особенностях функционирования Pol i. Показано, что замены Y39 и Q59 на аланин приводят к резкому увеличению точности синтеза ДНК, однако полученный эффект существенно зависит от нуклеотидной последовательности матрицы.

Работа выполнения при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», 2009–2013 гг., госконтракт № П335.

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ НЕКОТОРЫХ СТРУКТУРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ РИБОСОМНОГО БЕЛКА L5 В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ РИБОСОМЫ

Максимова Е.М., Корепанов А.П., Коробейникова А.В., Гарбер М.Б., Гонгадзе Г.М.

Учреждение РАН Институт белка РАН,
142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 4

E-mail: bridgitta2009@yandex.ru

Рибосомный белок семейства L5 бактерий, архей и эукариот имеет консервативную пространственную структуру, что может свидетельствовать об универсальности выполняемых им функций. Он локализован в центральном протуберанце большой субчастицы рибосомы в непосредственной близости от ее функциональных центров. Современные кристаллографические исследования рибосом и их функциональных комплексов выявили несколько межмолекулярных контактов с этим белком. Так, петля β2-β3 белка L5 контактирует с тРНК, расположенной в Р-участке рибосомы. Еще одна петля (α3-β4) этого белка взаимодействует с белком S13, формируя межсубъединичный мостик B1b. Цель данной работы – выяснение роли указанных межмолекулярных контактов рибосомного белка L5 в функционировании рибосомы *E. coli*. Нами был проведен направленный мутагенез соответствующих структурных элементов белка L5, причем изменения вносились непосредственно в его хромосомный ген. Показано, что удаление сразу нескольких аминокислотных остатков в петлях β2-β3 (контакт с тРНК) и α3-β4 (контакт с белком S13) белка L5 приводит к замедлению роста клеток *E. coli*, более того, такие клетки обладают холодочувствительным фенотипом. Таким образом, впервые выявлена важность указанных структурных элементов белка L5 для нормального роста клеток *E. coli*. Более того, делеция четырех или восьми остатков в петле β2-β3 белка приводит к снижению эффективности работы аппарата трансляции. С одной стороны, полный цикл трансляции (инициация, элонгация и терминация) осуществляется рибосомами мутантных и контрольного штаммов приблизительно за одинаковое время. С другой стороны, накопление активного белка в единицу времени в случае мутантных рибосом происходит в два раза медленнее. Учитывая контакт белка L5 с тРНК и полученные нами результаты, можно предположить, что внесенные в петлю β2-β3 изменения приводят к увеличению частоты ошибок трансляции. В настоящее время мы устанавливаем причину сниженной функциональной активности исследуемых рибосом.

Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-01747-а и Программой «Молекулярная и клеточная биология» РАН.

ФУНКЦИИ N-КОНЦЕВОГО РАЙОНА СИГМА-СУБЪЕДИНИЦЫ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ В ИНИЦИАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ

Миропольская Н.А.[1], Игнатов А.В.[2]

[1]*Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2*
[2]*Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.12*

E-mail: acetabularia@yandex.ru

Инициация транскрипции у бактерий осуществляется холоферментом РНК-полимеразы. Для образования холофермента необходимо присоединение к кор-ферменту РНК-полимеразы фактора инициации – сигма-субъединицы. В процессе инициации транскрипции происходит узнавание и связывание промотора, плавление промоторной ДНК, связывание инициаторных нуклеотидов. В ходе инициации синтеза РНК часть коротких транскриптов диссоциирует из комплекса, в то время как РНК-полимераза остается связанной с промотором. Когда РНК достигает длины 10–15 нуклеотидов, РНК-полимераза уходит с промотора и переходит к стадии элонгации транскрипции. Сигма-субъединица участвует во всех этих процессах, однако, ее роль на каждом этапе инициации транскрипции, особенно в процессе ухода РНК-полимеразы с промотора, изучена недостаточно.

РНК-полимеразы разных бактерий различаются по стабильности промоторных комплексов и эффективности ухода с промотора. Как было показано ранее, для РНК-полимераз *E. coli* и *T. aquaticus* эти различия определяются сигма-субъединицей. Предположительно, основной вклад в эти различия вносит N-концевой район сигма-субъединицы, включающий консервативные районы 1.1. и 1.2. Для выяснения роли этих районов в инициации транскрипции мы создали химерные сигма-субъединицы на основе сигма-субъединиц *E. coli* и *T. aquaticus*, где отдельные районы (1.1 и/или 1.2) были заменены на последовательности другой РНК-полимеразы. В результате изучения транскрипционных свойств ферментов, содержащих полученные сигма-субъединицы, было показано, что оба этих района важны для стабилизации промоторных комплексов и эффективного ухода РНК-полимеразы с промотора. Таким образом, N-концевой район сигма-субъединицы, функции и структура которого до настоящего времени во многом были неизвестны, играет важную роль на разных стадиях инициации транскрипции, а межвидовые различия в структуре этого участка могут значительно изменять свойства РНК-полимеразы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых ученых (МД-618.2011.4).

БОКОВОЙ P1-ВЫСТУП АРХЕЙНОЙ РИБОСОМЫ: КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ N-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА РИБОСОМНОГО БЕЛКА P0 С ФРАГМЕНТАМИ ДОМЕНА II 23S рРНК РАЗНОЙ ДЛИНЫ

Митрошин И.В., Кравченко О.В., Габдулхаков А.Г., Никонова Е.Ю., Шкляева А.А., Никонов С.В., Гарбер М.Б.

Учреждение РАН Институт белка РАН,
142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 4

E-mail: ivan-mitroshin@vega.protres.ru

P1-выступ (L12-выступ) является одним из наиболее подвижных и функционально важных участков 50S субчастицы архейной рибосомы. Несмотря на успех в определении кристаллической структуры архейных рибосом, этот рибосомный выступ не удается визуализовать целиком. P1-выступ вовлечен в образование сайта связывания ГТФаз и играет важную роль во взаимодействии рибосомы с факторами трансляции. Этот боковой выступ образован комплексом рибосомных белков P0(L10) и P1(L12) и взаимодействует с доменом II 23S рРНК посредством белка P0.

Наша работа посвящена структурным исследованиям компонентов рибосомного P1-выступа из архей рода Methanococcus. Знание пространственной структуры комплекса рибосомного белка P0 со специфическим фрагментом 23S рРНК позволит уточнить структуру архейной и эукариотической рибосом и детально описать взаимодействие между белком P0 и 23S рРНК.

В прошлом году нами были получены кристаллы комплекса N-концевого фрагмента архейного рибосомного белка P0 с фрагментом 23S рРНК (74 н.о.). На синхротроне в Берлине от этих кристаллов был собран набор дифракционных данных с разрешением 3.2Å. Построена первая модель этого комплекса. Для получения кристаллов комплекса, отражающих рентгеновские лучи с более высоким разрешением, были выбраны фрагменты 23S рРНК различной длины (73 и 76 н.о.). Из литературы известно, что архейный рибосомный белок P0 может связывать специфический участок 23S рРНК из бактерий. В связи с этим был выбран специфический фрагмент 23S рРНК длиной 78 н.о. из гипертермофильной бактерии *Thermus thermophilus* для попытки улучшения качества кристаллов. В настоящее время получены первые кристаллы комплексов фрагментов 23S рРНК (73 и 76 н.о.) с N-концевым фрагментом белка P0.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и грантом РФФИ (№ 11-04-00327-а).

СВОЙСТВА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА ОКТАРФИНА

Некрасова Ю.Н., Садовников В.Б., Наволоцкая Е.В.

Филиал Учреждения РАН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290 Пущино, Московская обл., просп. Науки, 6

E-mail: nekr-jul@mail.ru

Известно, что эндогенный нейропептид, β-эндорфин, взаимодействует с опиоидными (μ и δ) и неопиоидными, нечувствительными к опиоидному антагонисту налоксону рецепторами. До настоящего времени структура и функции последних остаются малоизученными.

Нами был определен фрагмент β-эндорфина наименьшей длины, способный с высоким сродством связываться с неопиоидным рецептором. Им является синтетический пептид TPLVTLFK (авторское название – октарфин), соответствующий последовательности 12-19 молекулы β-эндорфина.

Получен меченный тритием октарфин ([^{3H}]октарфин, уд. активность 28 Ки/моль) и изучено его связывание с перитонеальными макрофагами мыши. Установлено, что [^{3H}]октарфин связывается с макрофагами с высоким сродством (Kd=2,3±0,2 нМ) и специфичностью: специфическое связывание [^{3H}]октарфина с макрофагами ингибировали немеченые β-эндорфин и селективный агонист неопиоидного рецептора β-эндорфина синтетический пептид иммунорфин (SLTCLVKGFY) (Ki 2,7±0,2 и 2,4±0,2 нМ) и не ингибировали немеченые налоксон, α-эндорфин, γ-эндорфин и [Met5]энкефалин (Ki>10 мкМ).

Показано, что октарфин стимулирует активность иммунокомпетентных клеток мыши *in vitro* и *in vivo*. При концентрации 1–10 нМ он увеличивает адгезию и распластывание перитонеальных макрофагов, а также повышает их способность переваривать бактерии вирулентного штамма *Salmonella typhimurium* 415 *in vitro*. Внутрибрюшинное введение пептида (в дозе 20 мкг на животное за 7, 3 и 1 сутки до выделения клеток) приводило к возрастанию активности перитонеальных макрофагов, а также Т- и В-лимфоцитов селезенки.

Полученные данные указывают на то, что действие октарфина опосредовано через неопиоидный рецептор β-эндорфина. Следовательно, участок 12-19 молекулы β-эндорфина обеспечивает связывание с неопиоидным рецептором и передачу сигнала в клетку.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКА-АДАПТЕРА TRIP8b С КЛАТРИНОМ

Попова Н.В., Деев И.Е., Петренко А.Г.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: popova@ibch.ru

TRIP8b – цитоплазматический белок мозга, содержащий тетратрикопептидные повторы (TPR). Он был обнаружен в результате поиска белков, взаимодействующих с малой ГТФазой Rab8b. Позже было показано, что TRIP8b взаимодействует с двумя мембранными белками: HCN каналом и G-белоксопряжённым рецептором CIRL. Во всех случаях взаимодействие было опосредовано TPR-доменом TRIP8b.

Чтобы определить функцию TRIP8b, мы провели дополнительный поиск связывающихся с ним белков. Оказалось, что клатрин и субъединицы адаптерного комплекса AP-2 являются мажорными белками в элюатах с TRIP8b-Сефарозы. Анализ аминокислотной последовательности TRIP8b выявил два потенциальных сайта связывания с тяжёлой цепью клатрина – DLLDL и LDLD. Эксперименты по связыванию очищенного клатрина и мутантов TRIP8b, в которых аминокислотные остатки этих сайтов были заменены остатками аланина, подтвердили, что такая замена приводит к нарушению связывания TRIP8b с клатрином.

При экспрессии в клетках эукариот TRIP8b вызывает перемещение HCN1 канала с клеточной мембраны в крупные внутриклеточные структуры, в которых также находятся TRIP8b и клатрин. С помощью внутриклеточных маркеров мы установили, что эти структуры являются лизосомами, но некоторая их часть локализуется с маркером ранних эндосом. Мутации сайтов связывания с клатрином в молекуле TRIP8b не блокируют эндоцитоз HCN1, но приводят к исчезновению в этих структурах клатрина. Полученные данные указывают на независимое взаимодействие TRIP8b с клатрином и HCN1, так как это взаимодействие обеспечивается разными частями молекулы белка: с каналом TRIP8b взаимодействует TPR-содержащей C-концевой частью, а с клатрином – с помощью двух сайтов, расположенных в N-конце молекулы.

Полученные нами данные позволяют предположить, что TRIP8b участвует в нейрональном эндоцитозе путём независимого взаимодействия с мембранными белками и компонентами оболочки клатрин-покрытых пузырьков.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 09-04-01644-а), Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки − медицине», Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», NIH Fogarty grant 5 RO3 TW007210.

ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ ХРОМОСОМНОГО БЕЛКА HMGB1 ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С ДНК КАК ОСНОВА МНОГООБРАЗИЯ ВЫПОЛНЯЕМЫХ ИМ ФУНКЦИЙ

Родионова Т.Ю.[1,2], Чихиржина Е.В.[2], Поляничко А.М.[1,2]

[1]*Физический факультет СПбГУ,*
198504 С.-Петербург, Старый Петергоф, ул. Ульяновская, 1
[2]*Учреждение РАН Институт цитологии РАН, 194064 С.-Петербург, Тихорецкий пр., 4*

E-mail: tatirod9@gmail.com

Структурная организация ДНК-белковых и белок-белковых комплексов зачастую определяет их функциональное назначение и играет ключевую роль в функционировании хроматина. На фоне широкой распространённости HMGB-мотива до сих пор остаётся до конца невыясненной как природа большого разнообразия выполняемых белком функций, так и механизмы взаимодействия белка с ДНК. Мы предполагаем, что разнообразие функций, выполняемых HMGB-доменным белками, может быть связано со способностью белка по-разному изменять вторичную структуру в зависимости от мишени связывания.

С помощью сочетания разнообразных физико-химических методов (круговой дихроизм (КД), поглощение в УФ диапазоне, спектрофотометрическое плавление) мы проследили за изменениями в структуре белка HMGB1 при взаимодействии с плазмидной ДНК pUC19 и высокомолекулярной ДНК тимуса теленка. Основываясь на данных КД и спектрофотометрического плавления, мы предложили модель структурной адаптации HMGB1 к особенностям вторичной структуры ДНК в месте связывания. Согласно нашей модели взаимодействие HMGB1 с высокомолекулярной ДНК тимуса теленка характеризуется наличием двух механизмов связывания – кооперативного посредством двух доменов с изменением вторичной структуры А-домена белка и некооперативного посредством одного домена без изменения вторичной структуры белка. Анализ кривых плавления ДНК-HMGB1 комплексов позволил оценить размер участка связывания HMGB1 с ДНК, который в случае кооперативного механизма взаимодействия составил 18 п.о., а в случае некооперативного связывания – в 9 п.о. Было также показано, что увеличение содержания белка приводит к увеличению термостабильности ДНК в комплексе.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты №№ 09-08-01119, 10-04-00092) и Правительства Санкт-Петербурга. Часть работ проводилась в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.

ОЦЕНКА ШАПЕРОНОПОДОБНОЙ АКТИВНОСТИ α-КРИСТАЛЛИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-СИСТЕМЫ, ОСНОВАННОЙ НА АГРЕГАЦИИ ОБЛУЧЕННОГО УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫМ СВЕТОМ БЕЛКОВОГО СУБСТРАТА

Роман С.Г.[1,2], Чеботарева Н.А.[1], Еронина Т.Б.[1], Макеева В.Ф.[1], Клейменов С.Ю.[1], Филиппов Д.О.[2], Курганов Б.И.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт биохимии им. А.Н. Баха, 119071 Москва, Ленинский просп., 33*
[2]*Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.2*

E-mail: svetabaj@gmail.com

Для испытания шаперонoподобной (антиагрегационной) активности белкового шаперона, α-кристаллина, предложена тест-система, основанная на агрегации УФ-облученной мышечной гликогенфосфорилазы *b* (Ph*b*; КФ 2.4.1.1). Эта тест-система удобна для изучения процессов агрегации тем, что под действием ультрафиолетового света Phb денатурирует, и мы имеем возможность изучать влияние шаперона исключительно на последующий процесс агрегации денатурированного белка. Поскольку в живой клетке все процессы протекают в условиях молекулярного краудинга (исключенного объема), представляет интерес изучение влияния краудинга на шаперонoподобную активность α-кристаллина.

Методом динамического светорассеяния показано, что при УФ-облучении Phb образуются белковые агрегаты со средним значением гидродинамического радиуса 10,4 нм. При комнатной температуре эти агрегаты стабильны в течение достаточно длительного времени. Повышение температуры стимулирует дальнейшую агрегацию УФ-облученной Phb, однако α-кристаллин ее подавляет. В условиях молекулярного краудинга, создаваемого высокими концентрациями полиэтиленгликоля с молекулярной массой 20000 Да, триметиламин N-оксида или Фиколла 70, увеличивается скорость агрегации УФ-облученной Phb. Показано, что с повышением концентрации краудинг-агентов шаперонoподобная активность α-кристаллина заметно ослабевает.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 11-04-01271-а, 11-04-00932-а) и программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

САМООРГАНИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ШАПЕРОНА GroEL/GroES *IN VITRO*: ОТ КЛУБКА ДО ОЛИГОМЕРА

Рябова Н.А., Марченков В.В., Марченкова С.Ю., Котова Н.В., Семисотнов Г.В.

Учреждение РАН Институт белка РАН,
142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 4

E-mail: nina@vega.protres.ru

Белки теплового шока клеток *Escherichia coli* GroEL (Hsp 60) и GroES (Hsp 10) являются представителями семейства молекулярных шаперонов, принимающих участие в правильном сворачивании и олигомеризации различных белков как *in vivo* так и *in vitro*. Вместе с тем, многие шапероны сами по себе являются сложными олигомерными образованиями. В частности, GroEL и GroES состоят из 14 и 7 идентичных субъединиц соответственно, объединенных в специфические кольцевые структуры. Таким образом, ответ на вопрос, каким образом самоорганизуются молекулярные шапероны, в частности, GroEL и GroES, представляет особый интерес. В настоящей работе исследованы равновесные и кинетические процессы денатурации и ренатурации GroEL и GroES, а также влияние на эти процессы белковых лигандов и внешних условий (ионной силы и концентрации глицерина). Показана достоверность того, что самоорганизация GroES *in vitro* происходит спонтанно и не требует никаких дополнительных факторов. В противоположность этому, самоорганизация GroEL на стадии олигомеризации является лиганд-зависимой, а ее эффективность зависит от природы лигандов (АДФ или АТФ или GroES) и ионной силы раствора (наиболее эффективен сульфат аммония). На стадии формирования свернутой мономерной формы GroEL (т.е. сворачивания субъединиц) лиганды и ионная сила раствора не являются необходимыми. Кроме того, показана определяющая роль ко-шаперона GroES в самоорганизации шаперона GroEL при его малых (менее 0.2 мг/мл) концентрациях. При более высоких концентрациях GroEL влияние GroES менее выражено. На основании полученных результатов предложена модель самоорганизации *in vitro* молекулярного шаперона GroEL/ES от клубка до олигомера.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 09-04-00768-а), при поддержке Российской академии наук (программа «Молекулярная и клеточная биология»), Федерального агентства по науке и инновациям (02.740.11.0295).

НОВЫЙ МОДУЛЬНЫЙ ТОКСИН OtTx ИЗ ЯДА ПАУКА *OXYOPES TAKOBIUS*

Сачкова М.Ю., Василевский А.А., Козлов С.А., Гришин Е.В.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: sachkovamasha@mail.ru

Пауки – ловкие охотники на насекомых, использующие в качестве оружия сложные яды, в состав которых входят разнообразные токсины. Из яда паука *Oxyopes takobius* (Oxyopidae) был выделен новый уникальный полипептидный токсин OtTx 1 (~12 кДа), проявляющий инсектицидную и антимикробную активности.

Комбинация методов белковой химии, масс-спектрометрии и генной инженерии позволила установить полную аминокислотную последовательность OtTx 1 из 108 остатков. Первичная структура OtTx 1 позволяет отнести его к новому семейству так называемых модульных токсинов пауков. N-концевой линейный модуль OtTx 1 соответствует «обычному» цитолитическому пептиду. C-концевой модуль содержит 5 дисульфидов и, вероятно, формирует укладку, характерную для большинства нейротоксинов пауков. С помощью экспрессии синтетических генов в бактериальной системе мы получили полноразмерный рекомбинантный токсин OtTx 1, а также его C-концевой модуль. Кроме того, путем химического синтеза был получен N-концевой модуль OtTx 1. Проведено исследование инсектицидной и антимикробной активности полноразмерного OtTx 1 и его частей, полученные данные позволяют предположить механизм действия нового модульного токсина.

Работа поддержана грантами Президиума РАН (программа фундаментальных исследований «Молекулярная и клеточная биология»), Минобрнауки РФ (Госконтракты №№ П1388 и 16.512.11.2195), РФФИ (№№ 08-04-00454 и 11-04-00706).

ОСОБЕННОСТИ СУБЪЕДИНИЧНОЙ СТРУКТУРЫ АДГЕЗИОННОГО G-БЕЛОКСОПРЯЖЕННОГО РЕЦЕПТОРА CIRL-1

Серова О.В., Попова Н.В., Деев И.Е., Петренко А.Г.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: oxana.serova@gmail.com

CIRL-1 принадлежит к семейству адгезионных G-белоксопряженных рецепторов. Данные рецепторы являются природными гибридами двух классов белков – сигнальных рецепторов и молекул клеточной адгезии. CIRL-1 состоит из двух субъединиц, внеклеточной гидрофильной субъединицы p120, содержащей модули клеточной адгезии, и трансмембранной субъединицы p85, участвующей в передаче сигнала. Для всех адгезионных G-белоксопряженных рецепторов характерно наличие GPS-домена (G protein-coupled receptor Proteolysis Site). Именно в GPS-домене происходит протеолиз молекулы предшественника с образованием двух субъединиц рецептора, которые, как предполагают, образуют нековалентно связанный комплекс на поверхности клетки. Однако для CIRL-1 была выдвинута гипотеза о независимой локализации субъединиц на клеточной мембране.

Нами показано, что малая часть комплексов рецептора CIRL-1 диссоциирует с поверхности клетки с образованием растворимого эктодомена рецептора, который представляет собой комплекс p120 субъединицы и внеклеточного фрагмента p85 субъединицы. Данная диссоциация является результатом второго протеолиза в GPS-домене рецептора между сайтом первичного протеолиза и первым трансмембранным сегментом. При экспрессии в эукариотических клетках растворимой формы CIRL-1 с небольшим N-концевым фрагментом p85 субъединицы в клеточной среде нам удалось обнаружить такие комплексы p120 с фрагментом p85. Введение сайта расщепления тромбином во внеклеточную часть p85 субъединицы полноразмерного рецептора, а также использование химерных форм CIRL-1 также позволило показать существование гетеродимерного комплекса на поверхности клеток. Таким образом, мы подтвердили, что на мембране рецептор присутствует главным образом в виде комплекса двух нековалентно связанных субъединиц p120 и p85.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 06-04-49706-а), Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», NIH Fogarty grant 5 RO3 TW007210.

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕТЕРОТРИМЕРНОГО АРХЕЙНОГО ФАКТОРА ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ 2

Столбоушкина Е.А., Архипова В.И., Никонов О.С., Никонов С.В., Гарбер М.Б.

Учреждение РАН Институт белка РАН,
142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 4

E-mail: esmail@vega.protres.ru

Гетеротримерный архейный фактор инициации трансляции 2 (aIF2αβγ) гомологичен эукариотическому фактору eIF2. Структура e/aIF2 представляет большой интерес в связи с его ключевой ролью в доставке инициаторной тРНК (Met-тРНКi) на рибосому и в регуляции этапа инициации трансляции у эукариот и архей. В 2008 году нами была впервые определена структура полноразмерного aIF2 (Stolboushkina *et al*., 2008), анализ которой выявил высокую подвижность в α- и β-субъединицах фактора. К настоящему времени нам удалось также впервые получить кристаллографическую модель aIF2 в комплексе с инициаторной тРНК. Для поисков условий кристаллизации был выбран тройственный комплекс Met-тРНКi•aIF2αD3γ•ГТФ, в котором белковая составляющая представляет собой конформационно-стабильную сердцевинную часть фактора aIF2 (γ-субъединица и третий домен α-субъединицы). Структура данного тройственного комплекса была определена нами с разрешением 3.5 А. Как мы и предполагали ранее (Nikonov *et al*., 2007), инициаторная тРНК напрямую взаимодействует с доменом III α-субъединицы посредством уникального выступа, образованного двумя выпяченными нуклеотидами. Этот факт объясняет стабилизацию тройственного комплекса и специфическое связывание тРНК. Основная группа контактов формируется между CCA-концом тРНК и switch 1 γ-субъединицы. Петля switch 1 отделяет CCA-конец Met-тРНКi от молекулы ГТФ, расположенной в каноническом ГТФ-связывающем кармане aIF2γ. Вероятно гидролиз ГТФ приводит к изменению конформации switch 1 и нарушению контактов между ним и тРНК, в результате этого Met-тРНКi остается на рибосоме, а aIF2 уходит в раствор. Проведенная работа позволила выявить особенности узнавания инициаторной тРНК гетеротримерным фактором инициации трансляции 2 и объяснить имеющиеся биохимические данные по его функционированию. Несмотря на успех в определении структуры тройственного комплекса, мы продолжаем работу по получению кристаллов более высокого качества. Дальнейший структурный анализ тройственного комплекса должен пролить свет и на механизм взаимодействия его с рибосомой и на ряд других деталей функционирования системы инициации биосинтеза белка у архей и эукариот.

Работа финансировалась Программой МКБ РАН.

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И СИНТЕЗ АНАЛОГА ПЕПТИДИЛ-тРНК – ПРЕДСТАВИТЕЛЯ НОВОГО КЛАССА ИНГИБИТОРОВ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА

Сумбатян Н.В.[1], Терещенков А.Г.[1], Головин А.В.[2], Шишкина А.В. [3], Коршунова Г.А.[3], Богданов А.А.[1,2]

[1]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.3
[2]Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.73
[3]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.40

E-mail: sumbtyan@belozersky.msu.ru

В рамках создания ингибиторов биосинтеза белка с использованием компьютерного моделирования осуществлен дизайн и синтез аналога пептидил-тРНК, представляющего собой ковалентный конъюгат пептидо-нуклеиновой кислоты (PNA) со «стоп»-пептидом. Такого рода соединения представляют интерес как зонды для изучения функционирования рибосомы и как вещества, на основе которых могут быть созданы антибиотики нового поколения. PNA являются аналогами нуклеиновых кислот, в которых сахаро-фосфатный остов заменен на псевдопептидную цепь с присоединенными к ней нуклеиновыми основаниями. В качестве PNA, предназначенного для адресного связывания с P-сайтом рибосомы, выбран тетрапептид-нуклеотид, обозначенный здесь, как ACCC, цитозиновые основания в котором комплементарны нуклеотидным остаткам G2251, G2252, G2253 23S рРНК, два из которых – G2251 и G2252 – используются пептидил – тРНК при специфическом связывании с P-участком пептидил-трансферазного центра (ПТЦ), четвертый – вводился в PNA для усиления связывания. По свободной аминогруппе тетра-(PNA) присоединен «стоп»-пептид с последовательностью Ile-Phe-Val-Ile, который, будучи расположенным в рибосомном туннеле, в присутствии тетрациклина вызывает остановку трансляции сигнального полипептида, закодированного в ermC опероне.

Твердофазным методом на SASRIN-полимере осуществлен синтез псевдопептида Ac-Ile-Phe-Val-Ile-ACCC-Lys-OH с использованием Fmoc- и Bhoc/Boc-группировок для защиты аминогрупп основной и боковых цепей, соответственно.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 10-04-01187-а).

ПЕПТИДЫ ФАКТОРА eRF1, СОСЕДСТВУЮЩИЕ СО СТОП-СИГНАЛОМ В СОСТАВЕ ТЕРМИНАЦИОННОГО КОМПЛЕКСА 80S РИБОСОМ ЧЕЛОВЕКА

Хайрулина Ю.С.[1], Булыгин К.Н.[1], Грайфер Д.М.[1], Веньяминова А.Г.[1], Воробьев Ю.Н.[1], Фролова Л.Ю.[2], Карпова Г.Г.[1]

[1]Учреждение РАН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8
[2]Учреждение РАН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва

E-mail: ykhairulina@gmail.com

Во всех живых организмах белки синтезируются на рибосомах, которые осуществляют перевод (трансляцию) генетической информации с последовательности тринуклеотидов – кодонов мРНК в аминокислотную последовательность синтезируемого белка. Заключительный этап процесса трансляции – терминация наступает, когда в А-участке рибосомы оказывается один из трех терминирующих кодонов (UAA, UAG или UGA), которые узнаются специальным фактором терминации 1-го класса. Связавшись в А-участке, эти факторы промотируют гидролиз сложноэфирной связи в пептидил-тРНК, что приводит к высвобождению синтезированного полипептида из рибосомы. У эукариот, в отличие от прокариот, все три стоп-кодона узнаются одним фактором терминации eRF1.

В настоящей работе с помощью метода аффинной модификации с использованием аналогов мРНК, несущих сшивающую группу в заданном положении, в сочетании с методологией, основанной на специфическом расщеплении полипептидной цепи модифицированного белка, установлены фрагменты eRF1, соседствующие со стоп-сигналом в составе терминационных комплексов 80S рибосом человека. Показано, что остатки A и G в составе стоп-сигнала сближены с разными районами eRF1. Так, мотив 31-GTx-33 eRF1 являлся главной мишенью модификации аналогами мРНК со сшивающей группой на остатках G во втором и третьем положениях терминирующего тетраплета, тогда как аналоги мРНК со сшивающей группой на остатках A в этих же положениях модифицировали в основном фрагмент 121-131, включающий консервативный YxCxxxF-мотив. Сопоставление результатов по сшивкам с данными молекулярного моделирования показало, что пептидное окружение остатков G и A стоп-сигнала соответствует разным конформациям N-домена eRF1. Таким образом, данные по аффинной модификации eRF1 в составе терминационных комплексов 80S рибосом аналогами мРНК с разной природой гетероциклического основания, несущего сшивающую группу, позволили получить новое представление о механизмах распознавания остатков G и A в терминирующих тетраплетах, объясняющее способность eRF1 узнавать все три стоп-кодона.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты №№ 11-04-00597 и 11-04-00840) и Программы «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ЭПИТОПОВ БЕЛКА P35 ОРТОПОКСВИРУСОВ

Хлусевич Я.А.

Учреждение РАН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, просп. Ак. Лаврентьева, 8

E-mail: khlusevichjana@mail.ru

Проникновение оболочечных вирусов в клетки опосредуется вирусными белками слияния. В этом процессе могут участвовать несколько типов молекул. Так, при проникновении в клетку вируса простого герпеса, вируса денге, адено-ассоциированного вируса 2 типа и ортопоксвирусов происходит присоединение вирионных белков к поверхностным гликозаминогликанам. Как минимум 4 ортопоксвирусных белка связывают клеточные поверхностные гликозаминогликаны. Одним из таких белков ортопоксвирусов является белок p35 – основной иммуногенный белок при развитии иммунного ответа у человека, связывающий гепаран сульфат клеточной поверхности. Антитела к p35, отобранные ранее из иммунной комбинаторной библиотеки scFv антител человека, сконструированной на основе мРНК лимфоцитов периферической крови доноров, вакцинированных осповакциной, были способны ингибировать вирусную инфекционность на эукариотических клетках. Рекомбинантный белок p35 конкурирует с вирусными частицами за связывание с эукариотическими клетками Вероятно, вируснейтрализующие антитела узнают и связывают тот же эпитоп, что и гепаран сульфат, и таким образом ингибируют проникновение вирусных частиц в клетки.

Анализ аминокислотной последовательности белка p35 (вируса оспы коров) показал наличие ряда потенциальных антигенных кластеров в N-концевой, центральной и C-концевой частях белковой молекулы. Для локализации эпитопа белка p35, с которым взаимодействуют вируснейтрализующие антитела, было сконструировано 12 делеционных вариантов p35. Исследование связывания вируснейтрализующих антител с делеционными вариантами белка p35 показало, что участок, узнаваемый вируснейтрализующими антителами, находится в C-концевой области белка. При этом, этот участок не совпадает с предсказанными ранее консенсусными гликозоаминогликан-связывающими последовательностями, выявленными в белке p35. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что сайт связывания геперан сульфата отличен от консенсуса и находится в C-концевой области, либо о том, что механизм вирусной нейтрализации не связан с перекрыванием эпитопов, узнаваемых антителами и гепаран сульфатом.

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕОПИОИДНОЙ РЕЦЕПЦИИ β-ЭНДОРФИНА В ДОИМПЛАНТАЦИОННОМ РАЗВИТИИ ЭМБРИОНОВ МЫШИ *IN VITRO*

Чернов А.С.[1], Ковалицкая Ю.А.[2], Давыдова Г.А.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская обл.*
[2]*Филиал Учреждения РАН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Московская обл.*

E-mail: c.h.e.r.n.o.v@rambler.ru

β-Эндорфин – опиоидный нейропептид, способен регулировать основные функции организма, осуществляя взаимосвязь нервной, иммунной и эндокринной систем. Установлено, что молекула β-эндорфина может взаимодействовать как с опиоидными, так и с неопиоидными (не чувствительными к блокатору опиоидных рецепторов налоксону) рецепторами. Показано, что на самых ранних этапах развития, β-эндорфин секретируется фолликулярными клетками, окружающими яйцеклетку, и уже на более поздних стадиях, клетками эндометрия во время имплантации эмбриона. В настоящее время нет данных о наличии β-эндорфина в просвете яйцевода, и его воздействии на эмбрионы с 2-клеточной стадии и до бластоцисты. Также остается не ясным существуют ли неопиоидные рецепторы β-эндорфина на ранних эмбрионах.

Нами было изучено действие β-эндорфина (0,1 мкМ) на развитие 2-, 4- и 8-клеточных эмбрионов мыши *in vitro* и исследовано воздействие β-эндорфина на изменение уровня внутриклеточного Ca^{2+} у ранних эмбрионов, с использование Ca^{2+}-специфичного флуоресцентного зонда (Fluo-3 AM). Также изучили пути передачи внутриклеточного сигнала под действием β-эндорфина с использованием специфических блокаторов активности фосфолипазы С и аденилатциклазы.

Нами было установлено, что на 2-, 4- и 8-клеточных эмбрионах мыши локализованы неопиоидные рецепторы β-эндорфина. Выявленная нами способность β-эндорфина стимулировать процессы первичной дифференцировки у ранних эмбрионов мыши, образование зрелых бластоцист и выход их из оболочки оплодотворения дает право считать, что эти вещества играют роль неспецифических факторов роста в регуляции доимплантационного развития мыши. Показано, что β-эндорфин (0,1 мкМ) инициирует медленный (35–40 мин) выход ионов $Ca2^{+}$ в цитоплазму из внутриклеточных депо у 8-клеточных эмбрионов мыши. Впервые нами было установлено, что воздействие β-эндорфина на 2-клеточные эмбрионы осуществляется при участии инозитолфосфатного и аденилатциклазного сигнальных путей через опиоидные и неопиоидные рецепторы соответственно, а на 4- и 8-клеточные эмбрионы – только по аденилатциклазному пути через неопиоидные рецепторы β-эндорфина.

РОЛЬ БЕЛКА CHROMATOR В РАБОТЕ Su(Hw)-ЗАВИСИМОГО ИНСУЛЯТОРНОГО КОМПЛЕКСА

Шаповалов И.С., Головнин А.К.

Учреждение РАН Институт биологии гена РАН, 119334 Москва, ул. Вавилова, 34/5

E-mail: igor.shapovalov.193.5@gmail.com

Компактизация-декомпактизация хромосомальной ДНК и обеспечение высокоэффективной регуляции экспрессии генов эукариот осуществляется за счет активности хроматина. Вследствие сверхкомпактной упаковки ДНК в хроматине эффективная экспрессия генов обеспечивается посредством работы ряда регуляторных элементов, что способствует нейтрализации хроматин-индуцированной репрессии. Инсуляторы – регуляторные элементы ДНК изолирующие ген от воздействий окружающего хроматина. Наиболее изученными у *Drosophila melanogaster* являются Su(Hw)- и dCTCF-зависимые инсуляторы. Одним из основных компонентов этих инсуляторов является белок CP190. Ранее в нашей лаборатории при поиске партнёров CP190 методом двугибридной дрожжевой системе был обнаружен ранее описанный белок Chromator (Chriz), имеющий «хромодомен» на N-конце. Chromator коиммунопреципетируется с белком Z4, участвующим в поддержании структуры бэндов политенных хромосом.

Целью работы являлось изучение роли белка Chromator в процессе регуляции транскрипции и его участие в работе Su(Hw)-зависимых инсуляторов.

Методом двугибридной дрожжевой системы были определены участки белка Chromator, обеспечивающие взаимодействие с белком Z4 и с инсуляторными белками CP190 и Mod67.2, а также участки, необходимые для димеризации белка; была установлена роль отдельных доменов С-конца белка Chromator во взаимодействии с CP190. Определены домены белков CP190, Mod67.2 и Z4, необходимые для взаимодействия с белком Chromator. Участие белка Chromator в составе комплексов с инсуляторными белками Su(Hw), Mod67.2 и CP190 было подтверждено методом иммунопреципитации белков. Иммунное окрашивание политенных хромосом показало, что белок Chromator практически полностью колокализуется с белком CP190, однако наблюдается лишь незначительное количество сайтов колокализации Chromator с сайтами Su(Hw)-зависимых инсуляторов, маркером которых является белок Mod67.2. Это говорит о том, что белок Chromator входит в состав различных комплексов, и участвует в работе ограниченного числа Su(Hw)-инсуляторов. Примерно в половине случаев на политенных хромосомах белок Chromator колокализуется с белком dCTCF – основным компонентом dCTCF-зависимых инсуляторов.

В настоящее время исследуется функциональная активность отдельных доменов белка Chromator *in vivo* в модельной системе с использованием трансгенных конструкций.

РЕГУЛЯТОРЫ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДОВ, СООТВЕТСТВУЮЩИХ ТРЕТЬЕЙ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ ПЕТЛЕ РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА

Шпакова Е.А.,[1] Тарасенко И.И.,[1] Власов Г.П.,[1] Шпаков А.О.[2]

[1]*Учреждение РАН Институт высокомолекулярных соединений РАН, 199004 С.-Петербург, Большой пр., 31*
[2] *Учреждение РАН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223 С.-Петербург, пр. Тореза, 44*

E-mail: eshpakova@mail.ru

Лютеинизирующий гормон (ЛГ) – регулятор функций репродуктивной системы, действие которого осуществляется через рецептор серпантинного типа. Активированный гормоном рецептор ЛГ взаимодействует с G-белком стимулирующего типа (Gs), следствием чего является стимуляция активности фермента аденилатциклазы (АЦ). Предполагается, что важную роль во взаимодействии с Gs-белком играет С-концевой участок третьей цитоплазматической петли (С-ЦП3) рецептора ЛГ. Для проверки этого нами были синтезированы пептиды, производные С-ЦП3 рецептора ЛГ крысы: NKDTKIAKK-Nle-A$^{562-572}$-амид (I), L-Nle-ATNKDTKIAKK-Nle-A$^{558-572}$-амид (II), пальмитоилированный и димерный аналоги пептида I – NKDTKIAKK-Nle-A$^{562-572}$-K(Palm)-A-амид (III) и (NKDTKIAKK-Nle-A$^{562-572}$)$_2$-KGGC(Acm)-амид (IV), исследована их вторичная структура и изучено влияние на активность АЦ и Gs-белков в тканях крыс. Синтез пептидов проводили твердофазным методом, присоединяя аминокислотные остатки с помощью диизопропилкарбодиимида. Пальмитоилированный лизин, который использовали для синтеза пептида III, получали конденсацией пентафторфенилового эфира пальмитиновой кислоты и *N*α-*t*-BOC-лизина с помощью диизопропилкарбодиимида в присутствии триэтиламина. Для получения димерного пептида IV на месте разветвления в полипептидную цепь вводили *N*α,*N*ε-di-*t*-BOC-лизин, что позволило удвоить последовательность растущего пептида. С помощью спектроскопии КД показано, что в водных растворах и в системе трифторэтанол-вода все пептиды находятся в основном в β-складчатой конформации, за исключением пептида III, доля спиральной конформации которого в щелочной среде и в присутствии 60–80% трифторэтанола составила 25 и 13%, соответственно. В микромолярных концентрациях пептиды стимулировали активность АЦ и повышали уровень ГТФ-связывания Gs-белков. В присутствии пептидов стимулирующие эффекты хорионического гонадотропина человека на активность АЦ и ГТФ-связывание снижались. Эти данные свидетельствуют о том, что основные молекулярные детерминанты, ответственные за взаимодействие с Gs-белком и активацию АЦ локализованы в С-ЦП3 рецептора ЛГ.

Работа поддержана РФФИ (проект № 09-04-00746).

Секция 7

Химия и биология протеолитических ферментов

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПСИХРОТРОФНОГО КАТЕПСИНА L ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА *PARALITHODES CAMTSCHATICA*

Балашова М.В.[1], Руденская Г.Н.[2], Шагин Д.[3], Исаев В.А.[4]

[1]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*
[2]*Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*
[3]*ЗАО Евроген, Москва*
[4]*НПП Тринита, Москва*

E-mail: lemon_m23@mail.ru

В последнее время все больший интерес для биотехнологии представляют психрофильные и психротрофные протеолитические ферменты членистоногих, в частности, ракообразных. К сожалению, механизмы холодовой адаптации ферментов до сих пор слабо изучены. В нашей лаборатории был выделен и охарактеризован новый психротрофный катепсин L из гепатопанкреаса камчатского краба (*Paralithodes camtschatica*), относящийся к клану C1 протеиназ по классификации MEROPS. Анализ кДНК гена и транслированной аминокислотной последовательности показал, что профермент содержит 324 аминокислотных остатка, рассчитанная молекулярная масса 35,4 кДа. Зрелый фермент содержит 220 аминокислотных остатков (23,78 кДа, pI=4,82). Аминокислотная последовательность исследуемого катепсина содержит консервативный мотив GCNGG, характерный для большинства цистеиновых протеиназ. В нашем случае, Asn заменен на Gly, что, вероятно, связано с психротрофностью фермента и увеличивает его лабильность. Также, катепсин L камчатского краба содержит мотив X3RX2(V/I)FX2NX3IX3N), характерный для всех представителей подсемейства катепсинов L. Однако, Phe заменен на Tyr. Активный центр образован каталитической тетрадой Gln22, Cys28, His167, Asn187.

Также были исследования энзиматические свойства нового катепсина L. Оптимум pH=8,0, что может указывать на то, что данный фермент является секретируемым, а не лизосомальным. T оптимум = 25ºC, более того, фермент сохраняет высокую активность при T = 4ºC, что говорит о его психротрофности. Исследуемый катепсин L эффективно гидролизует ряд синтетических субстратов, а также природные пептиды (меллитин, A и B цепи инсулина, гемоглобин) и коллаген X и VI типов. В положении P1 предпочитает Arg (замена Arg на Lys в положении P1 уменьшает уровень гидролиза на 27%), в P2 – гидрофобные аминокислотные остатки (особенно Leu, Val, Ile, Phe).

Работа поддержана грантом РФФИ № 08-04-00545.

ПРОТЕАСОМЫ В РАЗВИТИИ ЦНС У КРЫС

Богатырев М.Е., Люпина Ю.В., Карпова Я.Д., Астахова Т.М., Абатурова С.Б., Шарова Н.П.

Учреждение РАН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26

E-mail: michael.bogatyrev@gmail.com

Целью настоящей работы было изучение пула протеасом в развивающемся мозгу у крыс. Исследованы химотрипсин-подобная активность (ХПА) и каспаза-подобная (КПА), общий уровень протеасом и содержание иммунных протеасом в различных отделах ЦНС: коре (К), стриатуме (СТР), медиабазальном гипоталамусе (МБГ) мозжечке (М), стволе мозга (С)) у крыс в эмбриогенезе (ЭР) и в период постнатального развития (ПР). Показано, что ХПА и КПА различаются в зависимости от исследуемой структуры мозга и периода ЭР и ПР. ХПА на 15–17-е дни ЭР, а также в период с 15-го по 25-й дни ПР в К была выше по сравнению с таковой в каудальных отделах мозга (М и С). На 21-й день ЭР было отмечено повышение ХПА в МБГ по сравнению с другими изученными структурами мозга. Повышение ХПА и КПА в 1-й день ПР наблюдалось во всех исследованных структурах. ХПА падает во всех исследованных структурах на 3-й день ПР, а КПА на 5-й день ПР. На 7-й день ПР во всех исследованных структурах кроме К происходило повышение ХПА, а на 12-й день ПР во всех исследованных структурах КПА увеличивалась. В ЭР в исследованных структурах менялось соотношение иммунных протеасом к общему уровню протесом. Содержание иммунных протеасом на 15-й день ЭР в каудальной части мозга было выше, чем в К. Напротив, на 18-й и 21-й дни ЭР содержание иммунных протеасом в К и МБГ было выше, чем в других отделах мозга, а в 1-й день ПР увеличивалось содержание иммунных протеасом в каудальных отделах мозга. Не было обнаружено достоверных изменений в тотальном уровне протеасом в исследованных структурах у крыс на различных стадиях ЭР и ПР. При исследовании распределения иммунных субъединиц в клетках ЦНС у крыс было обнаружено, что субъединицы иммунных протеасом содержатся не во всех клетках-предшественниках нейронов или глиальных клеток и не во всех нейронах или глиальных клетках. ГАМК-ергические нейроны содержат субъединицы иммунных протеасом. Изменение пула протеасом в исследованных структурах ЦНС связано с процессами нейрогенеза и дифференцировки.

Исследования проведены при финансовой поддержке РФФИ (грант № 09-04-00077а).

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ПРОТЕАСОМ В РАЗВИТИИ ПОРТАЛЬНОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ У КРЫС ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Богомягкова Ю.В.[1], Карпова Я.Д.[1], Божок Г.А.[2], Люпина Ю.В.[1], Астахова Т.М.[1], Легач Е.И.[2], Бондаренко Т.П.[2], Шарова Н.П.[1]

[1]Учреждение РАН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26
[2]Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина

E-mail: jullietta89@yandex.ru

Протеасомы, «вездесущие» протеолитические комплексы, выполняют регуляторную функцию в клеточных процессах, активируя или устраняя белки и образуя биологически активные пептиды. Среди множественных форм протеасом млекопитающих уникальная роль принадлежит иммунным протеасомам, содержащим иммунные протеолитеские субъединицы LMP7, LMP2 и LMP10 и участвующим в Т-клеточном иммунном ответе на разных этапах его развития. Особый интерес представляет вопрос об особенностях функционирования иммунных протеасом в противоположном по смыслу процессе – формировании иммунологической толерантности. Ключевая роль в осуществлении этого процесса принадлежит печени, органе с собственной локальной иммунной системой. При введении донорских клеток в печень через портальную вену формируется донор-специфическая толерантность (ДСТ) и значительно увеличивается приживаемость тканевых трансплантатов. Цель данной работы – выявить изменения в пулах протеасом печени и трансплантата в развитии ДСТ у взрослых крыс при приживлении неонатальных тканей яичника под капсулу почки. Показано, что в печени крыс с индукцией ДСТ увеличено количество мононуклеарных клеток, обогащенных LMP2, и снижено количество клеток, обогащенных LMP7. Эти изменения сопровождаются возрастанием каспазаподобной, но не химотрипсинподобной активности протеасом. Различия в экспрессии иммунных протеасом выявлены также для клеток трансплантатов яичника у разных групп животных. Иммунные протеасомы, содержащие LMP7, преобладают в отторгающихся трансплантатах. По-видимому, увеличение их содержания связано с активным участием этого типа иммунных протеасом в представлении антигена и развитии полноценной иммунной реакции на чужеродную ткань. Иммунные протеасомы, содержащие LMP2, напротив, преобладают в приживающихся трансплантатах. Можно полагать, что этот тип иммунных протеасом проявляет «неиммунные» функции и является необходимым для успешного приживления ткани. Перспективы связаны с поиском ингибитора активности LMP7, применение которого могло бы продлить жизнь трансплантата.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 09-04-00077а).

МЕХАНИЗМ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ГЛУТАМИЛЭНДОПЕПТИДАЗ БАЦИЛЛ И КОККОВ

Вайчюлионис Т.С.[1], Гасанов Е.В.[2]

[1]Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, 119571 Москва, просп. Вернадского, 86
[2]Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2

E-mail: why4ulionis@gmail.com

Изучение механизмов функционирования биологических молекул – одна из актуальных задач современной науки. Одним из важнейших направлений является исследование механизма распознавания и связывания молекулы субстрата ферментом. Наша работа направлена на изучение механизмов, определяющих специфичность протеаз, в первую очередь способность к распознаванию заряженного субстрата и проводится на модели бактериальных глутамилэндопептидаз (ГЭП). Эти ферменты с высокой специфичностью гидролизуют связи, образованные отрицательно заряженными остатками дикарбоновых аминокислот, в первую очередь, глутаминовой. Механизм распознавания субстрата ГЭП при этом до сих пор неясен.

Анализ пространственной структуры ГЭП *Bacillus intermedius* (BIGEP) и протеиназы V8 *Staphylococcus aureus* показал, что субстратсвязывающий район ГЭП бацилл и кокков содержит два элемента, теоретически способных распознавать и компенсировать отрицательный заряд субстрата: остаток His213 и α-аминогруппу N-концевой аминокислоты (Val/Ser1). Генноинженерная замена His213, как показано ранее, не изменяет предпочтения зрелой BIGEP к остаткам глутаминовой кислоты. Следовательно, была выдвинута гипотеза о ключевой роли α-аминогруппы N-концевой аминокислоты ГЭП в распознавании заряда субстрата. Однако, осуществленный нами анализ созревания BIGEP *in vitro*, наряду с данными, полученными для родственных ферментов, показал, что ГЭП способны распознавать заряженные остатки дикарбоновых аминокислот до формирования свободной аминогруппы зрелого фермента. Предшественники ГЭП, в которых Val/Ser1 ковалентно связан с N-концевым пропептидом и не имеет компенсирующего положительного заряда, автокаталитически расщепляют пропептид по остаткам глутаминовой кислоты. Это позволило нам предположить, что специфичность предшественников и зрелых ГЭП определяется различными элементами: His213 в случае профермента и α-аминогруппой Val/Ser1 для зрелого белка. Для проверки этой гипотезы нами получен предшественник BIGEP с заменой His213/Thr и дополнительным остатком глутаминовой кислоты в пропептиде (Glu(-1)). Анализ созревания мутантной BIGEP позволит пролить свет на механизмы, лежащие в основе специфичности глутамилэндопептидаз.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ АКТИВНОСТЬЮ АМИЛОИД-ДЕГРАДИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ СВОЙСТВАМИ ТКАНИ МОЗГА

Васильев Д.С., Багрова Д.И., Морозова А.Ю., Дубровская Н.М.

Учреждение РАН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, С.-Петербург

E-mail: dvasilyev@bk.ru

Снижение активности амилоид-деградирующего фермента – неприлизина (НЕП) было выявлено у старых крыс с нормальным эмбриогенезом и у взрослых крыс, перенесших пренатальную гипоксию (7% O_2, 3 ч, E14). У этих животных также было отмечено снижение количества лабильных синаптоподин-позитивных дендритных шипиков в нервной ткани новой коры и гиппокампа, сопровождаемое нарушением кратковременной памяти. Полученные данные позволили нам выдвинуть предположение о возможной взаимосвязи активности амилоид-деградирующих металлопептидаз, в частности неприлизина, и изменений количества лабильных аксодендритических контактов в нервной ткани. У животных с экспериментально измененной активностью НЕП было исследовано количество лабильных шипиков в молекулярном слое новой коры мозга. Для восстановления сниженного уровня активности НЕП взрослым крысам, перенесшим пренатальную гипоксию, проводили i.p. инъекции вальпроата натрия (200 мг/кг, в течение месяца). У таких животных наблюдалось повышение (на 17,8±7,6%) количества лабильных шипиков в коре мозга и восстановление нарушенной памяти. Введение в кору мозга ингибитора НЕП – фосфорамидона (1,18 мкг/1 мкл) в течение месяца при помощи осмотических минипомп приводило к снижению (на 18,9±6,8%) количества лабильных шипиков и нарушение памяти. Предполагается, что изменение уровня активности амилоид-деградирующих ферментов, сопровождаемое снижением числа лабильных межнейронных контактов, вовлечено в молекулярные механизмы когнитивных расстройств при патологии развития.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 10-04-01156), Программы «Фундаментальные науки медицине».

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСТГЛУТАМИНСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПЕПТИДАЗЫ ИЗ ЛИЧИНОК НАСЕКОМОГО-ВРЕДИТЕЛЯ *TENEBRIO MOLITOR*

Воротникова Е.А.[1], Семашко Т.А.[2], Гоптарь И.А.[1], Смирнова Ю.А.[1], Филиппова И.Ю.[1], Элпидина Е.Н.[2]

[1]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.3
[2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.40

E-mail: greenfire06@gmail.com

Большой мучной хрущак *Tenebrio molitor* является вредителем запасов зерновых культур и продуктов их переработки. Главными пищевыми белками *T. molitor* являются Gln- и Pro-богатые белки пшеницы проламины, которые также присутствуют в диете большинства людей. Ранее мы показали, что состав пищеварительного комплекса *T. molitor* существенно отличается от человеческого, т.к. начальные этапы переваривания белков у насекомого осуществляют цистеиновые пептидазы. Эти различия могут быть использованы в медицине для лечения аутоиммунного заболевания целиакии, которое диагносцируется у 2% населения. Целиакия вызывается воспалительной реакцией на иммуногенные глутамин- и пролин-богатые пептиды проламинов злаковых, не гидролизуемые пищеварительными ферментами человека. Лекарств от этого заболевания в настоящее время нет.

Используя субстрат Z-Ala-Ala-Gln-pNA (Z – бензилоксикарбонил, pNA – *n*-нитроанилид), мы выявили значительную постглутаминспецифическую активность в пищеварительном комплексе личинок *T. molitor*. Фермент, обладающий этой активностью, был выделен и частично очищен с использованием гель-хроматографии на сефадексе G-100 и аффинной хроматографии на бацитрацин-сефарозе. Хроматографические свойства, pH-зависимость активности, чувствительность к ингибиторам, а также электрофоретическая подвижность фермента были практически идентичны со свойствами главной пищеварительной цистеиновой пептидазы *T. molitor.* Изучено действие фермента на ряд пептидных субстратов цистеиновых пептидаз, Эффективность гидролиза субстратов снижалась в ряду Z-Phe-Arg-pNA > Z-Arg-Arg-pNA > Glp-Phe-Ala-pNA > Z-Ala-Ala-Gln-pNA > Glp-Val-Ala-pNA.

Ферментный препарат предположительно может быть использован в качестве лекарственного препарата для лечения целиакии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты №№ 09-04-01449-а, 09-03-01007-а, 11-04-93964-ЮАР_а).

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПРОТЕИНАЗ СТАТИСТИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ МАЛДИ МАСС-СПЕКТРОВ ПРОДУКТОВ ПРОТЕОЛИЗА

Драчевская М.И., Еремеев Н.Л.

Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.3

E-mail: mary-shat2@mail.ru

Метод изучения первичной специфичности протеолитических ферментов статистическим анализом масс продуктов протеолиза белковых субстратов не требует прямого определения аминокислотной последовательности этих продуктов. Для проведения исследования белок-субстрат с известной аминокислотной последовательностью подвергают гель-электрофорезу в восстанавливающих и денатурирующих условиях. Полосу субстрата инкубируют с изучаемой протеиназой с последующим получением МАЛДИ масс-спектра реакционной смеси. Поскольку в методе МАЛДИ образуются практически только однозарядные ионы, то обработка полученного масс-спектра дает массы продуктов протеолиза. С помощью программы FindPept можно теоретически найти все пептиды белкового субстрата, обладающие конкретной массой в пределах той или иной ошибки измерения. Месторасположение этих пептидов в первичной аминокислотной последовательности субстрата позволяет выделить для каждого из них две аминокислоты, после которых потенциально произошел гидролиз. Для каждой экспериментально определенной массы в масс-спектре проводят такую процедуру, в результате чего получают набор произошедших событий. Первичная специфичность протеиназы проявляется в максимальной частоте встречаемости той или иной аминокислоты при статистическом анализе полученного набора.

В работе теоретически изучены возможности и ограничения данного метода. Выбраны оптимальные диапазоны задаваемых ошибок измерения масс пептидов для получения статистического набора произошедших событий и форма представления статистических данных. Показано, что предлагаемый метод может быть применен лишь для протеиназ с относительно узкой первичной специфичностью (две-три аминокислоты). Исследовано влияние аминокислотного состава белка-субстрата на эффективность проявления специфичных для конкретной протеиназы аминокислот при статистической обработке набора масс продуктов протеолиза. Проведена экспериментальная верификация сделанных теоретических выводов на протеиназах с известной первичной специфичностью – трипсине и глутамилэндопептидазе.

ВЗАИМОСВЯЗЬ АКТИВНОСТИ Ca^{2+}-ЗАВИСИМЫХ ПРОТЕИНАЗ С СОДЕРЖАНИЕМ АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ В ЖАБРАХ МИДИЙ *MYTILUS EDULIS* ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ КАДМИЕМ

Канцерова Н.П., Фокина Н.Н., Лысенко Л.А., Немова Н.Н.

Учреждение РАН Институт биологии КарНЦ РАН,
185610 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

E-mail: nkantserova@yandex.ru

Кадмий – один из основных поллютантов среды обитания живых организмов. Как и большинство тяжелых металлов, даже в очень низких концентрациях он токсичен для всего живого. Токсичность $Cd2^+$ определяется его сродством к SH-группам биомолекул и способностью конкурировать с Ca^{2+} в Ca^{2+}-регулируемых процессах. Так, мишенью для $Cd2^+$ являются $Ca2^+$-зависимые цистеиновые протеиназы цитозоля (кальпаины), испытывающие двоякое действие: с одной стороны, $Cd2^+$ ковалентно модифицирует Cys активного центра фермента, лишая его каталитической активности, с другой – угнетает транспорт ионов $Ca2^+$ в клетку за счет снижения кальмодулин-зависимой активации $Ca2^+$-АТФаз.

В аквариальном эксперименте по изучению ответной реакции мидий *Mytilus edulis* L. на действие ионов $Cd2^+$ в различных концентрациях (10, 100 и 500 мкг/л или 1ПДК, 10ПДК и 50ПДК, соответственно) показана корреляция содержания арахидоновой кислоты (АК) и уровня активности кальпаинов в органах моллюсков. Так, наблюдаемое по истечении первых суток воздействия значительное повышение активности $Ca2^+$-зависимых протеиназ в жабрах моллюсков сопровождается повышением доли АК в составе общих липидов жабр мидий. Напротив, при более длительном (72 часа) воздействии исследуемых концентраций $Cd2^+$ в среде у *M. edulis* наблюдается угнетение активности $Ca2^+$-зависимых протеиназ на фоне сниженного содержания АК в составе общих липидов жабр. Отмеченная корреляция биохимических показателей, по видимому, объясняется эффекторной ролью АК и фосфатидилинозитидов по отношению к селективным и неселективным $Ca2^+$-каналам. Избыточный синтез АК и трансформация фосфатидилинозитола до $ИФ_3$ приводят к повышению уровня цитоплазматического $Ca2^+$ (Mignen et al., 2003; Shuttleworth et al., 2007; Caro, Cederbaum, 2007) – основного регулятора активности кальпаинов. Так, в эксперименте продемонстрирована тесная связь обмена тканевых липидов и белков с центральным связующим звеном – Ca^{2+}, а также их участие в развитии метаболических перестроек, направленных на компенсацию негативного действия загрязнителей среды обитания.

Работа выполнена при поддержке проекта ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (ГК №14.740.11.1034), программы президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-3731.2010.4), гранта РФФИ № 11-04-00167 и Программы Президиума РАН «Биологическое разнообразие».

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ИММУНОПРОТЕАСОМЫ В ПРОТЕОЛИЗЕ ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА ПРИ АУТОИММУННЫХ ПАТОЛОГИЯХ ЦНС

Кузина Е.С.[1], Белогуров А.А.[4], Бачева А.В.[1], Кононихин А.С.[2,3], Харыбин О.Н.[5], Пономаренко Н.А.[4], Николаев Е.Н.[2,3,5], Габибов А.Г.[1,4]

[1]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.3
[2]Учреждение РАН Институт энергетических проблем химической физики РАН, Москва
[3]Учреждение РАН Институт биохимической физики РАН, Москва
[4]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
[5]Учреждение РАМН Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Москва

E-mail: kat.kuzina@gmail.com

Протеолитическая деградация аутоантигенов имеет важнейшее значение в современной биохимии и иммунологии. Предметом настоящей работы является сравнительное исследование особенностей деградации одного из основных нейроантигенов, основного белка миелина (ОБМ), протеиназами, активируемыми при развитии патологического демиелинизирующего процесса, и протеасомой, выделенной из различных источников. Для изучения протеолиза ОБМ 26S протеасому выделяли из головного мозга мышей линии BALB/c, мышей линии SJL, предрасположенных к развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (EAE), и мышей линии SJL, больных EAE. Продукты деградации ОБМ рядом протеиназ, а также протеасомой головного мозга мышей различных линий, были проанализированы на тандемном хромато-масс-спектрометре. Протеиназы, ассоциированные с рассеянным склерозом, расщепляют пептидные связи в ОБМ чаще всего в соответствии со своей специфичностью. В продуктах деградации ОБМ протеасомой из мозга мышей было обнаружено значительное количество пептида ENPVVHFF, который является частью энцефалитогенного фрагмента ОБМ. Был проведен количественный анализ содержания этого пептида в продуктах гидролиза на тандемном хромато-масс-спектрометре с применением изотопно меченного аналога ENPVVHFF* ($F^*={}^{13}C_9H_9{}^{15}NO$), синтезированного химически. Выявлено, что при действии протеасомы из мозга мышей линии SJL, больных аутоиммунным энцефаломиелитом, этого пептида образуется в 5 раз больше, чем при действии протеасомы из мозга мышей линии BALB/c и из мозга неиммунизированных мышей линии SJL. При введении LMP2-специфического ингибитора мышам линии SJL, больным EAE, тяжесть заболевания заметно снижалась по сравнению с контрольной группой животных. Этот факт указывает на возможную связь между протеолитической активностью иммунопротеасомы и развитием данного заболевания, а также на перспективность специфических ингибиторов иммунопротеасомы как потенциальных лекарственных средств.

ВОЗДЕСТВИЕ ТОКСИНА Cry3Aa *BACILLUS THURINGIENSIS* НА ЭКСПРЕССИЮ ПЕПТИДАЗ КИШЕЧНИКА БОЛЬШОГО МУЧНОГО ХРУЩАКА *TENEBRIO MOLITOR*

Мартынов А.Г.[1,2], Элпидина Е.Н.[1], Опперт Б.[3]

[1]*НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.40*
[2]*Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.73*
[3]*Центр исследований зерна и здоровья животных, Служба с/х исследований Министерства сельского хозяйства США, Манхэттэн 66502, Канзас, США*

E-mail: agmart@mail.ru

Cry-токсины *Bacillus thuringiensis* и препараты на их основе относятся к наиболее прогрессивным инсектицидам. Они избирательно воздействуют на многих представителей отрядов Lepidoptera, Diptera, и Coleoptera, но безвредны для человека. Исследования механизмов воздействия токсинов на насекомых важны для предотвращения адаптации насекомых к Cry-токсинам, а также для улучшения препаратов на основе Cry-токсинов. Пищеварительные пептидазы в организме чувствительных насекомых проводят ограниченный гидролиз протоксина до токсина, обеспечивая активацию и растворение. Помимо этого пептидазы могут проводить дальнейший гидролиз, инактивируя токсин.

В данной работе изучали влияние Cry3Aa на экспрессию цистеиновых и сериновых пептидаз в кишечнике личинок *T. molitor*, чувствительных к этому токсину. Для анализа были использованы базы EST, полученные из кишечников двух групп личинок: контрольной группы и группы, получавшей корм с добавлением 0,1% токсина Cry3Aa. Риды были получены посредством 454-пиросеквенирования с помощью Genome Sequencer FLX System (Roche). Сборку контигов осуществляли программой GS Assembler (Roche). По каждой из баз данных отдельно был проведен поиск белков, схожих по аминокислотной последовательности с катепсинами L и B, трипсинами и химотрипсинами. Обнаружено 9 различных цистеиновых пептидаз семейства папаина. Самый высокий уровень экспрессии принадлежал катепсину L. Воздействие токсина на катепсины проявляется в небольшом понижении их экспрессии. Обнаружено 20 сериновых пептидаз семейства химотрипсина, 3 аналога и 21 неактивный гомолог сериновых пептидаз. Воздействие токсина влечет за собой существенное изменение спектра сериновых пептидаз с тенденцией к снижению уровня экспрессии. Найдены также пептидазы, высоко экспрессируемые в ответ на обработку токсином, предположительно участвующие в защите организма насекомого от интоксикации.

Работа поддержана грантами РФФИ (№№ 09-04-01449-а, 11-04-93964-ЮАР_а).

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ БЕЛКОВЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ

Мищенко Е.С., Новиков В.Ю., Мухин В.А.

Полярный НИИ морского рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича (ПИНРО), 183038 Мурманск, ул. Книповича, 6

E-mail: mishenko@pinro.ru

В лаборатории биохимии ПИНРО традиционно проводятся исследования по поиску путей утилизации белковой составляющей рыбного сырья, в том числе отходов рыбопереработки; в настоящем сообщении в качестве примера рассматривается получение белковых гидролизатов с помощью комплексных ферментных препаратов. Нами был проведен гидролиз отходов переработки трески в одинаковых условиях с использованием различных протеолитических агентов: гепатопанкреаса-сырца камчатского краба и краба-стригуна, готовых ферментных препаратов (ФП): ФП из гепатопанкреаса камчатского краба, протосубтилина Г3х, панкреатина. Исследован ряд характеристик полученных ферментативных гидролизатов, что позволило оценить эффективность гидролиза нативных белков с целью определения наиболее подходящего ФП для получения гидролизатов.

Для оценки глубины протеолиза методом колоночной хроматографии проанализированы данные по фракционному составу белковых соединений в полученных гидролизатах. Во всех случаях преобладающими (более 95,5%) были низкомолекулярные фракции (менее 4 кДа). Спектральный анализ растворов в ходе проведения гидролиза выявил сходную кинетику этого процесса для всех исследуемых протеолитических агентов. Существенные отличия наблюдались при оценке эффективности протеолиза субстрата по соотношению общего и аминного азота в образцах, а также по перераспределению сухого вещества между осадком и раствором после проведения гидролиза. Например, при использовании протосубтилина, степень гидролиза составила 24,5%, что примерно в 1,5 раза ниже, чем в случае использования ФП из гепатопанкреаса камчатского краба. Повторный ферментолиз осадков позволил повысить степень гидролиза более, чем на 10%. Показано, что для гидролиза исследуемого сырья при данных условиях из трех исследованных протеолитических агентов наиболее эффективен ФП из гепатопанкреаса камчатского краба.

ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ У ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

Репкина Н.С.

Учреждение РАН Институт биологии КарНЦ, 185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

E-mail: ntr9@ya.ru

Важную роль в защитных реакциях растений на действие различных неблагоприятных факторов среды, в том числе тяжелых металлов, играют протеолитические ферменты, участвуя в деградации белковых молекул и реакциях ограниченного протеолиза. Однако данных по экспрессии генов протеиназ при действии тяжелых металлов в настоящее время недостаточно. Учитывая это, в данной работе изучали изменения уровня экспрессии генов протеолитических ферментов при действии одного из наиболее токсичных тяжелых металлов – кадмия. Эксперименты проводили в камерах искусственного климата на семидневных проростках яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Ленинградская, которые подвергали действию сернокислого кадмия (100 мкМ) в течение четырех суток. Уровень экспрессии генов, кодирующих сериновые хлоропластные протеиназы (*Clp*), цистеиновые протеиназы (*Cys*), сериновые протеиназы митохондрий и хлоропластов (*Lon1*), а также ингибитор цистеиновых протеиназ (*incys*) в листьях пшеницы анализировали методом ПЦР в режиме реального времени.

В ходе исследований установлено, что под влиянием 1-часового воздействия кадмия изменение экспрессии всех исследуемых генов не происходит, однако уже при 5-часовой экспозиции отмечено значительное увеличение экспрессии генов *Clp, Lon1* и *inCys* (в 2, 4 и 10 раз соответственно) по сравнению с исходным уровнем. При более длительном воздействии (3 суток) экспрессия генов *Clp, Lon1* снижается в 1,5 раза, а *inCys* в 7 раз. При последующем воздействии (через 4 суток) отмечено снижение экспрессии указанных генов практически до исходного уровня. В отличие от этого, на протяжении всего времени воздействия кадмия отмечено ингибирование экспрессии гена *Cys*.

На основании полученных данных об увеличении экспрессии генов протеиназ в листьях проростков пшеницы можно предположить их участие в защитных реакциях растений в начальный период действия кадмия.

НОВАЯ СЕКРЕТИРУЕМАЯ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗА *BACILLUS PUMILUS 3-19*

Рудакова Н.Л., Валеева Л.Р., Балабан Н.П., Шарипова М.Р.

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

E-mail: natalialrudakova@gmail.com

В структуре геномной ДНК *B. pumilus 3-19* идентифицирован ген секретируемой металлопротеиназы *mprBp.* Ген фермента клонирован на плазмиде pSA1 в протеазодефицитный штамм *B. subtilis BG2036*.

Из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis* выделена метллопротеиназа MprBp и очищена до гомогенного состояния при помощи хроматографии на гидрофобных сорбентах.

Методами MALDI-TOF масс-спектрометрии и деградации по Эдману установлена аминокислотная последовательность зрелой металлопротеиназы. Анализ структуры белка показал наличие двух консервативных последовательностей: продленного мотива активного центра и структуру Met-поворота, являющихся маркерными для клана метцинкинов. Особенности структуры этих консервативных последовательностей позволили отнести металлопротеиназу MprBp к семейству адамализинов/репролизинов этого клана, который состоит из эукариотических белков высших млекопитающих и змей. Установлено, что фермент также имеет характерные структурные особенности, сближающие его с представителями семейства астацинов.

Поиск гомологичных белков в Международных базах данных позволил обнаружить 7 бациллярных белков, идентичных по структуре MprBp на 76–100% и представляющих собой адамализиноподобные ферменты с особенностями структуры астацинов. Однако, эти белки не выделены в чистом виде и их аминокислотные последовательности являются конвертированными из последовательностей соответствующих генов бацилл.

Таким образом, полученная новая секретируемая металлопротеиназа MprBp является первым представителем семейства адамализинов/репролизинов у прокариот в целом и у бацилл в частности. Возможно, смешение признаков двух семейств клана метцинкинов являются ключевой особенностью бациллярных адамализиноподобных эндопептидаз.

Работа выполнена при финансовой поддержке федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.

ПРИСУТСТВИЕ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА БЕЛКА, СВЯЗЫВАЮЩЕГОСЯ С АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩИМ ФЕРМЕНТОМ

Савельев М.И., Биневский П.В., Кост О.А.

Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, ГСП-1, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.3

E-mail: foresign@gmail.com

Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ) – цинк-зависимая пептидил-дипептидаза, состоящая из двух гомологичных доменов в составе одной полипептидной цепи – участвует в регуляции давления крови, воспалительном ответе, репродуктивной функции и др. Одним из важных клинических диагностических параметров является содержание АПФ в биологических жидкостях. Существуют данные о присутствии в биологических жидкостях человека эндогенных ингибиторов АПФ, маскирующих истинную активность фермента.

Исследования проводили на образцах сыворотки крови человека, не содержащих экзогенных ингибиторов АПФ, которые потенциально могут присутствовать при приеме донорами лекарственных препаратов. Анализ активности фермента в пуле образцов сыворотки с использованием домен-специфичных субстратов АПФ указал на возможное присутствие в нем лабильного ингибитора АПФ, обладающего преимущественно С-домен-специфичной ингибирующей активностью.

При пропускании сыворотки крови через аффинную колонку на основе иммобилизованного АПФ активность фермента в сыворотке крови по неспецифическому субстрату возросла. Определение активности АПФ с использованием домен-специфичных субстратов показало, что возрастание активности достигается в большей степени за счет увеличения вклада С-домена фермента. Анализ белков сыворотки крови, связавшихся с иммобилизованным АПФ, методом электрофореза указал на присутствие полосы с молекулярной массой около 80 кДа, которая отсутствует в смеси белков, неспецифически связавшихся с контрольной матрицей, не содержащей АПФ.

Таким образом, получены данные, указывающие на возможность присутствия в сыворотке крови не описанного ранее эндогенного ингибитора, проявляющего селективность к ингибированию С-домена, и обнаружено присутствие в сыворотке крови не описанного ранее белка, связывающегося с АПФ, имеющего молекулярную массу около 80 кДа.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 11-04-01923-а.

ОЧИСТКА И ИЗУЧЕНИЕ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ ДИПЕПТИДИЛПЕПТИДАЗЫ IV ИЗ ЛИЧИНОК БОЛЬШОГО МУЧНОГО ХРУЩАКА *TENEBRIO MOLITOR*

Смирнова Ю.А.[1], Кулемзина И.А.[2], Гоптарь И.А.[1], Дунаевский Я.Е.[2], Белозерский М.А.[2], Филиппова И.Ю.[1], Элпидина Е.Н.[2]

[1]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.3
[2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.40

E-mail: yulya_82@list.ru

В нашей лаборатории при изучении пищеварительного комплекса личинок вредителя запасов зерновых культур *Tenebrio molitor* впервые среди насекомых была обнаружена пролинспецифичная пептидаза (ПСП), гидролизующая субстрат APpNA. Фермент не обладал активностью по отношению к субстратам других ПСП – ZAPpNA (субстрату пролилолигопептидазы (ПОП), пролилэндопептидазы (ПЭП) и пролилкарбоксипептидазы (ПКП) и ZPF (субстрату ПКП).

С использованием трех стадий очистки: гель-фильтрации на сефадексе G-150, ионообменной хроматографии на MonoQ и гидрофобной хроматографии на фенилсефарозе был получен высокоочищенный препарат ПСП. Фермент проявлял активность при pH 5,0–10,0 с максимумом при pH 7,9, наибольшая стабильность ПСП наблюдалась на участке pH 5,0–7,2 (2 ч, 37°C). Ингибиторный анализ показал, что активность фермента подавлялась ингибиторами сериновых пептидаз, диизопропилфторфосфатом и фенилметилсульфонилфторидом. Ингибиторы цистеиновых, аспартильных и металлопептидаз (L-транс эпоксисукцинил-лейциламидо(4-гуанидино)бутан, пепстатин и EDTA, соответственно), не влияли на активность фермента, также как и бестатин, ингибитор аминопептидаз. Специфический ингибитор ПОП ZP-prolinal снижал активность пептидазы на 40%. HgCl2, неспецифический ингибитор SH-зависимых ферментов, существенно снижал, а дитиотреитол повышал активность пептидазы на 10–20%. Таким образом, исходя из полученных свойств, выделенная и исследованная ПСП была отнесена к дипептидилпептидазам (ДПП) IV (КФ 3.4.14.5). Показано, что выделенный фермент является секретируемой пищеварительной пептидазой – 60% активности ДПП IV сосредоточено в содержимом передней части средней кишки.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты №№ 09-04-01449-а, 09-03-01007-а, 11-04-93964-ЮАР_а).

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПРОТЕАЛИЗИНА ПРИ ИНВАЗИИ БАКТЕРИЙ-ПРОДУЦЕНТОВ В ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ

Цаплина О.А.[1], Ефремова Т.Н.[1], Демидюк И.В.[2], Хайтлина С.Ю.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт цитологии РАН, 194064 С.-Петербург, Тихорецкий пр., 4*
[2]*Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2*

E-mail: olga566@mail.ru

Условно-патогенные бактерии *Serratia proteamaculans*, синтезирующие актин-специфическую металлопротеиназу протеализин, способны проникать в эукариотические клетки (Цаплина и др., 2009). При введении гена протеализина способность к инвазии в эукариотические клетки приобретают и неинвазивные бактерии *E. coli* (Bozhokina et al, 2011). Инвазия может быть вызвана проникновением протеиназы в эукариотические клетки, а также активацией других ферментов в самой бактерии или во внеклеточной среде. Вне клетки бактериальные протеиназы могут напрямую приводить к деградации внеклеточного матрикса или активировать матриксные металлопротеиназы (ММП). Ранее мы показали, что по данным зимографии протеализин может быть активатором ММП-2 (Цаплина и др., 2009). С другой стороны, актин специфически расщепляется протеализином, что может обеспечивать перестройки актинового цитоскелета в эукариотической клетке, необходимые для интернализации бактерий (Цаплина и др., 2009, 2011). Поэтому задачей работы было определение локализации протеализина при бактериальной инвазии. С помощью конфокальной микроскопии с поликлональными антителами к протеализину протеиназа была обнаружена при инвазии бактерий *S. proteamaculans* во внеклеточной среде и внутри клеток 3T3 Balb SV40. При инвазии рекомбинантных бактерий *E. coli*, синтезирующих протеализин, фермент был обнаружен не только во внеклеточной среде и внутри эукариотических клеток, но и была выявлена совместная локализация бактерий-продуцентов с протеализином. Добавление протеализина во внеклеточную среду вызывает нарушение структуры цитоскелета, но не приводит к проникновению неинвазивных бактерий *E. coli* внутрь эукариотических клеток, несмотря на то, что активность протеиназы сохраняется до конца срока инкубации эукариотических клеток с бактериями. Таким образом, протеализин, по-видимому, способствует инвазии бактерий, оказавшись внутри эукариотической клетки, и его наиболее вероятной мишенью является актин.

Работа поддержана грантом РФФИ № 11-04-00393 и Программой РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Секция 8

Создание новых лекарственных средств

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ L-АСПАРАГИНАЗЫ *RHODOSPIRILLUM RUBRUM*

Покровский В.С.[1], Покровская М.В.[1], Александрова С.С.[1], Андрианов Р.М.[2], Жданов Д.Д.[1], Омельянюк Н.М.[1], Соколов Н.Н.[1]

[1]*Учреждение РАМН Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Москва*
[2]*Учреждение РАН Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва*

E-mail: vadimpokrovsky@yandex.ru

Сконструирован стабильный штамм-продуцент [*E. coli* BL21 (DE3)/pET23a/RrA], характеризующийся высоким выходом рекомбинантной L-аспарагиназы *Rhodospirillum rubrum* (RrA). После ультразвукового разрушения клеток фермент выделяли последовательно на колонках с Q-sepharose и DEAE-Toyopearl. От применяемой в клинической онкологии L-аспарагиназы *E. coli* (EcA) RrA отличается внутриклеточной локализацией, в 2 раза более короткой аминокислотной последовательностью (172 аминокислотных остатка) и низкой гомологией (менее 45%).

K_m RrA для L-аспарагина составляет 0,22 мМ, Vэфф. 5,32 мМ/мин (при концентрации фермента в реакционной смеси 2,1 мкМ). Температурный оптимум действия RrA 54–55 °С, при 36–37°С активность составляет не менее 72% от максимальной. Зависимость активности фермента от температуры аналогична таковой для препаратов, применяемых в клинической практике. Оптимум pH 9,2, при физиологических значениях pH≈7,4 активность составляет 20–30% от максимальной. Активность RrA максимальна при ионной силе в диапазоне концентрации KCl от 750 мМ до 1250 мМ (натрий-фосфатный буфер, pH 8,0). Уменьшение ионной силы (0 мМ KCl) приводит к снижению активности на 30%, увеличение (3000 мМ KCl) – к снижению более чем в 2 раза. L-глутаминазная активность составляет не более 0,1% от L-аспарагиназной. К температурной денатурации RrA несколько более устойчива, чем EcA: инкубация в течение 3 мин при 60°С приводит к практически полной инактивации EcA (8% от активности, наблюдаемой при 37°С) при сохранении активности RrA на уровне 27%. Резкое падение активности начинается для RrA при инкубации 3 мин при температуре выше 57°С. Значимой ренатурации при понижении температуры не происходит. При 37°С активность RrA сохраняется более суток. Инкубация RrA в течение 1 ч с 0–3 М мочевиной продемонстрировала несущественное снижение активности (сохраняется не менее 70% от исходной), дальнейшее повышение концентрации мочевины приводит к полной инактивации.

Полученные данные позволяют считать, что при условии подтверждения противоопухолевой активности рекомбинантная RrA может стать интересным для дальнейшего изучения противоопухолевым ферментом с перспективой разработки на ее основе лекарственной формы.

ПОЛУЧЕНИЕ, ОЧИСТКА И ПРОВЕРКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ХИМЕРНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Байков И.К., Матвеев А.Л., Матвеева В.А., Бабкина И.Н., Леванов Л.Н., Рихтер В.А., Тикунова Н.В.

Учреждение РАН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

E-mail: ivan_baykov@mail.ru

Вирус клещевого энцефалита является актуальной проблемой для жителей Урала, Сибири и Дальнего Востока. Основным способом борьбы с этим заболеванием является вакцинация, однако доля людей, не прошедших вакцинацию, достаточно велика. В таких случаях предотвратить развитие вирусной инфекции можно путём введения в организм пациента иммуноглобулинов человека против вируса клещевого энцефалита. Противовирусный иммуноглобулин, который производят в России в настоящее время, получают из крови доноров. Поскольку такой препарат является и дефицитным, и небезопасным, актуальна задача получения рекомбинантных антител человека против вируса клещевого энцефалита.

Химерное антитело создавали на основе последовательностей, кодирующих антигенсвязывающие домены мышиного моноклонального антитела, способного нейтрализовать вирус клещевого энцефалита. Были сконструированы две плазмидные ДНК, кодирующие тяжёлую и лёгкую цепь химерного антитела и содержащие гены устойчивости к двум различным антибиотикам. Обе плазмиды использовали для одновременной трансфекции эукариотических клеток CHO-K1. Эта линия характеризуется приемлемым уровнем продукции белков и является аттестованной для получения рекомбинантных терапевтических препаратов. После того, как было установлено, что клетки продуцируют необходимое антитело, произвели хроматографическую очистку антитела с использованием белок А-сефарозы в качестве аффинного сорбента. Далее была исследована функциональная активность полученного препарата химерного антитела в реакции связывания с рекомбинантным аналогом поверхностного гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита и произведена оценка константы связывания антитела с этим белком.

Работа выполнена при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере в рамках программы «У.М.Н.И.К.»

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕЙРОТЕНЗИНПОДОБНЫХ ПЕПТИДОВ С ДОФАМИНОВОЙ СИСТЕМОЙ

Батищева Е.Ю.[1], Мешавкин В.К.[1], Кост Н.В.[1], Беляева М.Л.[1], Андреева Л.А.[2], Золотарев Ю.А.[2], Мясоедов Н.Ф.[2]

[1]Учреждение РАМН Научный центр психического здоровья РАМН, 115522 Москва, Каширское шоссе, 34
[2]Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2

E-mail: batishcheva@gmail.com

Ранее нами в экспериментах на животных было показано, что олигопептиды, содержащие фармакофор нейротензина (Pro-Tyr) и названные нейротензинподобными пептидами (НТП), обладают свойствами, характерными для антипсихотиков. В частности, в поведенческих тестах с использованием дофаминомиметика апоморфина НТП проявили себя в качестве фармакологических антагонистов дофамина. Для выяснения молекулярного механизма дофаминблокирующего действия НТП результаты поведенческих экспериментов были сопоставлены с данными радиолигандного анализа вытеснения пептидами селективного антагониста D2 и D3 дофаминовых рецепторов сульпирида и агониста D3 и D2 рецепторов 7-OH-DPAT из мембран клеток стриатума крыс. Предполагается, что НТП, конкурирующие с сульпиридом за места специфического связывания, способны непосредственно взаимодействовать с дофаминовыми рецепторами. В то время как на связывание 7-OH-DPAT НТП могут влиять за счет прямой конкуренции, либо аллостерической модуляции аффинности агониста к рецепторам, как это описано в литературе для самого нейротензина. Проведенное исследование выявило НТП, взаимодействующие с D2 рецепторами как по конкурентному, так и по аллостерическому механизмам. Причем в большинстве случаев способность НТП влиять на связывание лигандов дофаминовых рецепторов *in vitro* совпадала с их эффективностью в тестах «вертикализация» и «зевание», поведенческие проявления которых индуцированы апоморфином. Полученные данные позволяют предполагать, что один из механизмов антипсихотического действия НТП опосредован центральными дофаминовыми рецепторами. Для подтверждения этого предположения, однако, необходимы фармакокинетические исследования распределения и скорости гидролиза НТП в тканях мозга.

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ФРАГМЕНТ ФАКТОРА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ (44-77) ПРЕПЯТСТВУЕТ РАЗВИТИЮ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ РОГОВИЦЫ

Бейрахова К.А.[1], Чупова Л.А.[1], Лихванцева В.Г.[2], Степанова Е.В.[3], Есипов Р.С.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*
[2]*Учреждение РАН Центральная клиническая больница РАН, Москва*
[3]*ГУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва*

E-mail: esipov@mx.ibch.ru

Фактор дифференцировки пигментного эпителия (pigment epithelial-derived factor, PEDF), секретируемый гликопротеин размером 50 кДа, входит в ряд сильнейших эндогенных ингибиторов ангиогенеза. Фрагмент PEDF (44-77) обладает антиангиогенными свойствами полноразмерного белка и представляет собой потенциальный препарат для лечения заболеваний органов зрения, сопровождающихся патологической неоваскуляризацией.

В данной работе мы предлагаем эффективный масштабируемый биотехнологический способ получения фрагмента PEDF (44-77) в составе гибридного белка (ГБ) с интеином *SspDnaB*. ГБ получали в бактериальных клетках *E. coli* в виде телец включения, солюбилизировали и подвергали автокаталитическому расщеплению с образованием свободного фрагмента PEDF (44-77) (выход реакции 87%). Целевой пептид отделяли от интеина с помощью тангенциальной ультрафильтрации. Окончательную очистку PEDF (44-77) производили с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Выход целевого пептида (чистота 99%) составил 38 мг с 1 л культуры.

Антиангиогенная активность полученного пептида была подтверждена *in vitro* с использованием культуры эндотелиальных клеток мыши SVEC-4-10. Выявлена способность препарата в дозе 1 нМ подавлять пролиферацию эндотелиальных клеток на 53%, а также ингибировать образование трубочкоподобных структур эндотелиальными клетками. На экспериментальной модели неоваскуляризации роговицы кролика была показана способность полученного рекомбинантного фрагмента PEDF (44-77) блокировать начальные этапы ангиогенеза (пролиферацию, миграцию эндотелиальных клеток, формирование капилляроподобных структур) при одновременном введении с индукторами ангиогенеза.

СИНТЕЗ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ ВЫСОКОАФФИННОГО РЕЦЕПТОРА FcεR1 ИММУНОГЛОБУЛИНА Е, ОБЛАДАЮЩИХ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ

Грибовская О.В.[1], Мартинович В.П.[1], Янченко В.В.[2], Голубович В.П.[1], Новиков Д.К.[2]

[1]*Институт биоорганической химии НАН Беларуси,*
220141 Минск, ул. Ак. Купревича, 5/2, Беларусь
[2]*Витебский государственный медицинский университет,*
210602 Витебск, ул. Фрунзе, 27, Беларусь

E-mail: olgamel@iboch.bas-net.by

Высокоаффинный рецептор FcεRI является ключевым соединением, участвующим в IgE-зависимых аллергических реакциях немедленного типа. Методами компьютерного моделирования был определен минимальный участок структуре FcεR1 рецептора, принимающий участие в связывании с C3 и C4-фрагментом иммуноглобулина, (последовательность Arg^{111}-Asn^{112}-Trp^{113}-Asp^{114}).

В качестве возможных аналогов высокоаффинного рецептора FcεRI, способных связываться с Fc-участком IgE, был предложен ряд пептидных соединений, содержащих последовательность Arg-Asn-Trp-Asp. Синтез пептидов осуществляли классическим методом в растворе с использованием водородолабильных защит для блокирования боковых функциональных групп и трет.бутилоксикарбонильной защиты – для α-аминогрупп. В качестве конденсирующего агента при образовании пептидной связи использовали диизопропилкарбодиимид, в качестве противорацемической добавки – 1-оксибензотриазол. Идентификацию целевых соединений выполняли методами количественного аминокислотного анализа и масс-спектрометрии, гомогенность подтверждали методами ТСХ и аналитической ВЭЖХ.

Биологические исследования соединений показали, что они обладают иммуномодулирующим эффектом и способны связываться с IgE. Доказана способность пептидов связывать специфические антитела Е класса к аллергену *Dermatophagoides pteronyssinus* из раствора сывороток больных аллергической бронхиальной астмой. На экспериментальной модели аллергической бронхиальной астмы показано иммуносупрессивное действие одного из синтезированных соединений на развитие IgE-зависимой аллергии, что подтверждает специфическую активность и эффективность данного потенциального лекарственного средства, на основе которого можно создать универсальный препарат для предотвращения I типа аллергических реакций.

Обсуждаются возможности применения данных соединений в диагностике и лечении IgE-зависимых аллергопатологий.

Работа выполнена при поддержке гранта БРФФИ №Х09М-017.

ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДА PRO-GLY-PRO НА ПОТРЕБЛЕНИЕ ЭТАНОЛА И ПОВЕДЕНИЕ САМЦОВ БЕЛЫХ КРЫС СО СФОРМИРОВАННОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТЬЮ

Ефимова Е.В., Ловать М.Л.

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

E-mail: e.v.efimova@mail.ru

Известно, что трипептид PGP обладает способностью оказывать противострессогенное влияние на поведение у крыс. В препарате Семакс, эффективность которого была нами показана при терапии алкогольной зависимости, данный трипептид присоединен в качестве стабилизирующего фрагмента и, таким образом, может отвечать за часть терапевтических эффектов препарата.

Целью настоящей работы было изучить действие PGP на алкогольную мотивацию и поведение предварительно алкоголизированных крыс.

Работа была выполнена на самцах белых крыс (n=73), которые были алкоголизированы по методике свободного выбора между 15% раствором этанола и водой в течение 6 месяцев. Уровень потребления чистого этанола у животных составлял около 1 мл/сут. Затем, начиная со второго дня депривации от этанола, животным интраназально ежедневно, в течение 5 дней вводили PGP в дозе 50 мкг/кг в день. На фоне алкогольной депривации производилась оценка поведения животных в тесте открытое поле, крестообразный приподнятый лабиринт, закрытый крестообразный лабиринт, тест Порсольта. После 10 дней депривации животным снова предоставляли доступ к 15% этанолу и измеряли его потребление при свободном выборе.

Введение PGP приводило к статистически значимому повышению (на 49,5%, $p<0,05$) уровня потребления этанола в течение первой недели предоставления алкоголя после депривации, что сходно с действием Семакса в высокой дозе (200 мкг/кг). Однако, введение PGP выраженного влияния на параметры поведения не оказывало, в то время как введение Семакса оказывает положительный эффект на поведенческие параметры, повышая локомоторную активности и снижая депрессивность. Введение Семакса вызывает повышение уровня дофамина и его метаболитов в стриатуме мозга алкоголизированных животных, в то время как введение PGP такого эффекта не оказывало.

Таким образом, трипептид PGP оказывал влияние на алкогольную мотивацию, однако, в отличие от препарата Семакс, выраженного эффекта на поведенческие параметры не имел. Следовательно, механизмы, лежащие в основе поведенческих эффектов Семакса и его влияние на потребление этанола могут иметь разную природу.

АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИН КАК РЕГУЛЯТОР АКТИВНОСТИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Зубкова Е.С.[1], Семенкова Л.Н.[2], Дудич Е.И.[2], Парфенова Е.В.[1], Меньшиков М.Ю.[1]

[1]НИИ экспериментальной кардиологии ФГУ «РКНПК» Минздравсоцразвития РФ, Москва
[2]ОАО «Институт инженерной иммунологии», пос. Любучаны, Чеховский р-н, Московская обл.

E-mail: zubkova@cardio.ru

Повышение эффективности клеточной терапии связано с поиском факторов, усиливающих жизнеспособность клеток после их трансплантации в поврежденную ткань. Особое внимание привлекают к себе белковые и пептидные молекулы, вовлеченные в процессы эмбрионального развития. В этой связи выглядит перспективным использование альфа-фетопротеина (АФП), основного белка сыворотки, выявляемого на ранних стадиях эмбриогенеза и при развитии раковых опухолей. АФП имеет в своем составе ряд регуляторных эпитопов, определяющих его участие в регуляции иммунитета, клеточной пролиферации, опухолевой активности и ряде других процессов. АФП является противовоспалительным фактором, рецептор к АФП обнаружен на моноцитах и лимфоцитах человека.

Нами получен рекомбинантный гликозилированный АФП человека, экспрессирующийся в дрожжевой системе, и разработана схема его очистки.

Исследования на первичной культуре стволовых клеток жировой ткани (СКЖТ) показали, что АФП усиливает пролиферацию и секрецию ими фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF). Связывание АФП с клетками запускает сигнальные пути, опосредуемые митоген-активируемыми протеинкиназами (МАП-киназами) ERK1/2, кроме того, ФИТЦ-меченный АФП интернализуется в СКЖТ по клатрин-опосредованному механизму в течение часа. АФП оказывает также воздействие на активность воспалительных клеток, стимулируя инвазию моноцитов THP-1 в Матригеле и образование в них матриксной металлопротиназы-9, опосредуемое активацией МАП-киназных каскадов ERK1/2, p38, JNK и активацией фактора транскрипции NFκB.

На экспериментальной модели ишемии нижней конечности мыши мы показали, что СКЖТ, культивированные с АФП в дозе 100 мкг/мл, способствуют улучшению восстановления кровотока по сравнению с нестимулированными СКЖТ. Таким образом, рекомбинантный АФП является перспективным кандидатом для повышения эффективности клеточной терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы МНТЦ, проект № 3808.

БИФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ ХИМЕРНОГО БЕЛКА СУРФАКТАНТ С-ИНТЕРФЕРОН-γ

Кузнецова Н.Р., Антипова Н.В., Болдырев И.А., Шахпаронов М.И., Завалова Л.Л.

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

E-mail: natalia@lipids.ibch.ru

Эффективное использование интерферона-γ (**IFNγ**) в терапевтических целях в виде ингаляции ограничивается его высокогидрофильными свойствами и как следствие низкой биодоступностью. Ранее на основе конструкции, включающей в себя части генов, кодирующих белок IFNγ и белок сурфактанта С, **SpC**, был получен рекомбинантный химерный белок **IFN-SpC**[*]. Фрагмент SpC представляет собой α-спираль, содержащую 10 остатков валина, и призван удерживать химерный белок в гидрофобных матрицах. С целью подтверждения функциональности каждой из двух частей гибридный белок вводили в состав липосом и определяли эффективность включения, а также нативность структуры домена IFNγ.

Модельные флуоресцентномеченные липосомы (**L**) состава яичный фосфатидилхолин (**PC**)-BODIPY-PC[**], 9.99:0.01, среднего размера ~100 нм готовили стандартным методом экструзии (1 мг/мл PBS). IFN-SpC (2 нмоль) добавляли (а) на стадии гидратирования липидной пленки либо (б) к свежеприготовленным липосомам (инкубация при 37ºС в течение 2 ч). Полученные суспензии IFN-SpC-L анализировали с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-75. За элюцией липосом следили по флуоресценции BODIPY-PC. Количество IFN-SpC во фракциях определяли параллельно по флуоресценции Trp и по методу Лоури. Показано, что гибридный белок количественно встраивается в липидный бислой липосом независимо от способа приготовления.

Активность IFNγ в молекуле химерного белка подтверждали иммуноферментным анализом (**ИФА**) с использованием поликлональных антител к полноразмерному IFNγ по стандартной методике на планшетах Pierce HisGrab (Thermo Scientific). По результатам ИФА образцы IFN-SpC и IFN-SpC-L взаимодействовали с антителами к полноразмерному IFNγ, то есть фрагмент IFNγ в составе IFN-SpC экспонирован на поверхности липосом и способен проявлять биологическую активность.

---

[*] Гибридный белок сурфактант-интерферон для медицинского применения, патент № 2391403.

[**] BODIPY-PC, 1-пальмитоил-2-[ω-(4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен-8-ил)-гептаноил]-sn-глицеро-3-фосфохолин.

ПЕПТИДНЫЕ ФРАГМЕНТЫ ХЕМОКИНОВОГО ДОМЕНА ФРАКТАЛКИНА: ВЛИЯНИЕ НА МИГРАЦИЮ МОНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Кухтина Н.Б., Сидорова М.В., Азьмуко А.А., Беспалова Ж.Д., Красникова Т.Л.

Институт экспериментальной кардиологии ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздравсоцразвития РФ, 121552 Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а

E-mail: kukhtina@cardio.ru

Фракталкин (CX3CL1) – единственный хемокин семейства CX3C, уникальный по своей структуре и функциям. CX3CL1 состоит из экстраклеточного хемокинового домена, трансмембранного и внутриклеточного доменов. CX3CL1 существует в мембранносвязанной форме, проявляя свойства молекулы адгезии. Под влиянием металлопротеиназ хемокиновый домен CX3CL1 отщепляется и действует как хемоаттрактант. Растворимая форма CX3CL1 вызывает миграцию моноцитов/макрофагов, Т-лимфоцитов и NK-клеток в участки воспаления. Фракталкин экспрессируется дендритными, эндотелиальными, гладкомышечными клетками и нейронами и связывается с рецептором CX3CR1 клеток иммунной системы. В экспериментах на животных показано, что взаимодействие фракталкина с рецептором играет существенную роль в атерогенезе, ревматоидном артрите и нефропатии. В связи с этим фракталкин рассматривается как потенциальная мишень для противовоспалительного воздействия.

Мы проанализировали структуру хемокинового домена фракталкина с помощью программ Peptide Companion для поиска фрагментов, соответствующих линейным эпитопам домена. Были выявлены и синтезированы целевые пептидные фрагменты 41-52, 53-60 и 60-71 последовательности хемокинового домена фракталкина. Активность пептидных фрагментов оценивали по миграции CD16+CX3CR1+ моноцитарных клеток периферической крови человека в модифицированной камере Бойдена. Фракталкин (100 нг/мл) достоверно стимулировал миграцию моноцитов. Анализ действия пептидных фрагментов (1–100 мкг/мл) показал, что фрагмент 41-52 достоверно (на 50% по сравнению со спонтанной миграцией) стимулировал миграцию клеток. Пептиды 53-60 и 60-71 ингибировали миграцию моноцитов, стимулированную фракталкином, на 70% и 60%, соответственно. Предполагается, что пептидные фрагменты 53-60 и 60-71 последовательности хемокинового домена фракталкина являются потенциальными противовоспалительными агентами.

ОТБОР СТАБИЛЬНОГО КЛОНА КЛЕТОК CHO K1, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ХИМЕРНОЕ АНТИТЕЛО

Матвеев А.Л.[1,2], Байков И.К.[1], Матвеева В.А.[1], Тикунова Н.В.[1]

[1]Учреждение РАН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, просп. Ак. Лаврентьева, 8
[2]Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2

E-mail: guterus@gmail.com

Одной из важнейших задач современной биотехнологии является создание стабильных линий эукариотических клеток, способных экспрессировать терапевтические препараты с корректной четвертичной структурой и правильным гликозилированием, которые могли бы заменить препараты получаемые из донорской крови людей, из животных и бактерий. На данный момент терапия клещевого вирусного энцефалита основана на использовании гамма-глобулина из донорской крови, при которой возникает ряд осложнений. Это делает необходимым разработку новых методов лечения данного заболевания. Один из подходов – создание терапевтических антител, обладающих протективными свойствами к вирусу клещевого энцефалита (ВКЭ) и позволяющих обезвредить вирус в организме больного человека.

Целью данной работы являлось получение клона эукариотических клеток, стабильно секретирующих химерные антитела против вируса клещевого энцефалита. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи: оптимизировать условия трансфекции плазмидной ДНК эукариотических клеток; оптимизировать условия для селективного культивирования трансфицированных клеток; отобрать клон, стабильно секретирующий химерное антитело.

В ходе работы была определена минимальная посевная доза клеточной линии CHO K1, определена минимальная летальная доза селективных антибиотиков geneticin G-418 и Hygromicin B. Выбран поликатионый липид Lipofectamine 2000 для одновременной трансфекции клеток CHO K1 двумя плазмидами, кодирующими тяжелую и легкую цепь химерного антитела человека. Показана секреция химерного антитела и через 120 часов после трансфекции клеток. Проведено клонирование и выделение стабильного клона, продуцирующего химерное антитело против вируса клещевого энцефалита. Выполнено сравнение титра антител в культуральной жидкости при нормальных и при истощающих условиях наработки антител. Проведена наработка стабильного клона в препаративных количествах, очищено химерное антитело и подтверждена его функциональная активность.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СЕПСИСА У КРЫС И ВОЗМОЖНОСТЬ ЕГО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ С ПОМОЩЬЮ ЭКЗОГЕННОГО БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА 70 кДа

Остров В.Ф.[1], Евгеньев М.Б.[2], Мурашев А.Н.[1]

[1]*Филиал Учреждения РАН Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Пущино, Московская обл.*
[2]*Учреждение РАН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва*

E-mail: ostrov-vladimir@yandex.ru

Несмотря на достижения науки и клинической медицины, сепсис остается одним из наиболее опасных заболеваний и является основной причиной летальных исходов в палатах интенсивной терапии. Этот патологический процесс развивается при проникновении в системный кровоток больших количеств бактерий и их компонентов. В экспериментальной фармакологии сепсис моделируют с помощью эндотоксических липополисахаридов (LPS) и липотейхоевых кислот (LTA), которые являются компонентами клеточной стенки Грам(-) и Грам(+) бактерий, соответственно. Эти молекулы взаимодействуют с Toll-like рецепторами на поверхности моноцитов, нейтрофилов. В результате происходит секреция в кровь токсических количеств цитокинов, физиологические эффекты которых и определяют клиническую картину.

Одним из возможных путей борьбы с сепсисом являются белки теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (HSP70). Известно, что они также способны связываться с Toll-like рецепторами, а также в экспериментах *in vitro* могут взаимодействовать с молекулами LPS.

Полученные нами в последние годы данные позволяют сделать несколько выводов: 1). Превентивное внутривенное введение rhHSP70 в дозе 266 мкг/кг при экспериментальном сепсисе у крыс оказывает выраженное защитное действие и уменьшает токсические эффекты LPS из *E.coli* или LTA из *S.aureus*. 2). При введении rhHSP70 после LPS защитные свойства выражены значительно слабее. 3). Наблюдается зависимость защитного эффекта от дозы вводимого rhHSP70. Снижение в два раза дозы, эффективной на модели экспериментального сепсиса (266 мкг/кг), приводит к заметному ослаблению защитного действия rhHSP70. 4). Введение rhHSP70 в дозе 266 мкг/кг крысам не влияет на изучаемые физиологические параметры гемодинамики, системы коагуляции и биохимические показатели крови животных. 5). rhHSP70 является малоопасным, умеренно токсичным и не проявляет токсического действия при однократном внутривенном введении мышам в дозе 26,6 мг/кг, которая в 100 раз превышает дозу, эффективную при экспериментальном сепсисе.

ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНЫЕ ИНГИБИТОРЫ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ НА ОСНОВЕ АПТАМЕРОВ

Пупов Д.В.[1], Есюнина Д.М.[1,2], Кульбачинский А.В.[1]

[1]*Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2*
[2]*Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва*

E-mail: danila@pupov.ru

Бактериальная РНК-полимераза (РНКП) является одной из наиболее привлекательных клеточных мишеней для создания новых антибактериальных препаратов. Несколько известных антибиотиков, наиболее важным из которых является рифампицин, ингибируют активность РНКП и используются при лечении различных заболеваний. К сожалению, возбудители бактериальных инфекций с достаточно высокой частотой приобретают устойчивость к антибиотикам. Таким образом, очень актуальным является вопрос разработки новых ингибиторов РНКП, которые обладали бы положительными фармакологическими свойствами известных антибиотиков, но имели бы другой механизм действия на РНКП и другой сайт связывания на ферменте, что позволило бы преодолеть проблему существующей устойчивости.

Нами охарактеризованы новые лиганды к бактериальной РНКП на основе оцДНК-аптамеров, которые связываются с РНКП с высокой аффинностью и специфичностью. В частности, с использованием методов отбора *in vitro* получено несколько различных классов аптамеров, которые взаимодействуют с кор-ферментом, либо с холоферментом РНКП *Escherichia coli*. С использованием мутантных вариантов РНКП сайты связывания аптамеров локализованы в разных участках фермента. Показано, что полученные аптамеры способны ингибировать инициацию транскрипции и взаимодействие РНКП с промоторами, по-видимому, за счет конкуренции с ДНК за связывание с ферментом. Некоторые из полученных аптамеров способны также конкурировать за связывание с антибиотиком рифампицином, что указывает на перекрывание сайтов связывания данных лигандов с РНКП. В перспективе полученные ДНК-аптамеры послужат основой для разработки тест-системы, позволяющей проводить скрининг соединений, связывающихся в тех же функционально-важных районах РНКП, что и аптамеры, и ингибирующих работу фермента.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (госконтракт № 02.740.11.0771) и Гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых ученых (МД-618.2011.4).

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЗМАРКЕРНЫХ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ В КАЧЕСТВЕ БИОБЕЗОПАСНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГЕПАТИТА В

Пучко Е.Н., Рукавцова Е.Б., Бурьянов Я.И.

Филиал Учреждения РАН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290 Пущино, Московская обл., просп. Науки, 6

E-mail: Elena.puchko@gmail.com

Целью работы стало получение безмаркерных растений с геном поверхностного антигена вируса гепатита В (*HBsAg*) и исследование иммуногенности полученных растений. Разработан способ получения трансгенных растений, не содержащих селективных генов устойчивости к антибиотикам и гербицидам. При его использовании сокращается время отбора трансгенных растений и появляется возможность прямой количественной оценки синтеза продукта целевого гена с помощью ИФА. Для трансформации растений создана плазмида рВМ-Ag, содержащая ген *HBsAg* под контролем двойного промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты CaMV 35SS без селективного гена устойчивости к канамицину *nptII*. Разработан метод трансформации растительных эксплантов, позволяющий повысить эффективность получения трансформантов до 10–20%.

Синтезированный в растениях поверхностный антиген вируса гепатита В по своим физико-химическим и иммунологическим свойствам не отличался от антигена, полученного из клеток дрожжей. На лабораторных мышах проведен анализ иммуногенности пероральной вакцины против гепатита В на основе трансгенных растений картофеля. В эксперименте использовали три группы лабораторных аутбредных мышей NMRI. Мыши двух групп питались трансгенным картофелем, синтезирующим HBs-антиген. Одна из групп мышей получала в качестве адъюванта ГМДП. Сыворотка крови иммунизированных животных проанализирована с помощью иммуноферментного анализа. Уровень антител к HBs-антигену был значительно выше протективного (до 350 ммЕ/мл) и сохранялся в течение более года после начала иммунизации. До настоящего времени не существовало данных о мониторинге иммунитета к вирусу гепатита В такой продолжительности при использовании трансгенных растений в качестве съедобной вакцины. Полученные данные показывают перспективность использования трансгенных растений в качестве субстанции для производства безопасной съедобной вакцины против вируса гепатита В.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (проект № 11-08-00413) и Программы Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере «Участник молодежного научно-инновационного конкурса (У.М.Н.И.К)»-2009.

ПРОТЕИНАЗА 3С ВИРУСА ГЕПАТИТА А ЧЕЛОВЕКА ВЫЗЫВАЕТ КАСПАЗОНЕЗАВИСИМУЮ ГИБЕЛЬ РАКОВЫХ КЛЕТОК

Шубин А.В., Лунина Н.А., Рощина М.П., Демидюк И.В., Костров С.В.

Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН,
123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2

E-mail: shav@inbox.ru

Развитие генной терапии онкологических заболеваний даёт надежду на разработку новых эффективных методов лечения рака. Одной из наиболее перспективных современных парадигм генной терапии злокачественных опухолей является введение в раковые клетки генов, которые способны индуцировать клеточную гибель. В рамках этого подхода создан ряд перспективных лекарственных средств, часть из которых находится в стадии доклинических и клинических испытаний. В то же время, в связи с разнообразием раковых опухолей не представляется возможным найти одно универсальное средство для лечения всех онкологических заболеваний. Поэтому поиск новых генов – агентов противораковой терапии остаётся чрезвычайно актуальным. В данной работе исследована возможность использования гена протеиназы 3С вируса гепатита А человека (3Cpro) в качестве потенциального противоракового геннотерапевтического агента.

Цитотоксическое действие гена 3Cpro было оценено с использованием раковых клеток лёгкого человека линий A549 и Calu-1. Тип клеточной гибели определяли по морфологическим признакам, проницаемости клеточной мембраны, активности каспаз и экспонированию фосфатидилсерина на внешней стороне цитоплазматической мембраны.

Введение гена 3Cpro вызывает гибель более 80% раковых клеток. При этом гибель клеток происходит по нескольким механизмам. Первый характеризуется активацией каспаз и другими признаками, характерными для апоптоза. Второй механизм является каспазонезависимым и сопровождается интенсивным накоплением в цитоплазме вакуолей предположительно лизосомального происхождения. Агенты, запускающие альтернативные апоптозу механизмы клеточной гибели, рассматриваются как перспективные благодаря их способности вызывать гибель клеток, резистентных к индукторам апоптоза.

Полученные результаты позволяют считать ген протеиназы 3С перспективным агентом противораковой генной терапии.

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ СИМПОЗИУМА. ЗАОЧНОЕ УЧАСТИЕ

ИССЛЕДОВАНИЕ ПУТЕЙ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПРОТИВОВИРУСНЫХ СВОЙСТВ ПРОИЗВОДНЫХ АДАМАНТАНОВОГО РЯДА В ОТНОШЕНИИ ВИРУСОВ ГРИППА А H1N1v И H3N2 С ПОМОЩЬЮ АМИНОКИСЛОТНЫХ И ПЕПТИДНЫХ ОСТАТКОВ

Гараев Т.М., Шибнев В.А., Финогенова М.П., Шевченко Е.С., Бурцева Е.И.

ФГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития РФ, 123098 Москва, ул. Гамалеи, 16

E-mail: gtim@fmradio.ru

В результате химического прессинга адамантансодержащих препаратов на вирусы гриппа А H1N1v и H3N2 к ним возникла резистенция достигающая 90%. Это является следствием произошедшей у этих вирусов мутации, в результате которой возникли аминокислотные замены в протонпроводящем канале, образованным белком М2. В этом случае ремантадин (Rem-) уже не влияет на транспорт протонов, обеспечивающий репликацию вируса. Одним из путей реанимации в ремантадине противовирусной активности может быть обеспечение адамантанового карбоцикла дополнительными функционально активные группами (имдазольной, гуанидиновой и др.), используя для этого аминокислоты или пептиды. К ремантадину, имеющему одну аминогруппу, их можно присоединять методом смешенных ангидридов, используя для защиты соответствующих аминогрупп аминокислот и пептидов Boc-группу. Была получена серия соединений, противовирусная активность которых была оценена методом ИФА с использованием штаммов A/IIV-Moscow/01/2009 (H1N1)v и A/Москва/26/2009 (H3N2), резистентных к ремантадину. Процент ингибирования вирусной активности соединениями определяли, как отношение (оптическая плотность $(ОП)_{492}$ опыта минус $ОП_{492}$ клеточного контроля / $ОП_{492}$ вирусного контроля минус $ОП_{492}$ клеточного контроля), умноженного на 100%. В зависимости от их противовирусной активности их можно разделить на две группы. Одна включает восстановленную противовирусную активность порядка 50%, другая – от 70 до 90%. К последним относятся гистидил-1-адамантоил-1-этиламин (His-Rem), 94%; ди-Boc-орнитил-1-адамантоил-1-этиламин (ди-Boc-Orn-Rem), 70%; Boc-саркозил-1-адамантоил-1-этиламин (Boc-Sar-Rem), 70%; 1-адамантоил-1-этил-2 аминоэтансульфоновой кислоты (таурил-Rem), 70%; 1 - адамантоил-1-этиламид-α-липоевой кислоты 80%; $(Boc)_2$-Lis-Lis(Z)-1-адамантоил этиламин, 70%; бис-[метиловый эфир серина]-1,3-адамантаилдиуксусной кислоты, $(1,3\text{-Ad-}(CH2\text{-}Ser(OCH3))_2)$, 98%. Производные ди- и триглицинов, а также ди- и трипролинов были неактивны. Рассматривается зависимость противовирусной активности в отношении вирусов гриппа А от структуры полученных соединений.

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ У МОЛОДЫХ И СТАРЫХ ЖИВОТНЫХ

Линькова Н.С., Чалисова Н.И., Концевая Е.А., Катанугина А.С., Хавинсон В.Х.

Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, 197110 С.-Петербург, пр. Динамо, 3

E-mail: miayy@yandex.ru

Пептидная регуляция активности иммуногенеза в периферических органах иммунной системы является важным аспектом в профилактике ускоренного старения. Целью исследования явилось изучение влияния пептидов на пролиферацию цитотоксических Т-лимфоцитов селезенки молодых и старых крыс в органотипической культуре.

Культивирование фрагментов селезенки молодых и старых крыс (37С, 5% CO_2) проводили в чашках Петри в 3 мл среды (45% раствора Хенкса, 45% среды Игла, 10% FBS, глюкоза 10 мг/мл, гентамицин 0.5 мг/мл). Исследовали 8 контрольных культур и 24 культуры с введением дипептида H-Lys-Glu-OH, трипептида H-Lys-Glu-Asp-OH и тетрапептида АЕ-0 H-Ala-Glu-Asp-Gly-OH в концентрации 10 нг/мл. Через 3 сут культуры фиксировали 95% этанолом для проведения иммуноцитохимии. Первыми антителами служили моноклональные мышиные антитела к недифференцированным цитотоксическим Т-лимфоцитам CD8 (1:30, Novocastra), вторыми антителами служил набор биотинилированных иммуноглобулинов. Оценку относительной площади окрашивания в % проводили на системе компьютерного анализа изображений Nikon Eclipse в программе «Видеотест-Морфология 5.0».

Площадь экспрессии CD8 в контрольных культурах селезенки у молодых крыс составила 0,69±0,19%, тогда как у старых крыс экспрессия CD8 возрастала в 9,3 раза и составила 6,40±0,45%. Под действием дипептида площадь экспрессии CD8 у молодых крыс возрастала относительно соответствующего контроля в 13,6 раза (9,38±2,80%, $p<0,05$). У старых животных дипептид усиливал экспрессию CD8 в 4,6 раза относительно контрольной группы старых животных (29,57±0,54%, $p<0,05$). Трипептид не влиял на экспрессию маркера цитотоксических Т-клеток у молодых крыс, но способствовал увеличению данного показателя в 4 раза у старых животных относительно контроля (25,62±3,83%, $p<0,05$). Тетрапептид не влиял на экспрессию маркера CD8 у молодых крыс и подавлял его экспрессию у старых животных.

Полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемые короткие пептиды оказывают тканеспецифическое стимулирующее действие на иммуногенез селезенки при старении организма.

ВЛИЯНИЕ СЕЛАНКА НА АКТИВНОСТЬ ОСНОВНЫХ КАРБОКСИПЕПТИДАЗ В НЕРВНОЙ ТКАНИ КРЫС

Соловьев В.Б.[1], Генгин М.Т.[1], Мясоедов Н.Ф.[2]

[1]*Пензенский государственный педагогический университет имени В.Г. Белинского, Пенза, ул. Лермонтова, 37*
[2]*Учреждение РАН Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2*

В исследованиях последних лет показано, что наряду с анксиолитическим действием гептапептид селанк оказывает также целый ряд других эффектов – ноотропный, стимулирующий и стресс-протективный. Нейрохимические механизмы действия селанка до настоящего времени остаются малоизученными. Было высказано предположение о том, что психотропный эффект селанка может быть связан с его способностью ингибировать ферменты деградации энкефалинов, обеспечивая тем самым их накопление. Однако уровень регуляторных пептидов зависит не только от активности ферментов их деструкции, но от соотношения скоростей их синтеза и распада.

Целью нашей работы было изучение влияния селанка на активность карбоксипептидазы Е (КПЕ) и ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы (ФМСФ-КП), ферментов генеза энкефалинов и других регуляторных пептидов в отделах головного мозга и надпочечниках крыс. Селанк вводили интраназально в дозе 300 мг/кг, контрольной группе вводили равный объем дистиллированной воды.

Введение селанка вызывало существенное снижение активности КПЕ в гипофизе и в гипоталамусе, сохраняющееся до 24 ч после воздействия, по сравнению с контрольной группой, у которой наблюдалось повышение активности КПЕ, вызванной введением дистиллированной воды. Полученные результаты свидетельствуют о стресс-протективном действии селанка путем ингибирования гипоталамо-гипофизарной системы и уменьшения секреции и образования стресс-пептидов при его введении. В стриатуме активность КПЕ повышалась через 4 ч после инстилляции препарата, в то время как в надпочечниках активность фермента превышала значения контрольной группы на протяжении всего времени исследования. В надпочечниках было отмечено также повышение активности ФМСФ-КП через 0,5, 4 и 24 ч после введения селанка.

Стриатум и надпочечники являются отделами, в которых синтезируется большое количество нейропептидов, в том числе Met- и Leu-энкефалины, обладающие выраженным стресс-протективным действием. Таким образом, повышение активности ферментов процессинга этих пептидов может опосредовать анксиолитический и стресс-протективный эффект селанка.

КОРОТКИЕ ПЕПТИДЫ СТИМУЛИРУЮТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА HSPA1A БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА У ЛЮДЕЙ

Трофимова С.В., Линькова Н.С., Трофимов А.В., Дудков А.В., Хавинсон В.Х., Горчаков А.А.

Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, 197110 С.-Петербург, пр. Динамо, 3

E-mail: miayy@yandex.ru

Многолетний опыт применения пептидных биорегуляторов, разработанных в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН позволил предположить, что их многочисленные эффекты проявляются на всех уровнях организации живого, в том числе и на уровне генов. В связи с этим, целью исследования явилось изучение влияния коротких пептидов на экспрессию гена белка теплового шока HSPA1A у человека.

Объектом исследования служили 20 молодых женщин, разделенных на 2 равные группы – контрольную, не получавшую пептиды, и опытную, получавшую короткие пептиды в виде биологически активных добавок (по 1 капсуле 2 раза в день в течение 20 дней). Всем женщинам опытной группы был назначен иммуномодулирующий пептид H-Glu-Asp-Pro-OH. В зависимости от степени выраженности риска развития различных заболеваний в комбинации с иммуномодулирующим пептидом был назначен пептид H-Lys-Glu-Asp-OH (при наличии генных мутаций, повышающих риск развития сердечно-сосудистых заболеваний – 4 человека), пептид H-Asp-Arg-OH (при наличии генных мутаций, повышающих риск развития болезни Альцгеймера – 4 человека) и 2 женщинам с повышенным риском развития сахарного диабета был назначен пептид H-Lys-Glu-Asp-Trp-NH2. Экспрессия гена белка теплового шока HSPA1A оценивалась методом ПЦР в реальном времени с использованием красителя SYBRGreen. Экспрессию определяли до и после приема пептидов и в контрольной группе (2 измерения).

В контрольной группе при первичном измерении экспрессия гена HSPA1A составила 2,3±0,08 и достоверно не отличалась от данных повторного измерения – 2,0±0,16. В опытной группе до приема пептидных препаратов экспрессия гена HSPA1A составила 1,9±0,13. После приема комплекса коротких пептидов экспрессия гена HSPA1A составила 4,4±0,15, что примерно в 2 раза выше по сравнению с исходным значением в опытной группе и контролем ($p<0,05$). Полученные данные свидетельствуют об усилении экспрессии гена белка теплового шока под воздействием комплекса коротких пептидов, что указывает на их антистрессорный эффект, в основе механизма действия которого лежит пептидная регуляция экспрессии генов.

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА LysK С ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТАМИ

Филатова Л.Ю.[1], Гладилин А.К.[1], Кабанов А.В.[2], Клячко Н.Л.[1]

[1]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр.11
[2]Durham Research Center 1036, 985830 Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-5830, U.S.A.

E-mail: luboff.filatova@gmail.com

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) является возбудителем тяжелых заболеваний внутренних органов, кожи, горла. Лечение антибиотиками инфекций, вызываемых *Staphylococcus aureus*, малоэффективно, так как почти 90% штаммов золотистого стафилококка к ним резистентны. Бактериофаги – вирусы бактерий, продуцирующие в процессе жизненного цикла ферменты, которые способны разрушать бактериальные клеточные стенки и могут рассматриваться в качестве серьезной альтернативы антибиотикам. В данной работе будет рассматриваться фермент LysK, лизирующий антибиотикорезистентные штаммы *Staphylococcus aureus*.

Одной из проблем, ограничивающей использование в медицине фермента, является его низкая стабильность при хранении – LysK теряет половину активности за 0.5–7 суток при 22ºC и за 0.05–4 часа при 37ºC (в зависимости от pH). Методами кинетических измерений, седиментации, электрофореза показано, что при концентрациях 0.05–0.5 мг/мл, pH 6-9, 22–40ºC LysK инактивируется по агрегационному механизму. Подавление агрегации (увеличение стабильности LysK) может быть достигнуто при образовании комплексов фермент-полиэлектролит.

Взаимодействие LysK с полианионами (полиакриловые кислоты 5–240 кДа, декстран сульфаты 5–500 кДа) при pH ниже изоэлектрической точки фермента (pI 8.6) и молярных соотношениях полимер/белок от 1 до 100 приводило к практически полной инактивации фермента в течение 5–10 минут после сливания растворов полимера и LysK. Причины наблюдаемых явлений обсуждаются.

Включение фермента в комплекс с поликатионом – полибреном (5 кДа) привело к увеличению стабильности LysK без изменения активности. При pH 9.0 (выше pI), молярных соотношениях полимер/фермент от 1 до 15, температурах 22–37ºC значения констант инактивации второго порядка уменьшались в на 1-2 порядка. После модификации молекул фермента янтарным ангидридом до степеней 30–70% (для увеличения числа электростатических контактов между молекулами LysK и полиэлектролита и сдвигу значений pI в область меньших pH) удалось добиться сохранения активности фермента при 22ºC и pH 7.5 в течение 4 месяцев.

ТРИПЕПТИД РЕГУЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ

Хавинсон В.Х., Кветной И.М., Полякова В.О., Линькова Н.С.

Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, 197110 С.-Петербург, пр. Динамо, 3

E-mail: miayy@yandex.ru

Короткие пептиды обладают рядом стимулирующих эффектов, однако механизмы антиоксидантного действия пептидных биорегуляторов на уровне генома до сих пор недостаточно изучены. Целью данной работы явилось исследование пептидной регуляции генома в модели язвы желудка. Выбор указанной модели обусловлен тем, что язвенная болезнь сопровождается нарушением функционирования белков антиоксидантной системы организма.

Исследование проведено на 24 самцах крыс линии Sprague-Dawley массой 180–220 г, разделенных на 3 равные группы: 1 группа – интактные крысы, 2 группа – моделирование язвы + введение физиологического раствора и 3 группа – моделирование язвы + введение трипептида H-Glu-Asp-Gly-OH. Язву моделировали путем трехкратного введения в желудок крысы через каждые 4 часа цистамина-HCL (Aldrich, Milwannee, WI) в дозе 25 мг/100 г массы тела. Одновременно с первым введением цистамина-HCL в желудок крысы вводили культуру *Helicobacter pylori* (Curtin Matheson Scientific Inc, штамм Cag J117, 100 микробных клеток). Трипептид вводили подкожно в дозе 0,5 мкг в 0,5 мл физиологического раствора ежедневно в течение 5 дней с момента возникновения язвы. Материал для исследования методом ПЦР в режиме реального времени брали из края язвы на 7 сутки. Экспрессию матричной РНК (мРНК) определяли для антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (SOD) и циклооксигеназы Cox-2 в условных единицах (у.е.).

В контроле экспрессия мРНК SOD составила 0,05±0,009 у.е., при возникновении язвы данный показатель достоверно возраста до 0,25±0,07 у.е., а при введении трипептида снижался до нормального уровня и составил 0,07±0,009 у.е. Экспрессия мРНК циклооксигеназы Cox-2 в контроле составила 0,23±0,07 у.е, при индукции язвы этот показатель возрастал до 0,45±0,07 у.е. и после действия трипептида достоверно снижался до 0,34±0,01 у.е.

Применение трипептида при индуцированной язве желудка приводит к снижению синтеза мРНК ферментов антиоксидантной защиты SOD и Cox-2 до контрольного уровня, что свидетельствует о том, что в основе репарационного эффекта исследуемого пептида лежит его способность регулировать экспрессию генов, кодирующих белки антиоксидантной системы.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ЭВОЛЮЦИИ: ПЕПТИДЫ РЕГУЛИРУЮТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ И УВЕЛИЧИВАЮТ РЕСУРС ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ ОРГАНИЗМА

Хавинсон В.Х.[1], Малинин В.В.[1], Ванюшин Б.Ф.[2]

[1]*Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, 197110 С.-Петербург, пр. Динамо, 3*
[2]*НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, кор.А*

E-mail: ibg@gerontology.ru

Введение коротких пептидов животным увеличивает среднюю продолжительность жизни на 30–40% и подавляет рост спонтанных, индуцированных и перевиваемых опухолей. Пептиды Glu-Trp, Lys-Glu, Ala-Glu-Asp-Gly, Ala-Glu-Asp-Pro влияют на экспрессию генов в миокарде и головном мозге при введении мышам in vivo. Введение пептидов трансгенным мышам подавляет в 2–4 раза экспрессию гена рака молочной железы HER-2/neu, что коррелирует с уменьшением размеров аденокарциномы. Пептиды у мышей и крыс повышают экспрессию генов IL-2 и *c-fos* в лимфоцитах и различных структурах гипоталамуса, что во многом обусловливает иммуномодулирующие, онкомодифицирующие и стресспротекторные свойства этих веществ. Впервые установлены механизмы геропротекторного действия коротких пептидов, связанные с активацией хроматина в лимфоцитах крови пациентов старческого возраста. Обработка пептидом Ala-Glu-Asp-Gly фибробластов человека способствует индукции теломеразной активности и удлиняет теломеры в 2,5 раза по сравнению с контролем, что приводит к увеличению на 42,5% числа делений клеток, т.е. преодолению лимита Хейфлика.

Применение пептидов у людей пожилого и старческого возраста восстанавливает метаболизм, повышает уровень мелатонина, улучшает различные физиологические функции организма и снижает смертность у них в период 8–12-летнего рандомизированного клинического изучения на 44–49% по сравнению с контрольной группой.

Установлено, что большинство изученных пептидов связывается с дву- и одноцепочечными дезоксирибоолигонуклеотидами, содержащими CG и CNG последовательности, которые являются мишенями для метилирования ДНК у эукариот. Выявлено, что пептиды специфически модулируют *in vitro* действие эукариотических CG- и CNG-сайт-специфических эндонуклеаз (WEN1 и WEN2) на ДНК в зависимости от статуса ДНК метилирования. В большинстве случаев пептиды значительно ингибируют гидролиз ДНК этими ферментами. Вероятно, модуляция действия эндонуклеаз на гидролиз ДНК происходит благодаря сайт-специфическому связыванию пептид-ДНК, которое защищает ДНК от ферментативного гидролиза. Предполагается, что связывание пептидов с промоторными CG или CNG сайтами ДНК делает эти сайты недоступными для ДНК-метилтрансфераз, в результате чего промотор остается неметилированным, что является решающим фактором активации большинства генов.

Таким образом, короткие пептиды распознают и взаимодействуют со специфическими последовательностями ДНК, а также проявляют свою биологическую активность в зависимости от характера метилирования ДНК. Специфические (комплементарные) пептид-ДНК взаимодействия могут эпигенетически контролировать генетические функции клеток, способствуя восстановлению гомеостаза и увеличению продолжительности жизни.

АКТИВНОСТЬ ДИПЕПТИДИЛПЕПТИДАЗЫ-4 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ С ГИПОКСИЧЕСКИ-ИШЕМИЧЕСКИМ ПОРАЖЕНИЕМ ЦНС

Яковлева А.А.[1], Золотов Н.Н.[2], Колясникова К.Н.[2], Соколов О.Ю.[3], Михеева И.Г.[1], Корнеева Е.В.[1], Верещагина Т.Г.[1], Кост Н.В.[3]

[1]РГМУ, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1
[2]Учреждение РАМН НИИ фармакологии им. П.К. Закусова РАМН, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8
[3]Научный центр психического здоровья РАМН, 115552 Москва, Каширское шоссе, 34

E-mail: oleg-sokolov@yandex.ru

Дипептидилпептидаза-4 (ДПП-4, EC 3.4.14.5) – сериновая пептидаза, гидролизующая пролинсодержащие связи нейропептидов. Показано ее участие в регуляции нервной, а также иммунной и эндокринной систем организма. Изучение активности ДПП-4 у новорожденных с гипоксически-ишемическим поражением (ГИП) ЦНС ранее не проводилось и вызывает определенный интерес.

В пилотном исследовании принимали участие 13 доношенных новорожденных детей с ГИП ЦНС. Активность фермента определяли флуоресцентным методом на спектрофлуориметре LS-5b (Perkin-Elmer) при длине волны 380/460 нм.

Было показано, что у детей с ГИП ЦНС на 2–7 сутки жизни активность ДПП-4 составляет 2.23±0.20 нмоль/мин/мл. Выявлена прямая корреляционная зависимость между показателями активности ДПП-4 сыворотки крови детей с ГИП ЦНС и балльной оценкой степени тяжести при рождении по шкале Апгар ($R=0,68$, $p<0,01$), обратная корреляционная зависимость между активностью фермента и массо-ростовым индексом Тура ($R=-0,49$, $p<0,05$), отражающем состояние упитанности плода, активность ДПП-4 не зависела от тяжести состояния ребенка на момент обследования. Интересно отметить, что активность ДПП-4 прямо коррелировала с активностью аспартатаминотрансферазы сыворотки крови ($r = 0.43$, $p<0,05$), что хорошо согласуется с данными, полученными ранее в экспериментах на животных. На фоне комплексной терапии новорожденных детей с ГИП ЦНС активность ДПП-4 к 3–4 недели жизни увеличилась до 3.04±0.19 нмоль/мин/мл, что достоверно превышает ($p<0,05$) показатели активности фермента на 2–7 сутки жизни и не отличается от значений здоровых взрослых (3.15±0.07 нмоль/мин/мл, $n=20$).

Таким образом, впервые у новорожденных с ГИП ЦНС выявлена взаимосвязь активности ДПП-4 на 2–7 сутки жизни с оценкой степени тяжести при рождении, состоянием упитанности плода к концу внутриутробного развития, а также показана динамика активности фермента на фоне терапии.

Работа поддержана грантом РФФИ № 10-04-01781-а.

ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ДИПЕПТИДИЛПЕПТИДАЗЫ-4 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЗДОРОВЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ И ИХ МАТЕРЕЙ

Яковлева А.А.[1], Золотов Н.Н.[2], Колясникова К.Н.[2], Соколов О.Ю.[3], Михеева И.Г.[1], Кост Н.В.[3]

[1]РГМУ, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1
[2]Учреждение РАМН НИИ фармакологии им. П.К. Закусова РАМН, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8
[3]Научный центр психического здоровья РАМН, 115552 Москва, Каширское шоссе, 34

E-mail: oleg-sokolov@yandex.ru

Ранее нами была установлена взаимосвязь концентрации экзогенных опиоидных пептидов казоморфинов с уровнем психомоторного развития детей первого года жизни. Основным ферментом, регулирующим уровень казоморфинов в крови, является дипептидилпептидаза-4 (ДПП-4, EC 3.4.14.5). Изучение фермента у здоровых новорожденных и их матерей ранее не проводилось и поэтому представляет несомненный интерес. На этапе родильного дома обследовано 32 здоровые матери и их новорожденные дети. Средний возраст матерей – 26,4±0,9 лет**.** Беременность и роды протекали физиологически. Все новорожденные родились через естественные родовые пути. Оценка по шкале Апгар при рождении у всех детей составила 7,7±0,1, через пять минут – 8,4±0,1 баллов. Средняя масса тела при рождении – 3422,9±60,3 г, средняя длина тела при рождении – 51,9±0,4 см. Активность фермента определяли флуоресцентным методом на спектрофлуориметре LS-5b (Perkin-Elmer), измерение вели при 380/460 нм.

Активность ДПП-4 в пуповинной крови новорожденных детей составила 3,32±0,39 нмоль/мин/мл. У их матерей за 3–6 часов до родов она была достоверно выше ($p<0,05$) и составила 5,54±0,42 нмоль/мин/мл. Выявлена обратная корреляционная зависимость ($r = -0,51$, $p<0,05$) между активностью ДПП-4 и временем до окончания родоразрешения. Через 3 дня после родов активность ДПП-4 у родильниц достоверно ($p<0,05$) снижалась до 4,29±0,49 нмоль/мин/мл. При этом активность фермента у родильниц до и после родов прямо коррелировала между собой ($r = 0,42$). Значения активности ДПП-4 в сыворотке крови матерей, как до, так и после родов, достоверно ($p<0,001$) превышали показатели здоровых женщин-доноров (3,15±0,07 нмоль/мин/мл, $n=20$). Интересно отметить, что какой-либо зависимости между показателями активности ДПП-4 в пуповинной крови детей и венозной крови их матерей до и после родов в данном исследовании нами не выявлено.

Таким образом, впервые показано, что ДПП-4 принимает активное участие в реализации стресса, связанного с родами, причем, по-видимому, исследуемая ферментная система новорожденного функционирует автономно от матери.

Работа поддержана грантом РФФИ № 10-04-01781-а.

АВТОРСКИЙ ИНДЕКС

Privalov P.L. 51
Haertlé T. 221, 371
Veit M. 86

Абатурова С.Б. 133, 394
Абрамов В.Ю. 203
Абрамчик Ю.А. 315
Аваков А.Э. 325
Авакян М.Э. 128, 150
Адамова И.Ю. 75
Азаркин И.В. 56
Азев В.Н. 170, 179
Азьмуко А.А. 70, 75, 152, 176, 418
Акимов М.Г. 257
Акпаров В.Х. 219
Александрова И.Ю. 145
Александрова С.С. 410
Алексеев Д.Г. 45
Алешин А.В. 185
Алиев Т.К. 77
Аллилуев А.П. 128, 150
Алфеева Л.Ю. 254
Амарантов С.В. 119, 188
Андреев В.П. 93
Андреев Я.А. 157, 211, 293
Андреева И.Н. 205
Андреева Л.А. 109, 140, 206, 220, 225, 254, 256, 341, 363, 412
Андреева Т.В. 99
Андреева Ю.Ю. 124, 250
Андрианов Р.М. 410
Аникаев А.Ю. 357
Аниол В.А. 138
Анисимов В.Н. 223
Анохина В.В. 222
Антипова Н.В. 122, 417
Антонов С.А. 97
Аполонник Н.В. 217, 352
Арапиди Г.П. 56
Ардемасова З.А. 215
Арефьева Т.И. 152
Арзуманян В.Г. 172
Арсеньев А.С. 44
Арсеньева Е.Л. 97
Артемов А.В. 285
Артемова Н.В. 358
Артемьев И.В. 193
Артемьев М.В. 83
Артемьева А.И. 149
Архипова В.И. 359, 385
Архипова С.Ф. 193
Арчаков А.И. 40, 151
Астафьева А.А. 265
Астахова Т.М. 133, 394, 395
Атанов М.С. 109, 220
Аттанасио Ф. 188
Афанасьева М.И. 75
Афанасьева О.И. 75
Бабаков В.Н. 143, 275, 281, 286
Бабиченко И.И. 107
Бабкина И.Н. 411
Багина У.С. 239
Багликова К.Е. 143
Багрова Д.И. 397
Баженова М.В. 360
Базалеев Н.А. 45
Байкалова Е.А. 266
Байков И.К. 411, 419
Байрамов А.В. 208
Бакаева З.В. 348
Бакулин А.В. 261
Балабан Н.П. 236, 405
Балашов А.М. 262
Балашова М.В. 393
Балицкая Е.Д. 81
Балобанов В.А. 316
Баранова Н.Б. 268
Барановская А.Ю. 244

Баратова Л.А. 189
Бардинова Ж.С. 252
Барыкина Н.В. 338
Баскова И.П. 122
Батищева Е.Ю. 140, 412
Бачева А.В. 130, 401
Безбородова О.А. 229
Безуглов В.В. 257
Бейрахова К.А. 413
Белогуров А.А. 130, 305, 401
Белогуров А.А.-мл. 148
Белогурова Н.Г. 291, 325
Белозерский М.А. 237, 242, 407
Беляева М.Л. 262, 412
Белякова А.С. 339, 350
Беркут А.А. 308
Берчатова А.А. 101
Беспалова Ж.Д. 70, 75, 134, 152, 176, 418
Бикетов С.Ф. 77
Биневский П.В. 365, 406
Биссессар Э. 101
Бичучер А.М. 128, 150
Бобик Т.В. 73, 301, 306, 370
Бобкова Н.В. 145
Боброва И.А. 101
Богатова О.В. 105
Богатырев М.Е. 133, 393
Богачева Е.Н. 189, 194
Богачук А.П. 104, 107
Богданов А.А. 386
Богданова Л.Р. 361
Богомягкова Ю.В. 395
Божок Г.А. 395
Божокина Е.С. 126, 238
Болдырев И.А. 417
Болдырева Е.Ф. 182, 186
Бондарева В.М. 345, 351
Бондаренко Н.С. 340
Бондаренко Т.П. 395
Бондырева Н.М. 247
Бончук А.Н. 369
Борвинская Е.В. 216, 269
Борзенкова А.В. 136
Борзова В.А. 270
Борисов Ю.А. 68
Борисова А.Г. 192
Боровская Т.Г. 260, 261
Бочаров Э.В. 44
Бочарова О.В. 44
Бошкова Е.А. 317
Бражников Е.В. 190
Бубляев Р.А. 198
Бубуненко М.Г. 372
Булыгин К.Н. 387
Бунеева О.А. 158
Бурая Т.А. 175
Буров С.В. 180
Бурцева Е.И. 425
Бурьянов Я.И. 412
Буряк А.К. 295, 323, 334
Бушуев В.Н. 70, 176
Бычкова В.Е. 316
Вагида М.С. 178
Вайчюлионис Т.С. 396
Валеева Л.Р. 405
Валеева О.А. 160
Валиуллина Ю.А. 362
Валуев И.Л. 153
Валуев Л.И. 153
Валуева Т.А. 153, 245, 289
Ванцева С.И. 171
Ванюшин Б.Ф. 232, 431
Варламов В.П. 267, 303
Василевский А.А. 60, 226, 282, 308, 336, 383
Васильев Д.С. 397
Васина Д.В. 271
Васьковский Б.В. 69, 171
Вахромова Е.А. 238
Великодворская Г.А. 159
Венжик Ю.В. 251
Веньяминова А.Г. 387
Верещагина Т.Г. 432
Виленский Д.А. 225
Виноградова И.А. 223
Виноградова Т.В. 132
Вихлянцев И.М. 65
Вихрова М.А. 298
Власов Г.П. 296, 391
Войтенко Н.Г. 230, 281
Войтенков Б.О. 230
Волков В.В. 188
Волкова Т.Д. 145
Волкова Т.О. 239
Володина М.А. 206
Волынский П.Е. 81, 88
Волынский П.В.
Вольпина О.М. 145
Воробьев Ю.Н. 239, 387
Воробьева Е.Е. 105, 272
Воробьева Н.Е. 66, 305
Воробьева Н.Н. 117,
Ворожцов Г.Н. 134

Воротникова Е.А. 398
Воскресенская О.Г. 207, 339, 350
Вульфиус Е.А. 58, 99
Вьюнова Т.В. 254, 363
Габдулхаков А.Г. 191, 201, 228, 377
Габибов А.Г. 46, 73, 130, 135, 148, 301, 305, 306, 325, 370, 401
Гавриленко Н.В. 267
Гаврилова С.А. 259
Галзитская О.В. 319
Галямина М.А. 45
Галямина М.Ю. 57
Гамалей И.А. 238
Гараев Т.М. 425
Гаранин С.К. 171
Гарбер М.Б. 80, 201, 202, 227, 228, 307, 357, 359, 360, 372, 373, 374, 377, 385
Гасанов Е.В. 113, 132, 396
Гвоздев В.А. 164
Гвоздева Е.Л. 245
Генгин М.Т. 73, 248, 252
Генералова А.Н. 83
Генкин Д.Д. 427
Гиличинский Д.А. 78
Гитинов М.М. 291
Гладилин А.К. 429
Гладилович В.Д. 273, 275, 281
Глазова Н.Ю. 109, 206, 220
Говорун В.М. 45, 56, 57
Гоглев Ю.В. 328
Гоголев Ю.В. 292, 299, 364
Гоголева Н.Е. 221, 364
Головин А.В. 386
Головнин А.К. 390
Голубович В.П. 74, 90, 175, 207, 234, 414
Голубович Д.В. 74, 90
Голышев С.А. 239, 240
Гонгадзе Г.М. 357, 372, 374
Гончаров Н.В. 275, 281, 286
Гоптарь И.А. 398, 407
Горбачева Е.В. 58, 99
Горбачева Л.Р. 134
Горбачева М.А. 170, 224
Горбунова Е.Ю. 170
Гордеев А.Б. 317, 318
Гордеева Е.А. 173
Горина С.С. 292, 364
Горчаков А.А. 428
Горшков О.В. 268
Горшкова Т.А. 62
Горюнов А.С. 92, 192
Горячева Е.А. 193
Горячева К.А. 330
Градюшко А.Т. 178
Грайфер Д.М. 387
Гранстрем О.К. 138, 149, 259, 260, 261
Грецкая Н.М. 257
Гречкин А.Н. 292, 299, 328, 364
Грибовская О.В. 90, 175, 414
Гривенников И.А. 97
Григорьев И.И. 114
Гринкевич В.А. 272, 274
Гришин Е.В. 49, 60, 157, 211, 226, 282, 288, 290, 308, 336, 383
Громова Е.В. 274
Громова Т.Ю. 241
Грудень М.А. 103
Гудашева Т.А. 141, 142, 174
Гуляева Н.В. 138
Гуранда Д.Ф. 231
Гурвиц Б.Я. 358
Гурская Н.Г. 330
Гурьянова С.В. 182
Гусева А.А. 340
Давыдова Г.А. 389
Давыдова М.Н. 283
Дадаян А.К. 68, 69
Данилкович А.В. 95
Данилова Ю.В. 236
Данюкова Т.Н. 365
Дворцов И.А. 159
Деев И.Е. 379, 384
Деев С.М. 148
Дейгин В.И. 139, 257, 343
Демидюк И.В. 126, 132, 241, 408, 423
Демина И.Ю. 57
Дёмина И.А. 45
Демкин В.В. 132
Деркач К.В. 345, 355
Дмитриев С.Е. 148
Добров Е.Н. 194, 326
Доброхотов И.В. 160
Довидченко Н.В. 319
Долгих Д.А. 77, 78, 182, 186, 233, 316
Долгов А.А. 185, 189
Долгов С.В. 184
Долотов О.В. 97
Донцова М.В. 191
Дороватовский П.В. 224
Дорош М.Ю. 130
Драчевская М.И. 136, 399
Дрожжина Е.Ю. 128, 150
Дронина М.А. 135
Дубовенко А.Г. 242

Дубровская В.В. 325
Дубровская Н.М. 397
Дубровский А.В. 217
Дубровский Я.А. 275, 281, 286
Дубынин В.А. 215, 341
Дудич Е.И. 415
Дудков А.В. 111, 428
Дунаевский Я.Е. 237, 242, 407
Дурденко Е.В. 320
Евгеньев М.Б. 420
Егоров М.В. 312
Егоров Ц.А. 61, 157, 265, 290, 292, 308
Егорова А.Г. 316
Егорова А.М. 276
Егорова К.С. 164
Еланская И.В. 185
Елякова Л.А. 171
Еремеев Н.Л. 136, 399
Еремина Л.С. 277
Ермакова Г.В. 208
Ермакова Е.А. 161, 328, 361, 362
Ермакова И.И. 161, 279
Ермилова В.С. 299, 328
Ермола Е.М. 234
Ермолина Л.В. 162, 163, 366
Еронина Т.Б. 381
Ерошкин Ф.М. 208
Есипов Р.С. 72, 304, 313, 315, 333, 413
Еськов А.А. 310
Есюнина Д.М. 131, 300, 421
Ефимов А.В. 85, 19, 317, 318, 322
Ефимова Е.В. 414
Ефимова И.Р. 86, 283
Ефремов А.М. 180, 336
Ефремов Е.С. 139
Ефремов Р.Г. 81, 88
Ефремова Т.Н. 126, 408
Жаворонков Л.П. 343, 355
Жалимов В.К. 331
Жданов Д.Д. 410
Желтухин Е.И. 367
Желтухина Г.А. 172
Женило С.В. 260
Жигис Л.С. 128, 150
Жилина Е.В. 368
Жмак М.Н. 212
Жукова Н.А. 45
Завалишина Л.Э. 124, 250
Завалова Л.Л. 122, 417
Завьялова Е.Г. 243
Зайцев Д.О. 93
Замятнин А.А. 55
Зарайский А.Г. 162, 163, 167, 208, 360
Захаров А.В. 301
Захарова Л.А. 100
Захарова М.Ю. 135, 325
Захарова Н.М. 344
Захарченко Н.Л. 205, 221, 371
Зацепина О.В. 338
Зборовская И.Б. 132
Згода В.Г. 158
Зейфман А.А. 321
Зейфман Ю.С. 302
Зелепуга Е.А. 332
Зенгер В. 191
Зерний Е.Ю. 114
Зиганшин Р.Х. 56, 173
Зиновьева М.В. 132
Зинченко А.А. 116, 128, 173
Зинченко Д.В. 114
Золотарев Ю.А. 68, 69
Золотов Н.Н. 432, 433
Зубарева А.А. 303
Зубкова Е.С. 416
Зубов В.П. 83
Зуев Ю.Ф. 221, 327,361, 362, 371
Зуева В.С. 128, 150
Ибрагимова Н.Н. 62
Иванисенко В.А. 160
Иванов А.В. 271
Иванов В.Т. 56, 57, 230
Иванова В.П. 222
Иванова Д.Л. 105
Иванова Е.А. 105, 215, 341
Ивлиева Т.А. 369
Игнатов А.В. 376
Идиятуллин Б.З. 361
Иевлева Е.В. 245
Изместьева О.С. 139, 343, 355
Ильина Н.Б. 316
Ильина Т.Н. 223
Ильницкая Е.В. 278
Илюха В.А. 223
Иноземцева Л.С. 97
Иомдина Е.Н. 107
Исаев В.А. 393
Исаева М.П. 309, 310, 332
Кабанов А.В. 164, 429
Кадыков В.А. 166
Казаков В.С. 57
Казакова Л.И. 217
Казанский Д.Б. 133, 178
Казначеева А.В. 370
Какурина Г.В. 125

Каледин В.И. 144
Калиберда Е.Н. 135, 244
Калинина Н.О. 326
Калихевич В.Н. 215
Каменский А.А. 109, 206, 207, 215, 225, 339, 341, 350
Камынина А.В. 145
Каневский Л.М. 342
Канцерова Н.П. 127, 400
Капица И.Г. 158
Каргатов А.М. 322
Карпова Г.Г. 387
Карпова Я.Д. 394, 395
Катаев А.А. 112
Катанугина А.С. 426
Кашеверов И.Е. 99, 212, 284
Кашпаров И.А. 118
Кашпарова Н.Я. 118
Кветной И.М. 430
Кибанов М.В. 164
Кижина А.Г. 223
Кирковский В.В. 74
Кирпичников М.П. 44, 74, 78, 89, 182, 186, 213, 233
Клейменов С.Ю. 381
Клишо Е.В. 125
Ключарева А.Ю. 186
Клячко Н.Л. 429
Кобылянский А.Г. 97
Ковалев Л.И. 277
Ковалева З.В. 222
Ковалева М.А. 277
Коваленко Е.И. 342
Коваленко А.П. 90, 342
Ковалицкая Ю.А. 112, 339
Коваль О.А. 144
Ковальчук М.В. 82
Козик В.С. 68, 69
Козин С.А. 191, 178
Козлов Л.В. 128, 148, 150
Козлов С.А. 91, 288, 383
Козловская Э.П. 288, 310, 332
Козырь А.В. 135
Козьмин Ю.П. 57
Колесанова Е.Ф. 151, 433
Колесников А.В. 135
Коломийцева Г.Я. 232
Колпакова Т.В. 114
Колясникова К.Н. 135, 432
Комарова М.С. 278
Комолов К.Е. 114
Кондакова И.В. 125
Кондратов И.Г. 45
Кондрашина А.С. 270
Коннова Т.А. 221, 331
Кононихин А.С. 160, 401
Концевая Е.А. 426
Копылов А.М. 243
Копылов А.Т. 158, 243
Копылова Г.Н. 143, 340
Кордюкова Л.В. 86
Корепанов А.П. 357, 360, 372, 374
Корженевский Д.А. 224
Корнеева Е.В. 432
Коробейникова А.В. 357, 372, 374
Коробов В.П. 64, 209, 210
Короев Д.О. 145
Королева О.В. 271, 324
Королькова Ю.В. 211
Коромыслова А.Д. 336
Коростылева Т.В. 157
Коршунова Г.А. 386
Кост Н.В. 140, 432, 433,
Кост О.А. 262, 365, 406
Костанян И.А. 103, 104, 105, 106, 107, 272
Костарева О.С. 201, 228, 360, 373
Костров С.В. 76, 113, 132, 241, 423
Костромина М.А. 304
Котельникова О.В. 128, 150
Котов А.В. 102
Котов А.А. 164
Котова Н.В. 118, 382
Кох К.-В. 114
Кошелев С.Г. 288
Кравченко О.В. 80, 377
Крапф Г. 101
Кравченко О.В. 80
Красильщикова М.С. 173
Красникова Т.Л. 152, 418
Краснов И.А. 275, 281
Краснов К.А. 273
Краснов Н.В. 198
Кривченко А.И. 222
Крупнова М.Ю. 258
Крюкова Е.А. 78, 182, 186, 212, 284
Крюкова Е.В.
Ксенофонтов А.Л. 189, 194
Ксенофонтова О.Б. 139
Кудрявцева Н.Н. 245
Кузина Е.С. 130, 401
Кузнецов Н.А. 135
Кузнецов С.А. 239, 240,
Кузнецова Е.С. 323

Кузнецова Н.Р. 417
Кузьменков А.И. 282
Кукушкин Н.И. 331
Кулемзина И.А. 407
Кулигина Е.В. 144
Кульбачинский А.В. 131, 300, 368, 421
Куранова И.П. 82, 219, 239, 315, 333
Курганов Б.И. 381
Курзанов А.Н. 195
Курилов Д.В. 174
Курилова С.А. 66, 117
Куринов А.М. 132
Куркова И.Н. 370
Курмышкина О.В. 239, 240
Курочкина Л.П. 119, 166
Курченко В.П. 246, 267
Курылева И.М. 107
Кутышенко В.П. 197
Кухтина Н.Б. 152, 418
Кырчанова О.В. 369
Кяйвяряйнен Е.И. 240
Лагарькова М.А. 97
Ладыгина В.Г. 45
Лазарева Н.А. 138
Лазопуло А.М. 227
Лазопуло С.М. 227
Ланцова Н.В. 299
Лапко А.В. 234
Ларина Д.С. 160, 312
Ларина И.М. 168
Ларионова А.В. 262
Ларкина Е.А. 93
Латынова И.В. 252
Лебедева О.С. 97
Леванов Л.Н. 411
Левашов А.В. 291
Левашов П.А. 75, 291
Левицкая Н.Г. 109, 206, 220, 225
Левицкий Д.И. 87
Легач Е.И. 395
Лейченко Е.В. 310
Лемкина Л.М. 64, 209, 210
Ленцман М.В. 149
Линькова Н.С. 111, 426, 428, 430
Липкин А.В. 183, 224
Липкин В.М. 95, 104, 105, 107, 272, 278
Лисица А.В. 168
Лисицкая К.В. 277
Литвинов И.С. 213
Лихванцева В.Г. 413
Ловать М.Л. 414
Логинов Д.С. 324
Логинов П.А. 81
Ломакин Я.А. 325
Лузянина А.А. 139, 343, 355
Лукашев Е.П. 78, 185
Лукьянов К.А. 330
Лукьянов С.А. 41
Лунина Н.А. 159, 423
Лыжов И.И. 165
Лысенко Л.А. 127, 400
Люкманова Е.Н. 44
Люпина Ю.В. 133, 394, 395
Мажейка И.С. 57
Майсурадзе И.Г. 324
Макаревич Д.А. 74, 234
Макаров В.В. 326
Макарова А.В. 374
Макарова Я.В. 284
Макеева В.Ф. 381
Максимова Е.М. 374
Макшакова О.Н. 327
Малахова Е.В. 125
Малинин В.В. 431
Мамедов А.Э. 305
Мануилова Е.С. 97
Манченко Д.М. 109, 206, 220, 225
Марданова А.М. 247
Мартинович В.П. 175, 234, 414
Мартынов А.А. 344
Мартынов А.Г. 402
Мартынов В.И. 196, 329, 330
Мартынова Н.Ю. 162, 163, 167, 208, 366
Марченко Н.Ю. 118
Марченков В.В. 118, 382
Марченкова С.Ю. 382
Марюхнич Е.В. 133
Матвеев А.Л. 411, 419
Матвеева В.А. 411, 419
Медведев А.Е. 158
Медведева Е.С. 268, 283
Медвинская Н.И. 145
Мезенцева М.В. 348
Мелихова Т.Д. 173
Мельник Б.С. 197
Мельников Э.Э. 150
Мельникова В.И. 100
Меньшиков М.Ю. 416
Мерсиянова И.В. 213
Метлицкая А. 287
Мешавкин В.К. 140, 262
Мешавкина М.А. 262
Мещерякова А.В. 284
Мещерякова О.В. 354

Минахин Л.С. 368
Минеев К.С. 44
Минкевич Н.И. 107
Миропольская Н.А. 376
Мирошников А.И. 72
Митрошин И.В. 80, 377
Михайлова А.Г. 123
Михайлова Е.В. 285
Михалев А.В. 173
Михалева И.И. 230,
Михеева И.Г. 432, 433
Мищенко Е.С. 403
Моисеева Ю.В. 138
Мойса А.А. 151
Мойсеюк И.В. 345
Мокрушина Ю.А. 306
Мокшина Н.Е. 62
Молокоедов А.С. 70, 176
Молочков Н.В. 197
Монастырная М.М. 310, 332
Морозкин А.Д. 249
Морозов В.И. 161
Морозова А.Ю. 393
Мочалов К.Е. 57, 83
Мошарова И.В. 211
Мошков Д.А. 217
Мошковский С.А. 168
Музыкантов А.А. 268
Муравьёва Т.И. 315
Мурашев А.Н. 101, 349, 420
Мурашко Е.А. 275, 286
Мурина В.Н. 202, 307
Муронец Е.М. 185
Мустаева Л.Г. 170, 179
Мухамедшина Я.О. 146
Мухин В.А. 214, 258, 403
Мухтарова Л.Ш. 292, 364
Мясоедов Н.Ф. 52, 68, 69, 98, 109, 110, 140, 220, 225, 254, 256, 262, 341, 363, 427
Набиев И.Р. 83
Наволоцкая Е.В. 106, 112, 378
Нагаев И.Ю. 256
Надеждин К.Д. 44
Назарова Т.И. 66, 117
Назимов И.В. 69, 198, 199, 257
Назипова А.А. 114
Налётова И.Н. 188
Науменкова Т.В. 200
Небольсин В.Е. 172
Невзглядова О.В. 285
Невская Н.А. 201, 228
Недзвецкий В.С. 346
Недорубов А.А. 346
Недоспасов С.А. 48
Некрасов А.Н. 116, 185
Некрасова Ю.Н. 238, 378
Немова Н.Н. 127, 239, 246, 258, 269, 354, 400
Немцова Е.Р. 229
Непоклонов А.В. 158
Неробкова Л.Н. 158
Никитин И.Г. 58, 99
Николаев Е.Н. 160, 401
Никольский А.С. 226
Никонов О.С. 227, 359, 385
Никонов С.В. 80, 201, 202, 227, 228, 307, 357, 359, 377, 385
Никонова Е.Ю. 201, 227, 377
Никулин А.Д. 202
Никулин А.Н. 227
Новиков А.В. 198
Новиков В.Ю. 165, 403
Новиков Д.К. 414
Новиков Ф.Н. 321
Новикова М. 287
Новикова О.Д. 309
Новицкая Ю.А. 138, 259
Новосадова Е.В. 97
Новоселецкий В.Н. 203
Новотоцкая-Власова К.А. 78
Нокель Е.А. 173
Овчинникова Е.Д. 75
Огарков М.А. 335
Огородникова Т.И. 205
Одинцова Т.И. 61, 157, 293
Озеров И.В. 81
Окороченков С.А. 172
Олейников В.А. 83
Оленина Л.В. 164
Оленкина О.М. 164
Омельянюк Н.М. 410
Оноприенко Л.В. 230,
Онуфриев М.В. 138
Опарин П.Б. 308
Опперт Б. 402
Орлов В.Н. 119
Орлов С.В. 180
Осипов А.В. 58, 59, 99, 284
Осипов Е.М. 183
Осипова Е.В. 299, 328
Осмаков Д.И. 288
Остров В.Ф. 349, 420
Островерхова Т.В. 233
Островская Р.У. 142

Павлюков М.С. 122
Палькеева М.Е. 70, 170
Панин Н.В. 231
Панина А.А. 77
Панова И.Г. 177
Парамонов А.С. 44
Парфенов И.А. 289
Парфенова Е.В. 416
Парыгина Н.А. 303
Пастушкова Л.Х. 160, 168
Пахарукова Н.А. 168
Пахомов А.А. 329,
Пахомова А.В. 196, 260, 261
Певцова Е.И. 102
Пелогейкина Ю.А. 70
Пермяков Е.А. 114
Пермяков С.Е. 114
Петренко А.Г. 379, 384
Петровская Л.Е. 78, 182, 186
Пивоварова А.В. 87
Пиндл В. 80
Пинелис В.Г. 76
Писаренко О.И. 70
Пискунович Д.И. 214
Плетнев В.З. 122, 193, 330
Плетнева Н.В. 122, 330
Подлубная З.А. 65
Подольская Е.П. 273, 275, 281, 286
Поздеев В.И. 105
Покровская М.В. 410
Покровский В.С. 410
Покровский С.Н. 75
Покусаева В.О. 331
Полозов Р.В. 367
Полюдова Т.В. 64, 209, 210
Поляков К.М. 324
Поляков Н.Б. 57, 274
Полякова В.О. 430
Поляничко А.М. 335, 380
Полянский А.А. 81, 86, 88, 336
Помогайбо С.В. 174
Пономаренко Н.А. 73, 130, 148, 301, 305, 370, 306, 325, 401
Попов В.О. 43
Попов И.А. 160
Попова М.С. 138
Попова Н.В. 379, 384
Попова С.С. 344
Портнягина О.Ю. 309
Постнова Т.Ю. 248
Потапенко М.О. 144
Привалов П.Л. 51
Присяч С.С. 199
Прохоров А.В. 347
Прохоров Д.А. 197
Прохорчук Е.Б. 266
Прудченко И.А. 229
Прусов А.Н. 232
Птушенко В.В. 57
Пупов Д.В. 131, 421
Пурыгин П.П. 334
Пухальский В.А. 293
Пучко Е.Н. 422
Пылаева Е.А. 152
Пындык Н.В. 151
Пыцкий И.С. 295
Рабинович А.Л. 84
Радченко В.В. 278
Разгуляева О.А. 128, 150
Ракитина Т.В. 105, 183
Рамазанова А.С. 58, 59
Рафиева Л.М. 113
Ревина Т.А. 245
Репкина Н.С. 404
Решетняк А.В. 306
Ривкина Е.М. 78
Ризванов А.А. 146
Рипатти П.О. 84
Рихтер В.А. 144, 411
Рогожин Е.А. 265, 290
Родина Е.В. 66, 117
Родионов И.Л. 170, 179
Родионова А.С. 278
Родионова Т.Ю. 380
Рожков С.П. 92, 192
Роман С.Г. 381
Романова М.И. 93
Ротанова Т.В. 121, 249
Рощина М.П. 423
Рудакова Н.Л. 236, 405
Рудаковская А.Г. 234
Руденская Г.Н. 128, 239, 240, 393
Рукавцова Е.Б. 422
Рулева Н.Ю. 152
Румпель О.А. 260, 261
Румш Л.Д. 123, 128, 134, 135, 150, 244
Румянцева Н.И. 353
Рыжакова О.С. 124, 250
Рысакова К.С. 165
Рябова Н.А. 118, 382
Рязанский С.С. 164
Рязанцева И.Н. 205
Сабурова Е.А. 320, 352
Сабирова А.Р. 233

Савельев М.И. 406
Савенкова О.В. 125
Садовников В.Б. 112, 378
Саенко А.С. 139
Сакута Г.А. 164
Салафутдинов И.И. 146
Самонина Г.Е. 143, 340, 348
Сангаджиева А.Д. 348
Санталова И.М. 217
Сапронова А.А. 349
Сарских А.В. 201
Сарычева Н.Ю. 215, 341
Сасс А.В. 132
Сафина Д.Р. 76
Сачкова М.Ю. 383
Свешников П.Г. 77
Свирщевская Е.В. 303, 347
Себенцова Е.А. 206, 220
Северинов К. 289
Седов С.А. 291
Селиванова О.М. 307
Семашко Т.А. 398
Семенкова Л.Н. 415
Семенов Д.В. 144
Семёнова М.В. 291
Семенова Т.А. 242
Семенюк П.И. 119
Семин Ю.А. 139, 343, 355
Семисотнов Г.В. 118, 382
Сенин И.И. 114
Серебрякова М.В. 45, 86, 287
Середенин С.Б. 141, 142
Серова О.В. 128, 150, 384
Сибгатуллина Г.В 353
Сивожелезов В.С. 367
Сидорова М.В. 68, 70, 152, 176, 418
Сидорова О.В. 309
Сизова С.В. 83
Синюшин А.А. 350
Склифас А.Н. 331
Скляров Л.Ю. 178
Скрипников А.Ю. 57
Слащева Г.А. 101
Слезина М.П. 252, 290
Слижикова Д.К. 57
Сметанин В.А. 252
Смирнов И.В. 73, 135, 301, 306, 370
Смирнов Л.П. 63, 216, 269
Смирнова Е.А. 333
Смирнова Е.В. 105
Смирнова Т.А. 232
Смирнова Ю.А. 398, 407
Соболев П.С. 93
Соболев Б.Н. 151
Сойдла Т.Р. 285
Соколов В.О. 152
Соколов Н.Н. 410
Соколов О.Ю. 140, 432, 433
Соколова О.А. 164
Соколова О.С. 89
Соллертинская Т.Н. 110
Соловьев В.Б. 427
Соловьева Е.А. 208
Соловьева Н.И. 124, 250
Сорочинская Е.И. 222
Софьин А.В. 245
Спирин А.С. 39
Спирина Е.В. 78
Спирина Л.В. 125
Старков В.Г. 58, 59, 99
Стёксова Н.А. 252
Степаненко В.Н. 72, 313
Степаничев М.Ю. 138
Степанов А.В. 148
Степанова Е.В. 413
Столбоушкина Е.А. 226, 359, 385
Стремовский О.А. 148
Строганов О.В. 321
Стройлов В.С. 321
Струков А.С. 212
Струкова С.М. 134
Сумбатян Н.В. 386
Сурин А.М. 76, 212
Сурина Е.А. 104
Суханова Г.А. 192
Сухов И.Б. 351
Суховская И.В. 63, 216
Сыкилинда Н.Н. 119, 166
Сычев С.В. 78
Табакмахер В.М. 332
Таланова В.В. 251
Тамаркин М. 311
Таранов А.И. 184
Тарасенко И.И. 391
Тарасова Е.А. 117
Татиколов А.С. 177
Терёшина М.Б. 167
Терещенко О.Н. 262
Терещенков А.Г. 386
Тикунова Н.В. 325, 411, 419
Тимофеев В.И. 219, 315, 333
Тимофеев К.Н. 185
Тин У.Ф. 373
Титов А.Ф. 251

Тихоненко С.А. 352
Тишкина А.О. 138
Тищенко С.В. 201, 228, 360, 373
Ткачева Е.С. 310
Ткачевская Е.П. 93
Толпыго С.М. 102
Топоркова Я.Ю. 292, 364
Топорова В.А. 77, 185
Торопыгин И.Ю. 102, 277
Трифонова О.П. 168
Трофимов А.В. 111, 428
Трофимова С.В. 428
Уверский В.Н. 197
Угрина А.П. 339
Удовиченко И.П. 95
Узенбаева Л.Б. 223
Умарова Б.А. 143, 340
Уткин Ю.Н. 58, 59, 99, 284
Уткина Л.Л. 293
Фадеева Ю.И. 122
Файзуллин Д.А. 327, 362, 371
Фарафонова Т.Е. 151
Фахрутдинова Г.Н. 88
Федоров А.А. 74
Федорова М.А. 161
Федорова Н.В. 189, 194
Федорова О.С. 135
Федорова Т.В. 271, 324
Федоткина О.С. 295, 334
Фельдман Б.М. 134
Феофилова М.С. 335
Филатова Л.Б. 210
Филатова Л.Ю. 429
Филиппов Д.О. 381
Филиппов П.П. 114
Филиппова И.Ю. 398, 407
Филькин С.Ю. 59
Финкельштейн А.В. 39
Финогенова М.П. 425
Фиронов С.В. 199
Фирсов А.П. 184
Фирстова Н.В. 252
Фисунов Г.Ю. 45
Фокина Н.Н. 400
Фомин А.С. 144
Фрид Д.А. 75
Фролова Л.Ю. 387
Фролова С.А. 251
Фуников С.Ю. 151
Хабибуллина Н.Ф. 186
Хавинсон В.Х. 42, 111, 223, 426, 428, 430, 431
Хадеева Н.В. 237
Хаертдинова Л.Р. 353
Хайрулина Ю.С. 383
Хайтлина С.Ю. 126, 238, 383
Харыбин О.Н. 401
Хижкин Е.А. 223
Хлусевич Я.А. 387
Хоменко В.А. 309
Хохлова О.Н. 101
Хрущова О.Н. 262
Хряпова Е.В. 277
Цаплина О.А. 126, 408
Цетлин В.И. 47, 58, 99
Чалисова Н.И. 426
Чаусова В.Е. 332
Чеботарева Н.А. 87, 381
Челушкин П.С. 180
Челышев Ю.А. 146
Червяковский Е.М. 267
Черемин А.М. 253
Черкашин Е.А. 253, 302, 310
Черкашина А.С. 312
Черников О.В. 280
Чернов А.С. 112, 389
Чернов В.М. 268, 283
Чернова О.А. 268, 283
Черткова Р.В. 233, 316
Чечеткин И.Р. 364
Чикаловец И.В. 280
Чикин Л.Д. 229
Чилов Г.Г. 183, 321
Чистюлин Д.К. 309
Чистякова О.В. 345, 351
Чихиржина Е.В. 335, 380
Чойнзонов Е.Л. 125
Чугунов А.О. 336
Чулин А.Н. 170, 179
Чуличков А.Л. 189
Чулкин А.М. 324
Чупова Л.А. 333, 413
Чурова М.В. 354
Шабарчина Л.И. 217, 352
Шагин Д. 393
Шаймарданова Г.Ф. 146, 253, 266
Шайтан К.В. 89
Шайхутдинова Э.Р. 101
Шамонов Н.А. 76
Шаповалов И.С. 390
Шарипова М.Р. 236, 252, 405
Шарова Н.П. 50, 125, 133, 394, 395
Шахпаронов М.И. 417
Швядас В.К. 231

Шевченко А.С. 139, 254, 343, 355
Шевченко Е.С. 425
Шевченко К.В. 363
Шемчукова О.Б. 77
Шенкарев З.О. 44
Шестаков С.А. 372
Шибанова Е.Д. 173
Шибнев В.А. 173, 425
Шингарова Л.Н. 186,
Шипилов В.Н. 351
Шиповсков С.В. 291
Шишкин Д.А. 125
Шишкин С.С. 276
Шишкина А.В. 189, 386
Шишков А.В. 189
Шкляева А.А. 228
Шольтен А. 114
Шопотов И.К. 149
Шорохов М.В. 110
Шпаков А.О. 115, 295, 345, 351, 391
Шпакова Е.А. 286, 295, 391
Шрам С.И. 98, 259, 346, 365
Шрейнер Е.В. 189
Штейн-Марголина В.А. 358
Шубин А.В. 132, 423
Шуваева Т.М. 278
Шульженко В.С. 70
Шумилина Ю.В. 65
Шумилов А.С. 344
Шутова И.В. 90, 234
Щербакова Т.А. 231
Элпидина Е.Н. 242, 398, 402, 407
Эльцина А.А. 302
Юдкина О.В. 105, 183
Яблокова Т.В. 180
Ягудаева Е.Ю. 128, 150
Якимов С.А. 182
Яковлев А.А. 138
Яковлев А.К. 224
Яковлева А.А. 432, 433
Яковлева В.Г. 276
Яковлева Е.Ю. 237
Якубовская Р.И. 229
Янченко В.В. 175, 414
Ярославцева А.К. 313
Ярош А.Г. 224

Научное издание

V РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ

БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ

Петрозаводск, 8–12 августа 2011 г.

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

Фото на обложке *И. Георгиевского*

Подписано в печать 29.06.2011. Формат 70x100$^{1}/_{16}$.
Гарнитура Times. Печать офсетная. Уч.-изд. л. 23,1. Усл. печ. л. 35,8 .
Тираж 450 экз. Изд. № 209. Заказ 968.

Карельский научный центр РАН
Редакционно-издательский отдел
185003, г. Петрозаводск, пр. А. Невского, 50