

*RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES*  
*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry*  
*Ovchinnikov Russian Biotechnology Society*

**International Conference on Biomolecular Science  
in honor of the 75th anniversary of the birth of  
Professor Yuri Ovchinnikov**

**September 28 – October 2, 2009**

*Abstracts*

*Volume 1. Oral and poster presentations*

**Moscow – Pushchino**

**Конференция проводится при поддержке:**

**Российской академии наук**

**Федерального агентства по науке и инновациям**

**Министерства образования и науки Российской Федерации**

**Российского фонда фундаментальных исследований**

**Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова**

**ООО "Брукер"**

**ООО "ИнтерЛабСервис"**

**НПФ "Литех"**

**ЗАО "Пептек"**

**ООО "Пептос Фарма"**

**ЗАО "Фармсинтез" (Санкт-Петербург)**

**ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ**

**ABSTRACTS OF ORAL PRESENTATIONS**

**Редакторы сборника  
к.х.н. Т.В. Овчинникова и Т.И. Соркина**

## HOW ATP IS MADE

*Walker J.E.*

The Medical Research Council Dunn Human Nutrition Unit,  
The Wellcome Trust/MRC Building, Hills Road, Cambridge CB2 2XY, UK  
E-mail: walker@mrc-dunn.cam.ac.uk

Energy in foods is released by respiration, consuming in the process most of the oxygen that we have breathed in. Of the 1000 or so proteins that are involved, about 100 of them are organized into the respiratory enzyme complexes in mitochondria that function as molecular machines to convert the redox energy derived from food-stuffs into adenosine triphosphate (ATP), the energy currency of biology. The final synthetic step is achieved by the ATP synthase complex, a remarkable molecular machine bound in the inner membrane of mitochondria, and assembled from thirty polypeptide chains of seventeen different kinds from two separate genomes. The enzyme has been purified and resolved biochemically into smaller domains, and the structures of the component parts have been determined by X-ray crystallography. Other domains and subunits have been produced by recombinant expression in bacteria, and their structures have been solved by either X-ray crystallography or solution nuclear magnetic resonance methods. The component structures have been assembled within the framework of a low resolution overall structure determined by electron cryo-microscopy of single enzyme complexes, thereby providing an overall mosaic model. This composite structure has provided the basis for showing that the enzyme is a molecular engine in which the proton motive force across the inner membrane of the mitochondrion is coupled to the chemical synthesis of ATP from ADP and phosphate by a mechanical rotary mechanism, akin to the action of the Wankel motor car engine. It is becoming increasingly apparent that in the inner membranes of mitochondria the ATP synthase complexes are organized in arrays, possibly with other enzyme complexes, and that these higher order arrangements influence the overall structure and functions of the mitochondrion itself.

## BetaM – AN ENIGMATIC MEMBER OF Na,K-ATPase $\beta$ -SUBUNIT FAMILY

Modyanov N.N.

Department of Physiology & Pharmacology, University of Toledo College of Medicine, USA

E-mail: nikolai.modyanov@utoledo.edu

Change in gene functions (gene co-option), one of the key mechanisms of molecular evolution, occurs when natural selection invents new roles for the existing genetic toolkit. Genes can be co-opted to generate developmental and physiological novelties by changing their patterns of regulation and/or by altering the functions of the encoded proteins. We have demonstrated that orthologous ATP1B4 genes, which are the last identified members of the X,K-ATPase  $\beta$ -subunit gene family (X = Na or H), represent a rare instance of vertebrate gene co-option creating fundamental changes in physiological roles and functional properties of the encoded BetaM proteins.

In lower vertebrates such as fish, amphibian and avian species BetaM proteins do function as genuine Na,K-ATPase  $\beta$ -subunits, which are capable to associate with  $\alpha$ -subunits of the same or other species and produce functional ion pumps at the cell surface.

In placental mammals BetaM proteins acquired entirely different properties through radical changes in the structure of N-terminal domains by introduction of an Arg-rich nonapeptide and two extended Glu-rich clusters. Mammalian BetaM does not function as a Na,K-ATPase subunit, and instead of the plasma membrane, accumulates in inner nuclear membranes. Expression of mammalian BetaM is strictly spatiotemporally regulated, being at the highest level in skeletal and cardiac myocytes during late fetal and early postnatal development, and shows a tightly regulated induction during muscle regeneration. BetaM is the only known muscle-specific resident of the inner nuclear membrane of placental mammals.

In neonatal skeletal muscle, BetaM associates with nuclear transcriptional co-regulator Ski-interacting protein (SKIP) and functions as negative regulator of signaling pathway of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), which is a potent inhibitor of myogenesis. More importantly, BetaM is capable to regulate expression of major myogenic regulatory factors such as MyoD and myogenin in cell culture conditions, and furthermore BetaM is a component of MyoD and myogenin transcriptional complexes in neonatal skeletal muscle *in vivo*. These findings indicate that BetaM plays an important role in regulation of gene expression specifically during muscle development and regeneration in placental mammals.

Loss of ancestral function and acquisition of entirely new functions by mammalian BetaM indicates that there is a hitherto unknown, physiologically important necessity, related to skeletal and heart muscles development, growth and regeneration, which did trigger evolutionary forces to change functions of ATP1B4 gene in placental mammals.

## CALCIUM SIGNALING: A MEETING POINT FOR CELLULAR AND STRUCTURAL BIOCHEMISTRY

Carafoli E.

Venetian Institute of Molecular Medicine, University of Padova, Italy

E-mail: ernesto.carafoli@unipd.it

The transition from monocellular to multicellular life demanded the division of labour among cells, and thus the development of molecules that could transmit signals from cell to cell (first messengers), and inside cells (second messengers). Most second messengers are committed transmit information to single targets, but the simplest of them, calcium, is instead very versatile, and transmits signals to many. Calcium is thus a universal regulator of cell activity, guiding cells from their origin at fertilization to their death at the end of their vital cycle in the apoptotic process. In between, calcium presides over the most important aspects of cell function, from secretion, to contraction, to gene transcription, to the production of fuels in the metabolic pathways. The evolutionary choice of calcium as a signaling agent was dictated by its peculiar flexibility as a ligand, that makes its reversible complexation to complex molecules (proteins) particularly easy in the intracellular ambient: reversible complex formation is the means by which the free concentration of calcium is modulated inside cells. The coordination chemistry of calcium indeed makes it peculiarly able to bind to sites having very irregular geometry, such as those found in proteins. The choice of calcium as a signaling molecule naturally demanded that its free concentration inside cells be kept very low to prevent prohibitive expenditures of energy to significantly change it according to necessity. It also permitted to orient the energy metabolism towards phosphate. Since the energetic currency of cells is represented by phosphate compounds, no phosphate-oriented energy metabolism would have been possible if means had not been developed to maintain the concentration of free calcium inside cells low enough to prevent the precipitation of calcium-phosphate salts. Several classes of cell proteins thus bind calcium with high affinity and specificity. Some are intrinsic to the plasma membrane and to the membranes of intracellular organelles: they move calcium back and forth across membrane boundaries, maintaining the large, inwardly directed concentration gradient between the extracellular space, or the lumen of organelles, and the cytoplasm. They are channels, ATP-powered pumps, sodium/calcium exchangers, and, in the inner membrane of mitochondria, a still unknown protein that moves calcium to the internal mitochondrial matrix in response to a negative inside membrane potential. These proteins buffer calcium with various affinities, transport capacities, transport velocities, responding to the varying calcium signaling demands of cell life. Other proteins are not membrane intrinsic. They bind calcium, and thus contribute to the buffering of its cellular concentration. Their main task, however, is the processing of calcium information. They are thus normally defined as calcium sensors. They belong to several families. Some may process the calcium signal for the benefit of a single target. Others could instead process the calcium message to pass it on to a large number of targets. The most important calcium sensor proteins are the EF-hand proteins, of which hundreds are now known.

## БЕЛОК-СИНТЕЗИРУЮЩАЯ МАШИНА КЛЕТКИ

Спирин А.С.

Институт белка РАН, Пущино, Россия

E-mail: spirin@vega.protres.ru

Универсальной белок-синтезирующей машиной в живой природе является рибосома. В ходе белкового синтеза рибосома осуществляет два сопряженных процесса пространственного перемещения макромолекулярных лигандов: прогон компактных глобул тРНК и протяжку линейной цепи мРНК сквозь межсубъединичный канал (конвейерная функция рибосомы). Эта функция рибосомы как молекулярной транспортной машины конвейерного типа обеспечивается взаимной подвижностью двух рибосомных субъединиц и их структурных модулей. Однако, ни моторы, основанные на точной механике, ни жесткие механические трансмиссии, ни инерционные приспособления не могут быть эффективно реализованы на уровне макромолекулярных комплексов нанометровых размеров из-за гибкости биополимерных структур, их интенсивных тепловых флуктуаций и малой инерционности. Реальной альтернативой оказывается принцип термально-диффузионного храповика Фейнмана, согласно которому движущей силой конформационных перестроек и молекулярных перемещений является ректифицированное (канализированное) броуновское движение. Согласно этой модели, анизотропная тепловая подвижность и химически индуцированные изменения сродства связывающих центров рибосомы к их лигандам тРНК, мРНК и ГТФ определяют все направленные (конвейерные) перемещения в транслирующей рибосоме.

Трансляция длинной полирибонуклеотидной цепи мРНК обычно сопровождается формированием полирибосом, в которых рибосомы движутся одна за другой вдоль цепи, считывая одну и ту же кодирующую последовательность, но с отставанием по фазе. Такие полирибосомы могут формировать структуры более высокого уровня организации: их концы могут входить в контакт друг с другом, приводя к образованию циркулярных структур и антипараллельным взаимодействиям противоположных рядов циркуляризованной полирибосомы. Указанная организация полирибосомы обеспечивает циркулярную трансляцию цепи мРНК с перманентной реинициацией на старте мРНК кодирующей последовательности мРНК непосредственно после терминации на ее конце.

### *Литература*

1. A.S. Spirin (2009) The ribosome as a conveying thermal ratchet machine. *J. Biol. Chem.* **284**, 21103-21119.
2. G.S. Kopeina, Zh.A. Afonina, K.V. Gromova, V.A. Shirokov, V.D. Vasiliev and A.S. Spirin (2008) Step-wise formation of eukaryotic double-row polyribosomes and circular translation of polysomal mRNA. *Nucleic Acids Res.* **36**, 2476-2488.

## PROTEIN-SYNTHESIZING MACHINE OF THE CELL

Spirin A.S.

Institute of Protein Research RAS, Pushchino, Russia

E-mail: spirin@vega.protres.ru

Ribosomes are compact ribonucleoprotein particles of about 20 to 30 nm in size responsible for protein synthesis in all living world. Both structure and function of the ribosome are based on two high-molecular weight RNA molecules folded into characteristic compact bodies in a labile association with each other. Mutual mobility of these two subunits and their movable modules provide for machine functions of the ribosome in the process of protein synthesis (translation). During this process the ribosome accomplishes two coupled conveying processes, the passing of compact tRNA globules and the drawing of linear mRNA chain through its intraribosomal (intersubunit) channel. As mechanical transmission mechanisms and power-stroke motors seem unlikely at the nanometres size level due to flexibility of biopolymer structures and their extensive thermal fluctuations, thermal motion and chemically induced changes in affinities of ribosomal binding sites for their ligands (tRNA, mRNA and nucleoside triphosphates) are proposed to underline all the directional movements within the ribosomal complex (thermal ratchet model).

Translation of a long polyribonucleotide chain of mRNA is usually accompanied by a unification of numerous ribosomes into polyribosomes where ribosomes move after each other along the chain and read the same nucleotide sequence of mRNA but with a proper phase delay. It has been demonstrated that when such a polyribosome is formed the next level of structural organization can be achieved: the polyribosome becomes circular, that is its ends are found in close proximity to each other, and two antiparallel halves of the circle turn packed together into the so-called double rows with ribosomal particles mutually oriented in a regular way. The above organization provides for a circular translation of mRNA with permanent reinitiation at the start of the mRNA sequence after termination at the end.

### *References*

1. A.S. Spirin (2009) The ribosome as a conveying thermal ratchet machine. *J. Biol. Chem.* **284**, 21103-21119.
2. G.S. Kopeina, Zh.A. Afonina, K.V. Gromova, V.A. Shirokov, V.D. Vasiliev and A.S. Spirin (2008) Step-wise formation of eukaryotic double-row polyribosomes and circular translation of polysomal mRNA. *Nucleic Acids Res.* **36**, 2476-2488.

## РОЛЬ РИБОСОМНОГО ТУННЕЛЯ В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ: СТРУКТУРНЫЕ АСПЕКТЫ

*Богданов А.А.*\*\*\*, *Сумбатян Н.В.*\*, *Шишкина А.В.*\*\*\*, *Карпенко В.В.*\*,  
*Коршунова Г.А.*\*\*

\*Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*\*Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ

им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*\*\*Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ

им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: bogdanov@genebee.msu.su; alex@bogdanov.genebee.msu.su

Во время биосинтеза белка на рибосоме растущая полипептидная цепь (РП) перемещается по рибосомному туннелю (РТ), который проходит в теле большой субчастицы рибосомы и соединяет ее пептидилтрансферазный центр (ПТЦ) с сайтом, где РП встречается с шаперонами и транспортными факторами. Стенки РТ построены, преимущественно, из нуклеотидных остатков рРНК. В настоящее время установлено, что верхняя треть туннеля, примыкающая к ПТЦ, взаимодействует со специфическими аминокислотными остатками РП и рядом антибиотиков, включая макролиды. В определенных случаях эти взаимодействия играют важную роль в регуляции и ингибировании трансляции. С целью изучения механизма взаимодействия РП с РТ мы синтезировали несколько серий аминокислотных и пептидных производных макролидов с 16-членным лактонным кольцом, а именно, производные тилозина (Tyl), десмикозина (Des) и 5-микаиозилтилонолида (OMT). Аминокислотные и пептидные остатки в этих соединениях были связаны либо с С6 (Tyl, Des, OMT), либо с С23 (OMT) макролида. Если пептидные остатки в пептидил-макролидах моделировали РП, то антибиотик служил "якорем" для их фиксации в заданном участке РТ. На основании данных рентгеноструктурного анализа, а также конкурентного связывания с рибосомой и ингибирования трансляции мы (совместно с Д.Вилсоном, Генетический центр Мюнхенского университета, Германия) идентифицировали ряд потенциальных сайтов специфического взаимодействия РП с РТ. В частности, было найдено, что остаток А2062 в 23S рРНК, расположенный вблизи ПТЦ рибосомы, взаимодействуя с определенными остатками РП, играет важную роль в регуляции уровня трансляции.

## CONTRIBUTION OF THE RIBOSOMAL TUNNEL IN REGULATION OF TRANSLATION: THE STRUCTURAL INSIGHT

*Bogdanov A.A.*\*\*\*, *Sumbatyan N.V.*\*, *Shishkina A.V.*\*\*\*, *Karpenko V.V.*\*,  
*Korshunova G.A.*\*\*

\*Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

\*\*A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

\*\*\*Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

E-mail: bogdanov@genebee.msu.su; alex@bogdanov.genebee.msu.su

During protein synthesis nascent polypeptide chains (NC) extend through the ribosomal tunnel (RT). RT spans the large subunit body from the peptidyl transferase center (PTC) to the exit point where NC becomes available for interaction with chaperones and targeting factors.

The RT walls are composed predominantly of rRNA nucleotide residues. It is well documented that the upper one third of RT is involved in interactions with specific amino acid residues of NC and various antibiotics including macrolides. In several cases these interactions play a critical role in regulation or inhibition of translation. To study interplay between NC and RT we have designed and synthesized a series of amino acid and peptide derivatives of 16-member-ring macrolides – tylosin (Tyl), desmycosin (Des) and 5-mycainosyl-tylonolid (OMT) in which the antibiotic serves as an "anchor" for positioning the peptide at the specific site of RT. Amino acids and peptides were attached to either the C6 position (Tyl, Des, OMT) or C23 position (OMT) of a macrolide. The peptide part of these compound served as a model of NC whereas the antibiotic moiety served as an "anchor" for positioning the peptide at the specific site of RT.

Using X-ray crystallography, competition binding and translation inhibition assays (in collaboration with D.Wilson, Gene Center, University of Mьnch, Germany) we have revealed and characterized several specific sites of interaction of NC with RT. In particular, it was shown that A2062 residue of 23S rRNA located in close vicinity to PTC plays a crucial role in modulation of translation with NC.

## СТРУКТУРНОЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПРИРОДНЫХ ЯДОВ

*Гришин Е.В.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: grev@mx.ibch.ru

Значительное количество живых организмов продуцирует различные яды, содержащие разнообразные компоненты, которые помогают этим организмам выживать во враждебном окружении. Большинство природных ядов представляют собой сложные смеси множества компонентов с различными фармакологическими свойствами.

Удивительное молекулярное разнообразие природных ядов, в основном, обусловлено полипептидными компонентами. Некоторые природные яды являются своеобразными комбинаторными библиотеками полипептидных молекул. Так, яды пауков могут содержать несколько сотен полипептидных компонентов с молекулярными массами от 3 до 8 кДа. Таким образом, пауки продуцируют коктейль структурно разнообразных, но функционально подобных полипептидов. Мы изучили полипептидный профиль яда пауков и обнаружили, что отдельный яд содержит около десяти различных семейств токсиноподобных полипептидов. Данные полипептиды обладают уникальной способностью селективно воздействовать на важнейшие рецепторные системы мембраны нейрональных клеток и могут различать функционально подобные клеточные мишени, что делает их весьма привлекательными для научных исследований и создания лекарственных препаратов. В настоящее время в ядах найдены полипептиды, взаимодействующие практически со всеми известными ионотропными компонентами клеточной мембраны.

В данной работе представлены результаты по изучению компонентов природных ядов, взаимодействующих с потенциалзависимыми Na<sup>+</sup>- и Ca<sup>2+</sup>-каналами, ваниллоидным рецептором TRPV1 и пуринаргическими P2X рецепторами.

## STRUCTURAL AND FUNCTIONAL DIVERSITY OF NATURAL VENOMS

*Grishin E.V.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia  
E-mail: grev@mx.ibch.ru

A considerable number of living organisms produces various venoms containing diverse compounds that help these organisms to live or survive in hostile environments. Most natural venoms are complex mixtures of many components with diverse pharmacological properties. Remarkable molecular diversity of natural venoms is substantially formed by polypeptide components. Certain natural venoms are considered as peculiar naturally edited combinatorial libraries of polypeptide molecules. So, spiders venoms are complex mixtures of up to several hundred various polypeptide components with molecular masses ranging from 3 to 8 kDa. Thus, the spider was found to produce a cocktail of structurally diverse but functionally similar venom peptides. We estimated the polypeptide profile of spider venoms and found that individual venom contained about ten various families of toxin like polypeptides. Venom polypeptides can affect selectively major receptor systems of neuronal membranes and discriminate between closely related cellular targets that make them attractive for scientific use and drug development. Almost all known ionotropic receptors are affected by venom peptides.

The presented work reports the results of our investigation on venom peptides affecting potential-dependent Na<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-channels, vanilloid receptor TRPV1 and P2X receptors.



## MOLECULAR MECHANISMS IN ENERGY TRANSFER RESPIRATORY PROTEINS: FROM PROTEIN ALLOSTERIC COOPERATIVITY TO POST-TRANSLATIONAL MODIFICATION

Papa S.

Department of Medical Biochemistry, Biology and Physics, University of Bari, P.zza G. Cesare, Policlinico, Bari, Italy  
E-mail: papabchm@cimedoc.uniba.it  
Institute of Bioenergetics and Biomembranes, National Research Council, P.zza G. Cesare, Bari, Italy

The respiratory chain of mitochondria is organized in four oligomeric complexes, three of which i.e. complex I, III and IV convert the free energy made available by electron flow into a protonmotive force. The mechanism of redox proton pumps is still elusive [1,2]. As far as complex III (*bc<sub>1</sub>* complex) is concerned, the ubiquinone cycle, which is an extension of the direct ligand conduction principle, can explain a body of experimental observations and is largely accepted. However, alternative mechanisms based on cooperative coupling at *b* cytochromes alone or in combination with the proton motive properties of protein-stabilized semiquinone/quinol species (Q-gated proton pump), equally appear apt to explain the protonmotive activity of complex III [1].

In cytochrome *c* oxidase, oxido-reductions of heme *a*/*Cu<sub>A</sub>* and heme *a<sub>3</sub>*/*Cu<sub>B</sub>* are cooperatively linked to proton transfer at acid/base groups in the enzyme. H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> cooperative linkage at Fe<sub>a<sub>3</sub></sub>/*Cu<sub>B</sub>* is envisaged to be involved in proton pump mechanisms confined to the binuclear center. Models are also proposed which involve a role in proton pumping of cooperative H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> linkage at heme *a* (and *Cu<sub>A</sub>*) [1-3].

Less is known on the mechanism of proton pumping in complex I. Redox-linked conformational changes and protein bound quinone(s) appear to be involved in the proton pump of this complex.

The functional capacity of complex I is regulated by the cAMP cascade. Phosphorylation by the cAMP-dependent protein kinase (PKA) of the subunit of the complex encoded by the nuclear NDUFS4 gene promotes its mitochondrial import, enhances the NADH-ubiquinone oxidoreductase activity and prevents ROS production [4,5].

### References

- [1] Papa S., Petruzzella V. and Scacco S. Structure, redox-coupled protonmotive activity and pathological disorders of respiratory chain complexes. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology. 3rd Edition, G. Gibson and G.A. Diener editors, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (2007), Vol 5, 94-118.
- [2] Papa S., Lorusso M., Di Paola M. Cooperativity and flexibility of the protonmotive activity of mitochondrial respiratory chain, *Biochim Biophys Acta*, **1757**: 428-436 (2006).
- [3] Papa S., Capitanio G., Martino P.L. Concerted involvement of cooperative proton-electron linkage and water production in the proton pump of cytochrome *c* oxidase, *Biochim Biophys Acta*, **1757**: 1133-1143 (2006).
- [4] Papa S., De Rasmio D., Scacco S., Signorile A., Technikova-Dobrova Z., Palmisano G., Sardanelli A.M., Papa F., Panelli D., Scaringi R., Santeramo A., Mammalian complex I: A regulable and vulnerable pacemaker in mitochondrial respiratory function, *Biochim Biophys Acta*, **1777**: 719-728 (2008).
- [5] De Rasmio D., Panelli D., Sardanelli A.M., Papa S., cAMP-dependent protein kinase regulates the mitochondrial import of the nuclear encoded NDUFS4 subunit of complex I., *Cell Signal*. **20**: 989-97 (2008).

## ASSEMBLY OF ADHESIVE TYPE 1 PILI FROM *ESCHERICHIA COLI* Glockshuber R.

Institute of Molecular Biology and Biophysics, ETH Zurich, CH-8093 Zurich, Switzerland  
E-mail: rudi@mol.biol.ethz.ch

Type 1 pili are filamentous, highly oligomeric protein complexes anchored to the outer membrane of uropathogenic *Escherichia coli* cells that mediate bacterial attachment to target receptors on epithelium cells of the urinary tract. The pili are composed of 500-3000 copies of the main structural subunit FimA that forms the helical pilus rod, and the minor subunits FimF, FimG and the adhesin FimH that form the linear tip fibrillum. Each of these four, structurally homologous subunits consists of an incomplete, immunoglobulin-like fold that lacks the C-terminal beta-strand, and contains an N-terminal extension of about 15 amino acids. In the quaternary structure of the pilus, each N-terminal extension serves as donor strand that complements the fold of the neighbouring subunit, a mechanism termed donor strand complementation. Two additional proteins are strictly required for pilus assembly *in vivo*, the periplasmic chaperone FimC and the assembly platform FimD. The chaperone FimC forms soluble 1:1 complexes with all pilus subunits in the periplasm and delivers them to the assembly platform FimD in the outer *E. coli* membrane. FimC represents the prototype of a novel class of protein folding catalysts and accelerates folding of pilus subunits by up to 104-fold. In addition, FimC acts as a kinetic assembly trap that prevents premature pilus subunit assembly in the bacterial periplasm.

Inter- and intramolecular donor strand complementation experiments *in vitro* with isolated type 1 pilus subunits revealed that the donor strands dramatically stabilize pilus subunits against unfolding and confer infinite stability against dissociation to the assembled pilus. We found that the complex between the subunit FimG and the donor strand peptide of the neighbouring subunit FimF represents the kinetically most stable, non-covalent protein complex described to date, with an extrapolated half-life of dissociation of three billion years.

Spontaneous assembly of type 1 pili from chaperone-subunit complexes is a very slow process *in vitro*, with a half-life of about 10 hours. In contrast, pilus assembly *in vivo* occurs on the time scale of several minutes, indicating that pilus assembly in the cell is catalyzed by the assembly platform FimD. FimD not only anchors the pilus to the outer membrane, but also mediates translocation of individual pilus subunits from the periplasm to the cell surface. We identified a periplasmically oriented, N-terminal FimD domain, FimDN, which represents the docking site for chaperone-subunit complexes. In addition, we purified the functional, full-length assembly platform and reconstituted FimD-catalyzed pilus assembly *in vitro* from all purified protein components. FimD catalyzed pilus assembly by more than 100-fold. Its catalytic activity depended on the adhesin FimH, the first subunit to be incorporated into the pilus. Finally, we identified FimI, a minor subunit that has so far not been detected as a component of assembled pili, as the subunit that terminates pilus growth.

### References

1. Hahn et al., *J. Mol. Biol.* **323**, 845-857 (2002).
2. Nishiyama et al., *J. Mol. Biol.* **330**, 513-525 (2003).
3. Vetsch et al., *Nature* **431**, 329-332 (2004).
4. Nishiyama et al., *EMBO J.* **24**, 2075-2086 (2005).
5. Vetsch et al., *EMBO Rep.* **7**, 734-738 (2006).
6. Erilov et al., *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 8938-8939 (2007).
7. Puorger et al., *Structure* **16**, 631-642 (2008).
8. Nishiyama et al., *Science* **320**, 376-379 (2008).



## 25 YEARS OF RECEPTOR RESEARCH, 25 YEARS OF COOPERATION

Hucho F.

Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

E-mail: hucho@chemie.fu-berlin.de

This talk reviews the history of receptor research which for me personally is the history of a longstanding and fruitful Russian-German cooperation, initiated about a quarter of a century ago by Yuri Ovchinnikov. The time period of this cooperation is marked by two books which I had the honor to publish together with him (1983 and 1987), and a most recent publication in *Current Opinion in Pharmacology* (2009, in press) written together with one of Yuri's outstanding pupils.

In the late seventies of last century receptors evolved from abstract pharmacological concepts to molecular entities. This development was initiated and largely promoted, in parallel with others, by the research group of Jean-Pierre Changeux at the Pasteur Institute in Paris. The neurotransmitter receptor prototypic for this chapter of science history was the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR). Pivotal were two important discoveries: a tissue extremely rich in those receptors (electric organs from electric eel and ray, introduced long before by David Nachmansohn) and a variety of toxins usable as tools in characterizing receptors. The latter theme became a common denominator of the cooperation partners on both sides of the Iron Curtain. This methodological bridge was supplemented by technologies like photo affinity labelling, NMR and finally mass spectrometry.

The outcome was the emergence of an increasingly detailed picture of nAChRs. The present situation is documented by the latest common publication with the title "Nicotinic acetylcholine receptors at atomic resolution" (V.Tsetlin and F.Hucho, *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 2009). In an impressive international effort the ultra structure of nAChRs can be 'seen' now by means of Electron Microscopy (mostly Nigel Unwin's work, Cambridge, UK), and X-ray crystallography of a homologue of the extracellular domain (the work of the Smit and Sixma group in Amsterdam). In between there are many landmark achievements, some contributed by the Russian-German cooperation. For the first time we now can speculate evidence-based about the mechanism of channel gating and agonist/antagonist action.

## ПЕПТИДНО-БЕЛКОВЫЕ НЕЙРОТОКСИНЫ В ИССЛЕДОВАНИЯХ НИКОТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Цетлин В.И.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: vic\_tset@yahoo.com

Исследования белковых нейротоксинов начаты в нашем Институте более 30 лет назад академиком Ю.А. Овчинниковым. Задача нашей группы в лаборатории проф. В.Т.Иванова состояла в химической модификации  $\alpha$ -нейротоксинов змей для облегчения анализа их пространственной структуры с помощью ЯМР и других методов (совместная работа с лабораторией проф. В.Ф. Быстрова). Избирательно введенные репортерные группы позволили впервые получить экспериментальные данные о поверхности  $\alpha$ -нейротоксина, взаимодействующей с никотиновым ацетилхолиновым рецептором (nAChR) из электрического органа ската *Torpedo marmorata* (совместная работа с д-ром Е. Karlsson, Уппсала) [1]. Позднее в сотрудничестве с проф. F.Hucho (Берлин) методом фотоаффинной модификации охарактеризована площадка связывания  $\alpha$ -нейротоксинов в самом АХР [2,3].

Сейчас в нашей лаборатории проводятся протеомные исследования змеиных ядов, сфокусированные на "трехпетельных" токсинах – большом семействе, к которому принадлежат  $\alpha$ -нейротоксины. Впервые в яде кобры обнаружены нейротоксины, действующие на мускариновые ацетилхолиновые рецепторы [4]; обнаружено, что мишенью некоторых "слабых нейротоксинов" (структурного подтипа трехпетельных токсина) являются nAChR [5]. Обнаруженный гликозилированный цитотоксин [6], а также дисульфид-связанный димер  $\alpha$ -кобратоксина [7] являются примерами неизвестных ранее типов посттрансляционной модификации трехпетельных токсина.

Эффективными инструментами исследования nAChR становятся  $\alpha$ -конотоксины – пептиды из ядовитых морских моллюсков *Conus*, которые получают пептидным синтезом. Существуют  $\alpha$ -конотоксины, блокирующие мышечные nAChR; большая группа  $\alpha$ -конотоксинов с большей или меньшей избирательностью блокирует различные подтипы нейрональных nAChR, что используется для выявления роли nAChR при различных заболеваниях (никотиновая зависимость, болезнь Альцгеймера и др.). Нами впервые установлено, что  $\alpha$ -конотоксины различают 2 участка связывания в nAChR *Torpedo* [8], а с помощью фотоактивируемых производных показана локализация  $\alpha$ -конотоксинов в областях контакта соседних субъединиц nAChR (совместно с проф. J.V. Cohen, Бостон) [9].

Бурный прогресс в установлении пространственной структуры АХР обусловлен открытием в 2001 г. голландскими исследователями (проф. А.В. Smit и Т. Sixma) ацетилхолин-связывающего белка (АХБ) и установлением его кристаллической структуры – прекрасной модели лиганд-связывающих доменов nAChR. В сотрудничестве с этими учеными установлена структура [10] комплекса АХБ *Aplysia californica* с аналогом  $\alpha$ -конотоксина PnIA, имеющим две замены, т.е. PnIA[A10L,D14K]. (Это первая кристаллическая

структура в комплексе с биологической мишенью для всего класса конотоксинов). В настоящее время на основании кристаллических структур АХБ и их комплексов с различными агонистами и антагонистами с помощью компьютерного моделирования анализируются комплексы индивидуальных подтипов nAChR и конструируются соединения с более высокой активностью и избирательностью действия. Например, нами получен  $\alpha$ -конотоксин SIA[D12K], превосходящий в сродстве к nAChR *Torpedo* природный  $\alpha$ -конотоксин SIA в 200 раз [11].

#### Литература

1. V.I.Tsetlin, E.Karlsson, A.S.Arseniev, Yu.N.Utkin, A.M.Surin, V.S.Pashkov, V.T.Ivanov, V.F.Bystrov, Yu.A.Ovchinnikov. *FEBS Lett.* **106**, 47-52 (1979).
2. H.-J.Kreienkamp, Yu.N.Utkin et al., *C. Biochemistry* **31**, 8239-8244 (1992).
3. J.Machold, Yu.Utkin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7282-7286 (1995).
4. V.V.Kukhtina, C.Weise et al., *Eur. J. Biochem.* **267**, 6784-6789 (2000).
5. Utkin Y.N., Kukhtina V.V. et al., *J. Biol. Chem.* **276**, 15810-15815 (2001).
6. Osipov A.V., Astapova M.V. et al., *Eur. J. Biochem.* **271**, 2018-27 (2004).
7. Osipov A.V., Kasheverov I.E. et al., *J. Biol. Chem.* **283**, 14571-14580 (2008).
8. Yu.N.Utkin, Y.Kobayashi et al., *Toxicon* **32**, 1153-1157 (1994).
9. Kasheverov I., Chiara D. et al., *FEBS J.* **273**, 1373-1388 (2006).
10. Celie P.H., Kasheverov I.E. et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 582-588 (2005).
11. Kasheverov I.E., Zhmak M.N et al., *FEBS J.* **273**, 4470-4481 (2006).

## PEPTIDE AND PROTEIN NEUROTOXINS IN STUDIES ON NICOTINIC RECEPTORS

### Tsetlin V.I.

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia

E-mail: vic\_tset@yahoo.com

Research on protein neurotoxins has been initiated in our Institute by Academician Yu.A. Ovchinnikov more than 30 years ago. The task of our group in the laboratory of Prof. V.T. Ivanov was to chemically modify snake venom  $\alpha$ -neurotoxins to facilitate the analysis of their spatial structure by NMR and other methods (joint work with Prof. V.F. Bystrov laboratory). The selectively introduced reporter groups allowed us for the first time to obtain experimental data characterizing the binding surface of  $\alpha$ -neurotoxin interacting with the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) from the electric organ of *Torpedo marmorata* ray (collaboration with Dr. E. Karlsson, Uppsala) [1]. Later in joint projects with Prof. F.Hucho (Berlin), the binding site for  $\alpha$ -neurotoxins in the nAChR was characterized by photoaffinity labeling [2,3].

At present, proteomic studies are being carried out at our laboratory focusing on three-finger proteins, a large family which includes  $\alpha$ -neurotoxins. Neurotoxins acting on muscarinic acetylcholine receptors were found in cobra venom [4]. It was shown that the target of some "weak neurotoxins" (a distinct structural subtype of three-finger toxins) are nAChRs [5]. The discovered glycosylated cytotoxin [6] and a disulfide-bound dimer of  $\alpha$ -cobratoxin [7] are the examples of post-translational modifications earlier unknown for three-finger toxins.

$\alpha$ -Conotoxins, peptides from poisonous marine mollusks *Conus*, which can be obtained synthetically, are becoming efficient tools for nAChR research. There are  $\alpha$ -conotoxins which block muscle-type nAChRs, a large group of  $\alpha$ -conotoxins with higher or lower selectivity blocks distinct subtypes of neuronal nAChRs; they are used for clarifying the role of nAChRs in various diseases (nicotine addiction, Alzheimer's disease and some other). We found that  $\alpha$ -conotoxins distinguish the 2 binding sites in the *Torpedo* nAChR [8], and with the aid of photoactivatable derivatives demonstrated the localization of  $\alpha$ -conotoxins at the interfaces of the neighboring nAChR subunits (collaboration with Prof. J.B. Cohen, Boston) [9].

Rapid progress in determination of the nAChR spatial structure is due to the discovery in 2001 of the acetylcholine-binding protein (AChBP) and elucidation of its crystal structure, an excellent model for ligand-binding domains in nAChRs (Profs. A.B. Smit and T. Sixma, Amsterdam). In collaboration with these scientists, the crystal structure was solved [10] for the *Aplysia californica* AChBP in a complex with  $\alpha$ -conotoxin PnIA analog having two substitutions, namely PnIA[A10L,D14K]. (This is the first crystal structure in complex with a biological target for the whole class of conotoxins). At present, basing on the crystal structures of AChBPs and their complexes with agonists and antagonists, computer modeling is used for analysis of complexes with individual nAChR subtypes and for design of compounds having higher potency and selectivity. For example, we obtained

$\alpha$ -conotoxin SIA[D12K] which has more than 200-fold higher affinity for *Torpedo* nAChR than the native  $\alpha$ -conotoxin SIA [11].

#### References

1. V.I.Tsetlin, E.Karlsson, A.S.Arseniev, Yu.N.Utkin, A.M.Surin, V.S.Pashkov, V.T.Ivanov, V.F.Bystrov, Yu.A.Ovchinnikov. *FEBS Lett.* **106**, 47-52 (1979).
2. H.-J.Kreienkamp, Yu.N.Utkin et al., *C. Biochemistry* **31**, 8239-8244 (1992).
3. J.Machold, Yu.Utkin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7282-7286 (1995).
4. V.V.Kukhtina, C.Weise et al., *Eur. J. Biochem.* **267**, 6784-6789 (2000).
5. Utkin Y.N., Kukhtina V.V. et al., *J. Biol. Chem.* **276**, 15810-15815 (2001).
6. Osipov A.V., Astapova M.V. et al., *Eur. J. Biochem.* **271**, 2018-27 (2004).
7. Osipov A.V., Kasheverov I.E. et al., *J. Biol. Chem.* **283**, 14571-14580 (2008).
8. Yu.N.Utkin, Y.Kobayashi et al., *Toxicon* **32**, 1153-1157 (1994).
9. Kasheverov I., Chiara D. et al., *FEBS J.* **273**, 1373-1388 (2006).
10. Celie P.H., Kasheverov I.E. et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 582-588 (2005).
11. Kasheverov I.E., Zhmak M.N et al., *FEBS J.* **273**, 4470-4481 (2006).

## PEDF DETERMINES RISK IN RETINAL NEURODEGENERATIVE DISEASES

### Tombran-Tink J.

Penn State University College of Medicine, Department of Neural and Behavioural Sciences and the Department of Ophthalmology, USA  
E-mail: jtink@aol.com; tombrantinkj@umkc.edu

Neurodegenerative diseases of the eye are often associated with cell death and neovascularization. In conditions such as age related macular degeneration and diabetic retinopathy, neuronal cell death precedes and may contribute to downstream vascular abnormalities. Injured neuronal cells are thought to send angiogenic signals that induce growth of new blood vessels.

In several neovascular eye diseases, an imbalance in the levels of pro and antiangiogenic factors in the retina exists. This is especially true for Vascular endothelial growth factor (VEGF) and Pigment epithelium derived growth factor (PEDF), two molecules with counter balancing effects on the retinal vasculature. When there are higher levels of the pro angiogenic molecule VEGF and lower levels of antiangiogenic molecules, then the production and actions of VEGF goes unchecked and it indiscriminately generates new blood vessels. An equilibrium shift between these PEDF and VEGF have been consistently observed in the vitreous samples of patients with diabetic retinopathy, where the levels of PEDF are lower and those of VEGF are higher than in the normal age-matched controls. These differences are robust and have been used to predict which patients will develop the proliferative form of the disease.

The normal ocular environment contains high levels of PEDF, which is mainly thought to be secreted by the retinal pigment epithelium and Muller glia cells. Its antiangiogenic effects have been widely studied in a number of models of neovascularization where it inhibits endothelial cell growth, prevents migration of endothelial cells, blocks vessel sprouting, and reduces vascular leakage. Both retinal and choroidal neovascularization are reduced by PEDF in models of ocular angiogenesis generated by either laser coagulation or hyperoxic treatment. In humans, vitreous PEDF levels are significantly lower in diabetic patients with macular edema compared to normal controls or diabetic individuals without retinopathy. Given the fact that much of the loss of vision in diabetic retinopathy occurs because of macular edema, restoring physiological levels of this antiangiogenic factor in the eye could be beneficial for these patients. In clinical trials, replacement of PEDF in age related macular degeneration by gene therapy shows good success in reducing neovascularization and improving visual acuity without serious side effects and dose-limiting toxicities.

PEDF also has neurotrophic activities, which are evident in several retinal degeneration models including ischemic injury, light damage, and oxidative stress. Its has broad acting neuroprotective effects on a wide range of neurons including photoreceptors and retinal ganglion cells in the eye and neurons of the brain and spinal cord. The two functional activities of the protein reside on distinct peptides at the N-terminal region of the molecule. Mechanisms of PEDF's action are believed to be through activation of caspase 3, reduction in the expression of VEGF and VEGFR2, reduction in VEGF-VEGR2 binding on endothelial cells, and coordinated actions between c-FLIP, NFAT and JNK. The actions of this molecule and its relevance to neurodegenerative diseases will be discussed.

## **SIGNAL PATHWAYS THAT REGULATE BOTH NEURAL DEVELOPMENT AND DEGENERATION**

**Barnstable C.J.**

Department of Neural and Behavioral Sciences, Penn State University College of Medicine, Hershey, PA, USA

E-mail: cbarnstable@hmc.psu.edu

Differentiation of neural progenitor cells into neurons is controlled by both extrinsic and intrinsic factors. We have used mammalian rod photoreceptors as model neurons to study these processes. Dividing retinal progenitor cells express the signal molecule STAT3. Activation of STAT3 by IL-6 family cytokines blocks the movement of progenitors into the terminal differentiation pathway and the expression of a variety of rod-specific molecules. In a screen to identify positive inducers of rod formation we found that the phorbol ester PMA can increase the number of differentiating rods in explant cultures of neonatal mouse retina. This effect was blocked by an inhibitor of PKCs. To determine which isoforms of PKC might mediate the effect we studied the expression of all PMA-activated forms in the developing retina. Only PKC-betaI and PKC-gamma were expressed in the right place at the right time. The stimulation of rod formation by PMA was partially blocked by a specific inhibitor of PKC-betaI. We also found that PKC-gamma knockout mice had delayed rod formation and that this was further inhibited by the PKC-betaI inhibitor. Together these results suggest that both PKC-betaI and PKC-gamma are responsible for promoting rod formation. Although the mechanism of action of PKC is not fully resolved, pretreatment of cell lines and retinal explants with PMA results in decreased activation of STAT3 by CNTF or LIF. We suggest that activation of PKC relieves the differentiation block imposed by activated STAT3. Among the natural activators of PKC found in the neonatal retina is IGF-1. IGF-1 caused an increase in the number of rod photoreceptors in retinal explant cultures, and this effect was blocked by PKC inhibitors.

When neurons undergo stress, such as ischemia, they activate an apoptotic pathway and die. A variety of neuroprotective factors can prevent cell death but we still know little about their mechanisms of action. We have investigated the intracellular signals necessary to mediate the neuroprotective effect of one factor, CNTF. In particular we have studied the role of STAT3 in protecting retinal neurons from damage induced by ischemia/reperfusion and glutamate excitotoxicity by using adenovirus constructs to introduce constitutively active, normal or a dominant negative (inactive) STAT3 into purified retinal ganglion cells in culture and cells of the ganglion cell layer in the intact retina. Purified RGCs were infected with recombinant adenoviruses or control empty virus and then treated with glutamate. Surviving infected cells were counted 24 and 48 h later. Infection with constitutively active STAT3 gave substantial protection when compared to the other constructs. Similarly, intravitreal injection of constitutively active STAT3 adenovirus one day before ischemia-reperfusion resulted in a decreased neural cell death in the ganglion cell layer compared with GFP adenovirus control.

Molecules like STAT3 play vital roles in both neural development and neural disease. Control of STAT3 activation may be critical for the regulated differentiation of neural stem cells into specific types of neuron. Persistent activation of STAT3 by neurotrophic factors provides strong neuroprotection and can be an effective strategy in a number of chronic retinal diseases.

## **FROM STRUCTURAL BIOLOGY TO STRUCTURAL GENOMICS: THE EXPANDING PROTEIN UNIVERSE**

**Wuthrich K.**

The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA

ETH Zurich, Zurich Switzerland

E-mail: kurt.wuthrich@mol.biol.ethz.ch; wuthrich@scripps.edu

In today's post-genomic era, with the availability of the complete DNA sequences of a wide range of organisms, structural biologists are faced with new opportunities and challenges in "structural genomics". In contrast to classical structural biology, research in structural genomics is focused on gene products with unknown structures, unknown functions, and minimal similarity to previously studied proteins. A precisely formulated goal of structural genomics is to determine representative three-dimensional structures for all protein families, which requires 'high-throughput' technology for protein production and structure determination, and the long-term outlook is to predict physiological protein functions from knowledge of new three-dimensional structures. The California-based Joint Center for Structural Genomics (JCSG; PI Dr. Ian A. Wilson) is one of the four large-scale consortia in the NIH-funded Protein Structure Initiative (PSI), which developed and operates an extensively automated high-throughput pipeline for protein production, crystallization and crystal structure determination. However, there remain gaps in the coverage of protein fold space that are due to certain proteins being not readily amenable to crystal structure determination. My research team (the "NMR Core") works on filling such gaps with a 'high-output' approach, which involves novel strategies of target selection as well as new technology for NMR structure determination. When compared to structure determination by X-ray crystallography, the NMR method is complementary by the fact that atomic resolution structural and other function-related data can be measured under solution conditions close to the physiological milieu in body fluids. By generating data on protein structure stability, dynamics and intermolecular interactions in solution, NMR has an exciting role also in the longer-term challenge leading from the expanding protein structure universe to new insights into protein functions and chemical biology.

The JCSG is supported by the National Institute of General Medical Sciences, Protein Structure Initiative: Grant U54 GM074898.



## НАНОДОМЕНЫ (РАФТЫ) В МОДЕЛЬНЫХ И КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАНАХ: ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Чизмаджев Ю.А.

Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,  
Москва, Россия  
E-mail: chiz@fromru.com

Количественно описано возникновение и эволюция доменов новой фазы в многокомпонентном липидном бислое. Ранние стадии, называемые нуклеацией и процессом независимого роста, протекают чрезвычайно быстро (характерные времена – менее или порядка миллисекунд, соответственно). По завершении этих стадий система состоит из нанодоменов со средним радиусом 5-50 нм. Затем наиболее важным фактором становится подвижность доменов; их слияние и деление являются доминирующим механизмом перераспределения вещества, а линейное натяжение определяет распределение доменов по размерам в любой момент времени. В случае достаточно малого линейного натяжения уменьшение энтропийного члена, вызванное слиянием доменов, оказывается больше, чем падение граничной энергии; в результате в системе присутствуют только нанодомены. Для высокого линейного натяжения уменьшение граничной энергии доминирует над изменением энтропии при слиянии, которое приводит к быстрому росту размера нанодоменов вплоть до микронных масштабов. При промежуточном по величине линейном натяжении нанодомены сосуществуют с глобальной фазой, но только в течение ограниченного промежутка времени. Найденная теоретически критическая величина линейного натяжения, необходимого для быстрого роста размера доменов, совпадает с экспериментальной оценкой, сделанной по измерению кривизны отпочковывающихся доменов в гигантских липосомах.

Предполагается, что рафты и другие домены в клеточных мембранах формируются в результате смачивания белков липидами. Термодинамика липидных пленок, смачивающих белки, рассматривается на основе механики биомембран в модели мембраны как сплошной жидкокристаллической среды. Этот подход является новым в описании смачивания. Теория позволяет строго сформулировать условия, необходимые для появления макроскопической смачивающей пленки, а также определить ее толщину. Согласно расчетам макроскопические пленки могут образовываться только вокруг больших липид-белковых агрегатов, диаметром порядка десятков нанометров. Вокруг одиночных белков или малых комплексов формируются только тонкие адсорбционные пленки. Полуколичественно рассмотрен механизм, по которому пленки регулируют слияние агрегатов. Показано, что пленки препятствуют выходу одиночных белков из агрегата, что позволяет удерживать вблизи друг друга белки, взаимодействие которых необходимо для их правильного функционирования. Вычислены радиусы агрегатов как функции спонтанной кривизны мембраны и несоответствия толщины монослоев агрегата и окружающей мембраны. Полученные значения радиусов могут быть проверены экспериментально.

## NANODOMAINS (RAFTS) IN MODEL AND CELL MEMBRANES: THEORETICAL STUDY

Chizmadzhev Yu.A.

A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry RAS,  
Moscow, Russia  
E-mail: chiz@fromru.com

The creation and evolution of phase-separated domains in a multicomponent lipid bilayer membrane was described quantitatively. The early stages, termed the nucleation stage and the independent growth stage, are extremely rapid (characteristic times are submillisecond and millisecond, respectively) and the system consists of nanodomains of average radius 5-50 nm. Next, mobility of domains becomes consequential; domain merger and fission become the dominant mechanisms of matter exchange, and line tension is the main determinant of the domain size distribution at any point in time. For sufficiently small line tension, the decrease in the entropy term that results from domain merger is larger than the decrease in boundary energy, and only nanodomains are present. For large line tension, the decrease in boundary energy dominates the unfavorable entropy of merger, and merger leads to rapid enlargement of nanodomains to radii of micrometer scale. At intermediate line tensions and within finite times, nanodomains can remain dispersed and coexist with a new global phase. The theoretical critical value of line tension needed to rapidly form large rafts is in accord with the experimental estimate from the curvatures of budding domains in giant unilamellar vesicles.

Formation of rafts and other domains in cell membranes at under-saturation is considered as wetting of proteins by lipids. The membrane is modeled as a continuous elastic medium. Thermodynamic functions of the lipid films that wet proteins are calculated using a mean-field theory of liquid crystals as adapted to biomembranes. This approach yields the conditions necessary for a macroscopic wetting film to form; its thickness could also be determined. It is shown that films of macroscopic thicknesses form around large (tens nanometers in diameter) lipid/protein aggregates; only thin adsorption films form around single proteins or small complexes. The means by which wetting films can facilitate the merger of these aggregates is considered. It is shown that a wetting film prevents a protein from leaving an aggregate. Using experimentally derived values of elastic moduli and spontaneous curvatures as well as height mismatch between aggregates and bulk membrane, we obtained numerical results, which can be compared with the experimental data.

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РОСТА И РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ

Ткачук В.А.

Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия  
E-mail: tkachuk@fbm.msu.ru

Большинство сердечно-сосудистых заболеваний, остающихся основной причиной смертности жителей России и других индустриально развитых стран, развивается вследствие нарушений (тромбозы, атеросклеротические бляшки, стенозы и др.) системы кровообращения. Рост сосудов происходит при развитии в тканях ишемии (нехватки кислорода) за счет секреции ангиогенных факторов (VEGF, HGF, bFGF и др.). Каждый из этих факторов роста выполняет определенные функции (стимулирует миграцию и пролиферацию эндотелиальных и гладкомышечных клеток или миграцию перicyтов, либо синтез и секрецию матриксных белков и др.). Выяснение молекулярных и клеточных механизмов роста сосудов позволило применять методы генной терапии (введение экзогенных генов VEGF, uPA, HGF и др.) для лечения ишемии нижних конечностей, сердца, мозга и других тканей.

Влияние на функционирующие сосуды высокого давления крови, глюкозы, холестерина, воспалительных процессов, механического повреждения и других факторов приводит к сужению просвета сосудов, формированию бляшек, стенозу и иным перестройкам структуры сосудистой стенки, что ухудшает кровоснабжение органов, а в некоторых случаях завершается инфарктом сердца или инсультом. В процессах ремоделирования сосудов важную роль играют системы активаторов плазмينا, матриксные белки (коллаген, фибронектин, витронектин, фибулин и др.), матриксные металлопротеиназы. С помощью рекомбинантных форм этих ферментов, агонистов и антагонистов соответствующих рецепторов, а также трансфекции эндотелиальных и гладкомышечных клеток терапевтическими генами удается подавить ряд патологических изменений сосудов и нормализовать кровоснабжение тканей.

## MOLECULAR MECHANISMS OF BLOOD VESSELS GROWTH AND REMODELLING

Tkachuk V.A.

Faculty of Basic Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia  
E-mail: tkachuk@fbm.msu.ru

Most cardiovascular diseases, which have a major morbidity and mortalities in Russia and other economically developed countries, are due to vascular system disorders (occlusion, atherosclerotic plaques, stenosis etc.).

Blood vessel growth is induced by ischemia (oxygen deficit) via secretion of angiogenic factor (VEGF, HGF, bFGF and others). Each of these factors has a specific function (stimulates migration and proliferation of endothelial and smooth muscle cells, induces pericyte migration or upregulates matrix proteins). Discovery of molecular and cell mechanism of angiogenesis has greatly influenced development of gene therapy (gene transfer of VEGF, uPA, HGF etc.) of critical lower limb ischemia, ischemic brain and heart disease.

High blood pressure, glucose, cholesterol, inflammatory and mechanical damage lead to luminal vessel occlusion, plaque formation, stenosis and other blood vessel remodelling processes, which may decrease organic perfusion initiate strokes or myocardial infarctions.

Vessel remodeling involves plasmin activator system proteins, matrix (collagen, fibronectin, vitronectin, fibulin etc.) and matrix metalloproteinases. The above-mentioned pathologic processes in vessels can be inhibited using recombinant forms of these enzymes/proteins, receptor agonists and antagonists or incorporated genes encoding such enzymes/proteins into endothelial or smooth muscle cells. These methods can be used to restore tissue perfusion and prevent abnormal vessel pathology.



## THE ROLE OF THE ROSTRAL ANTERIOR CINGULATE IN THE DETECTION OF NOVEL CONFLICTS

*Cortijo M., Santisteban C. and Alvarado J.*

Instituto de Estudios Biofuncionales. UCM, Madrid, Spain

E-mail: cortijo@farm.ucm.es

The neural mechanisms involved in visual attention and, more precisely, in cognitive control have been amply studied using behavioural, neurophysiological and imaging techniques. Human brain areas involved in cognitive control have been studied in this work by a jittered event-related experiment using a flanker task and monitoring the neural changes produced by functional magnetic resonance imaging (fMRI). Incongruent (I), neutral (N) and congruent (C) trials were used in two previous experiments designed to optimize the experimental conditions and to decrease the influence of behavioural post-conflict adjustments. Our aim was to ensure that fMRI intensity changes associated to salient novel conflicts could be evaluated with minimum interference from preceding conflicts, which was fulfilled. Blood-oxygen-level-dependent (BOLD) intensity differences between I and C trials in both the rostral ACC (rACC) and the dorsal ACC (dACC) were observed under these conditions. The former cluster was larger and showed greater intensity differences than the latter. Other clusters showing BOLD intensity differences between the I and C conditions in the superior frontal gyrus (spreading to the medial), left precentral gyrus and both left superior and inferior parietal lobules were also detected. Our results agree with previous ones that have indicated a key role played by the ACC in the engagement of control processes, producing neural and behavioural adjustments and subsequent recruitment from the prefrontal cortex (PFC) to minimize conflict. Our most important finding was that the rACC was more active than the dACC, despite the lack of emotional components in the task. This result suggests an initial role for the rostral ACC in the detection of novel conflicts, which might be latter engaged in the dorsal ACC and integrated with other post-conflict adjustments to minimize conflict and improve performance.

Work carried out with the help of the Spanish Ministry of Education and Science, grant SEJ2004-05290.

## ОСОБЕННОСТИ ПЕРВОЙ И ПОСЛЕДНЕЙ СТАДИЙ ФОТОЛИЗА ЗРИТЕЛЬНОГО ПИГМЕНТА РОДОПСИНА

*Островский М.А.*

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

E-mail: ostrovsky@gagarinclub.ru

Первой фотохимической стадией фотолиза родопсина является изомеризация его хромофорной группы – 11-*цис*-ретиная. Эта реакция исключительно эффективна: время появления первого продукта – фотородопсина менее 200 фс, квантовый выход реакции 0,65. Исследуя в фемто- и пикосекундных шкалах времён светоиндуцированное образование первого продукта – фотородопсина и следующего продукта – батородопсина, мы подтвердили когерентную природу этой реакции на первой стадии фотолиза родопсина (Смитиенко и др., 2008; Смитиенко и др., Биохимия, в печати). Используя следующие друг за другом световые импульсы, нам удалось наблюдать при комнатной температуре сверхбыструю регенерацию родопсина как со стадии фотородопсина, так и со стадии батородопсина (Островский, в печати). Была также зарегистрирована подобная обратная фотореакция бактериородопсина со стадии K590. Сверхбыстрые фотохромные реакции светочувствительных ретиналь-содержащих белков могли бы найти применение в нанотехнологиях.

Последняя стадия фотолиза родопсина позвоночных – это гидролиз ковалентной связи Шиффова основания между опсином и полностью-*транс*-ретиналем и затем высвобождение свободного полностью-*транс*-ретиная в фоторецепторную мембрану. При некоторых нефизиологических или патологических условиях свободный полностью-*транс*-ретиная может легко реагировать в мембране с аминокруппами фосфолипидов и белков (с доступными аминокруппами родопсина). В таком случае полностью-*транс*-ретиная и его производные могут выступать в качестве фотосенсибилизаторов и инициировать повреждение субстратов окисления. Как мы недавно показали, облучение видимым светом этих модифицированных полностью-*транс*-ретиналем субстратов в фоторецепторной мембране приводит к уменьшению или потере физиологической способности родопсина к регенерации (Логинова и др., 2008а, Логинова и др., 2008б). Накопление полностью-*транс*-ретиная в фоторецепторных мембранных наружных сегментах палочек при нефизиологических или патологических условиях может стать источником или причиной повреждающего или усугубляющего действия света при дегенеративных заболеваниях сетчатки, в том числе при возрастной макулярной дегенерации.

## PECULIARITIES OF THE FIRST AND LAST STAGES OF VISUAL PIGMENT RHODOPSIN PHOTOLYSIS

Ostrovsky M.A.

Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, Russia

E-mail: ostrovsky@gagarinclub.ru

The first photochemical stage of rhodopsin photolysis is 11-*cis*-retinal chromophore isomerization. The reaction is very efficient: the time of the first photoproduct – photorhodopsin appearance is less than 200 fs and quantum yield is 0.65. Studying the light-induced formation of the first product – photorhodopsin and the next product – bathorhodopsin in femto- and picoseconds time scales, we have confirmed the coherent nature of 11-*cis*-retinal photoisomerization on the first photochemical stage of rhodopsin photolysis (Smitienko et al., 2008, Smitienko et al., in press). Using two following light impulses, we were able to observe at room temperature the high-speed rhodopsin photoregeneration as from photorhodopsin as from bathorhodopsin stages (Ostrovsky et al., in press). The similar photoconversion of bacteriorhodopsin from the K590 photocycle product was also recorded. The high-speed photochromic reactions of light-sensitive retinal-contained proteins could be useful for nanotechnology.

The last stage of vertebrate rhodopsin photolysis is Schiff-base covalent bond hydrolysis and free all-*trans*-retinal release in the photoreceptor membrane. At some non-physiological and pathological conditions, the free all-*trans*-retinal can easily react with amino groups of both phospholipids and proteins (with accessible amino groups of rhodopsin) in the membrane. If so, the all-*trans*-retinal and its derivatives can stand as photosensitizers, and initiate damage to the substrates of oxidation. As we have shown recently, irradiation by visible light of these all-*trans*-retinal derivatives in the photoreceptor membrane leads to diminishing or loss of rhodopsin physiological ability to regenerate (Loginova et al., 2008a, Loginova et al., 2008b). Accumulation of all-*trans*-retinal in the rod outer segment photoreceptor membrane at non-physiological conditions can be source and cause of damaging or aggravating action of light in case of retina degenerative diseases like age-related macula degeneration.

## DIRECT OBSERVATION OF STRUCTURAL COUPLING BETWEEN RHODOPSIN AND TRANSDUCIN

Abdulaev N.G.

Center for Advanced Research in Biotechnology, University of Maryland  
Biotechnology Institute and National Institute of Standards and Technology,  
9600 Gudelsky Drive, Rockville, MD. 20850, USA

E-mail: abdulaev@umbi.umd.edu

Crystal structures of rhodopsin and several heterotrimeric G proteins, as well as their individual subunits are known at high resolution, but many questions remain as to:

1. How information from 11-*cis* / all-*trans* photoisomerized retinal chromophore deep in the membrane is conveyed to the cytoplasmic surface?
2. What is the nature of conformational changes on the activated receptor surface allowing binding and subsequent activation of G-protein?
3. What is the stereochemical framework of receptor / G protein interface?
4. How information from the receptor binding sites of G protein is transmitted to guanine nucleotide binding site 30 E away ?
5. How receptor facilitates the release of G protein-bound nucleotide, the process representing the rate-limiting step in signal transduction?

Using the rhodopsin / transducin system, conformational changes in Galfa, accompanying heterotrimer formation, activated GPCR (R\*) catalyzed GDP/GTP exchange, as well as effects of site-directed mutations on the nucleotide binding pocket are being tracked by high-resolution NMR.

Biochemical data in conjunction with fluorescence and NMR have shown:

1. An N15 – uniformly labeled Galfa chimera (ChiT) that displays relatively well-dispersed 2D spectra and uniform line widths undergoes aluminium fluoride-induced perturbations in switch II and at the C-terminus.
2. Some anticipated R\*-and GTP-induced perturbations in these same regions are already evident upon heterotrimer formation, likely providing kinetic advantages in R\*/G protein coupling and GDP release.
3. R\*- and Gbetagamma-released exchanged ChiT displays further C-terminal perturbations and increased conformational flexibility of switch II, which may be important for Galfa/ effector interactions and GTP hydrolysis.
4. The GDP-released, R\*-bound (empty pocket-nucleotide free Galfa) state of ChiT shows severe line broadening suggestive of a dynamic intermediate that results from changes in the R\*-interacting N-and C-termini.
5. N- and C-terminal mutations may have long-range effects on ChiT conformation, particularly in switch II.

Wag the Dog function of activated receptor is evident as HSQC spectra of native and "Empty pocket" ChiT prepared receptor-independently are similar. These results provide new insights into the mechanism of signal propagation in the G protein.

## TOWARDS THERAPEUTIC VACCINES AGAINST AUTOIMMUNE DISEASES AND CANCER

Sela M.

Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel 76100

E-mail: michael.sela@weizmann.ac.i

Vaccines are prophylactic in the sense that they are administered to healthy individuals to prevent a disease. Nevertheless, there is a growing trend to use vaccines to alleviate the suffering of those already with a disease. Great effort is being devoted to develop vaccines against tumors, AIDS, hepatitis, tuberculosis, and possibly against the bacteria that cause gastric ulcers. Copolymer 1, used today as a vaccine against multiple sclerosis (MS), is a good example of a beneficial treatment for this autoimmune disease, based on its similarity to the myelin basic protein (MBP), one of the putative causes of MS. This finding could lead to therapeutic vaccines against other autoimmune diseases such as myasthenia gravis, systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis.

Furthermore, antibodies prepared against prions raise hopes for a vaccine against bovine spongiform encephalitis and Creutzfeldt-Jacob disease and antibodies to a peptide derived from  $\beta$ -amyloid plaques could degrade plaques and be used as a therapeutic vaccine against Alzheimer's disease.

By its definition, a preventive vaccine is sufficiently similar in its chemistry to the etiological agent that provokes the disease so that the immune response directed against it can act against the causative agent. This situation is analogous in the case of therapeutic vaccines.

### Multiple Sclerosis

The drug or therapeutic vaccine against the exacerbating-remitting type of MS is a copolymer of four amino acid residues, denoted Copaxone, which is related to MBP. The injection of several positively charged amino acid copolymers in aqueous solution into mice, rabbits and guinea pigs, resulted in efficient suppression of the onset of experimental allergic encephalomyelitis (EAE). Later on it was possible to suppress the actual disease in rhesus monkeys and baboons. The Cop 1 primarily used, now called GA or Copaxone, is composed of a small amount of glutamic acid, a much larger amount of lysine, some tyrosine, and a major share of alanine. Thus, its overall charge is positive. There is significant immunologic cross-reaction (both at the antibody and cell levels) between Cop1 and the MBP. After several clinical trials (e.g. 1), Copaxone was approved, and it is used successfully by more than 150,000 patients.

The interplay between demyelination and remyelination is critical in the progress of MS and its animal model EAE. In a recent study (2), we explored the capacity of glatiramer acetate (GA, Copaxone) to affect the demyelination process and/or lead to remyelination in mice inflicted by chronic EAE, using both scanning electron microscopy and immunohistological methods. Spinal cords of untreated EAE mice revealed substantial demyelination accompanied by tissue destruction and axonal loss. In contrast, in spinal cords of GA-treated mice, in which treatment started concomitantly with disease induction (prevention), no pathology was observed. Moreover, when treatment was initiated after the appearance of clinical

symptoms (suppression) or even in the chronic disease phase (delayed suppression) when substantial demyelination was already manifested, it resulted in a significant decrease in the pathological damage.

### Cancer

The importance of synergy in cancer treatment should be stressed. When monoclonal antibodies to epidermal growth factor receptor (EGFR or ErbB1) were injected together with cisplatin, there is a strong synergistic effect on reducing the size of tumors (3). This may serve as the first example of the synergistic effect on cancer between an antibody and a chemotherapeutic drug, and it is by now used extensively in the clinic.

Combinations of antibody against the same receptor can significantly enhance the rate of receptor breakdown. When combined, the monoclonal antibodies synergize in terms of inhibition of tumor growth in animals (4,5).

#### References

1. Johnson K.P. et al. *Neurology* **45**, 1269-1276 (1995).
2. Aharoni R. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 11358-11363 (2008).
3. Aboud-Pirak E. et al. *Journal Natl. Cancer Inst.* **80**, 1605-1611 (1988).
4. Friedman L.M. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 1915-1920 (2005).
5. Ben-Kasus T. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 3294-3299 (2009).

## ARTIFICIAL ENZYMES AND CATALYTIC VACCINES

Gabibov A.G.

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: gabibov@ibch.ru

Fax: +7(495)-3307329; tel.: +7(495)-4298269

Discovery of catalytic antibodies (abzymes) was a revolutionary event that created new junctions between chemistry, biochemistry, immunology and pathology. The general concept of complementarity introduced in life sciences by Emil Fisher explains the driving force of various biological processes including genetic machinery, enzyme catalysis, ligand-receptor interaction, antibody-antigen recognition etc. Creation of abzymes as a new class of biocatalysts is based upon the intrinsic properties of immunoglobulin superfamily to produce complementary "molecular imprints" using the hypervariability of CDRs. These "catalytic imprints" could be made from the stable chemical analogs of transition state (TSA) of the enzyme reaction (*Linus Pauling and Bill Jencks*). This approach was successfully developed by Richard Lerner group (*Scripps Research Institute, USA*). The alternative way to create abzymes was proposed by author (*Schuster et al., Science, 1992*). It is generated on the basis of the immunological network hypothesis of Niels Jerne and declares the formation of anti-idiotypic antibody repertoire generated against the active site of corresponding enzyme. This approach allowed us to create abzymes with acetylcholinesterase and protease activities (*Kolesnikov et al. PNAS, 2000, Pillet et al., J. Imm. Meth., 2002, Ponomarenko et al., Biochemistry, 2007*). In both cases one try to mimic the highly evolved enzymatic function by selection of antibody catalysts from the vast repertoire of immunoglobulines (*Reshetnyak et al., J. Am. Chem. Soc., 2007*). This may give rise to biocatalysts with new functions, previously unknown for common enzymes, which may be very profitable for fine organic synthesis. This method stimulated our attempts to make antibody-like acceptors for phosphorus-based poisons. Recombinant antibodies with such functions were obtained recently in this lab using chemical selection of "naïve" phage-display library. The second advantage of abzyme field is the opportunity to make "catalytic vaccines". Traditional drugs including antibiotics and other small-molecule compounds developed in the pre-biotechnology era showed the limited success in a number of severe bacterial and viral infections. Numerous attempts to combat HIV infection using drug therapy as well as classical vaccination turned out to be ineffective. One of the targets for the novel therapeutic approach may be the main surface antigen, viral envelope protein gp120. The specific cleavage of this protein can lead to the dramatic changes in the immune response toward virus and decrease binding of HIV to CD4 receptor. This task impossible to be solved by enzyme therapy may have an effective abzyme alternative (*Durova et al., Mol. Immunol., 2009*).

A novel approach for creating catalytic antibodies against pathogens is described (*Ponomarenko et al., J. Imm. Meth. Biochemistry, 2002*). This involves utilizing the autoimmune disorder of SJL mice induced by myelin basic protein as a background for raising a protein-specific catalytic response toward gp120. Site-

specific abzyme-mediated cleavage of gp120 is demonstrated. This approach developed in this laboratory can be considered as a general strategy to obtain a catalytic vaccine to proteins of interest (*Ponomarenko et al. Biochemistry, 2006*).

In our studies we firstly showed that catalytic antibody formation has the strong intrinsic and still enigmatic links with autoimmune diseases. The existence of DNA-specific abzymes in scleroderma, systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis and AIDS was described in this laboratory (*Shuster et al., Science, 1992, Gololobov et al., PNAS, 1995, Gololobov et al., Molecular Immunology, 1997*). Very recently the input of abzyme activity in neurodegeneration process was demonstrated (*Ponomarenko et al., Immunology Letters, 2006*). Autoantibody-mediated tissue and cell destruction is among the main features of organ-specific autoimmunity. We have described abzyme contribution to neural tissue-specific antigens (Ag) degradation. AutoAb to myelin basic protein (MBP) from humans with multiple sclerosis (MS) and SJL mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) exhibited site-specific antigen degradation (*Ponomarenko et al. PNAS, 2006*). AutoAb from patients with the secondary progressive MS and highest scores on the expanded disability status scale (EDSS) demonstrated augmented catalysis. An established MS therapeutic Copaxone® inhibited reaction *in vitro*. AutoAb catalysis thus appears to be a specific feature associated with MS pathogenesis and potential marker of disease progression (*Belogurov et al., J. Immunol., 2008*).

## THE ANTIBODY-CATALYZED WATER-OXIDATION PATHWAY

Wentworth P.

The Scripps Research Institute, 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037, USA

E-mail: paulw@scripps.edu

Recently we have discovered an exciting intrinsic ability of immunoglobulin-fold molecules which suggests that they themselves may also have a role as immune effectors. All antibodies, regardless of subtype or antigenic-specificity, catalyze the production of a cascade of reactive oxygen species production including hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and perhaps ozone ( $O_3$ ) from the substrates singlet ( $^1O_2$ \*) oxygen and water. Activation of this pathway permits antibodies to destroy antigens, such as bacteria, in the absence of complement or other proteins. This lecture will discuss our evolving knowledge of the chemical mechanism of this process and emerging biological and pathological aspects of this pathway. Specific focus will fall on how we have found that lipid metabolites, generated as bystanders of this pathway, may be new mediators in a range of protein misfolding diseases.

## РЕКОМБИНАНТНЫЕ ПРОТИВОРАКОВЫЕ ИММУНОТОКСИНЫ

Деев С.М.

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

E-mail: dejev@ibch.ru

Высокоточное нацеливание терапевтических агентов на опухоли основано на концепции "магической пули" как идеального лекарства. Моноклональные антитела против опухолевых антигенов снабжаются действующими агентами (токсинами, ферментами, радиоизотопами), в результате чего улучшается их биораспределение. Однако, химическая конъюгация антител с агентами имеет ряд существенных ограничений, таких, как плохая воспроизводимость, присутствие несвязанного токсического агента и др. Генно-инженерные технологии позволяют создавать полностью рекомбинантные иммунотоксины на основе укороченных антител, содержащих только фрагменты, необходимые для распознавания антигена.

Нами сконструированы полностью генетически кодируемые иммунотоксины, включающие анти-HER2/neu scFv-фрагмент антитела, соединенный через шарнирный пептид с тремя различными токсическими белками: псевдомонадным экзотоксином А, рибонуклеазой барназой и фототоксичным флуоресцирующим белком Killer Red. Во всех случаях обе части рекомбинантных белков сохранили свои функциональные свойства: высокую аффинность к антигену и цитотоксическую активность. Цитотоксическое действие иммунотоксинов на HER2/neu гиперэкспрессирующие клетки SKOV-3 человеческой карциномы яичника было намного сильнее, чем индивидуальных токсических агентов.

Полученные результаты демонстрируют высокую перспективность сконструированных рекомбинантных иммунотоксинов для специфического поражения раковых клеток.



## RECOMBINANT ANTICANCER IMMUNOTOXINS

Deyev S.M.

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: dejev@ibch.ru

High-precision tumor targeting with therapeutic agent is based on the concept of the ideal drug as a "magic bullet". Monoclonal antibodies directed against specific tumor antigens are supplying with acting agents (toxins, enzymes, radionuclides, etc.) and improving their biodistribution. However, chemical conjugation of antibodies with agents presents several limitations, such as poor reproductibility, free toxic agent impurities, etc. DNA technologies allow to design fully recombinant immunotoxins using small antibody formats containing only minimal binding fragments as targeting moieties.

We report a fully genetically encoded immunotoxins, consisting of a specific anti-HER2/neu scFv antibody fragment fused via flexible hinge peptide with 3 different toxic proteins: pseudomonas exotoxin A, ribonuclease barnase and phototoxic fluorescent protein Killer Red. In all cases both parts of the recombinant proteins preserved their functional properties: high affinity to antigene and cytotoxic activity. The cytotoxic effect of fusion proteins on HER2/neu positive human ovarian carcinoma SKOV-3 cells was dramatically greater than toxic agents alone.

These results demonstrate the potential of designed recombinant immunotoxins for specific killing of cancer cells.

## ЕСТЕСТВЕННЫЕ АНТИТЕЛА К ГЛИКАНАМ: ФАКТЫ И ГИПОТЕЗЫ

Бовин Н.В.

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

E-mail: bovin@carb.ibch.ru

Естественные антитела (ЕА), часть врожденной иммунной системы, вырабатываются в строго регулируемых количествах в нормальной сыворотке, являясь, таким образом, частью врожденной иммунной системы. Наиболее хорошо изучены антитела к антигенам групп крови А и В, ксеноантигенам, таким как "эпитоп Галили", гликолипиду Форссмана и антигену HD. Уровень ЕА, отличный от нормы, был обнаружен при ряде патологий, включая онкологические заболевания, диабет, рассеянный склероз, язвенную болезнь, синдром холодовой агглютинации, различных невропатий и т.д. Происхождение нормальных антиуглеводных ЕА и причины их изменения при патологиях ясны не полностью. При растущем интересе к возможности диагностического применения антиуглеводных ЕА важно определять углеводные структуры, узнаваемые ЕА, присутствующими в кровотоке здоровых людей.

Нами была протестирована группа из 106 здоровых доноров с применением гликанового эррея (PGA) в формате микрочипа. PGA содержал около 200 гликанов, представленных, в основном, нормальными структурами гликопротеинов и гликолипидов млекопитающих. С помощью PGA было определено, что образцы сыворотки взаимодействовали, по меньшей мере, с 50 нормальными человеческими гликанами. Неожиданным было обнаружение антител, способных узнавать короткие внутренние коры, типичные для гликолипидов и гликопротеинов в виде фрагментов больших гликанов, например, антитела к -Lac-содержащему гликотопу в составе олигосахарида X-X-X-Lac. Аналогично, исследование связывания антител к гликанам, имеющим на восстанавливающем конце -GalNAc $\alpha$ , выявило многочисленные примеры, когда этот фрагмент служит антигенной детерминантой большого олигосахарида, несмотря на "явное" маскирование. По нашей оценке антитела сыворотки связываются с коровыми фрагментами вплоть до 1/3 "сильносвязывающихся" гликанов в PGA, следовательно, данный феномен имеет общий характер и находится в противоречии с общепринятой парадигмой, гласящей, что терминальный фрагмент гликана обладает антигенными свойствами. Если так, то что является мишенями антикоровых антител? Удивительно, но большая часть опухолеассоциированных антигенов представляет собой гликолипиды с коровым фрагментом -Lac или O-цепи гликопротеинов с коровым фрагментом -GalNAc $\alpha$ . Принимая это во внимание, мы выдвинули гипотезу о надзорной роли анти-коровых ЕА за: 1) опухолеспецифическими мембранно-связанными архитектурами, где нормальные гликолипиды в комбинации с прилегающими нормальными молекулами образуют абнормальные гликотопы, 2) абнормальными конформационными гликотопами,



образуемыми –GalNAc $\alpha$  в комбинации с прилегающими фрагментами пептидной цепи.

Рассмотрение обширного репертуара антител, детектируемых с помощью PGA, в свете известных структур бактериальных полисахаридов дает основание полагать, что общепринятая гипотеза о том, что энтеробактерии являются движущей силой для появления антигликановых EA, весьма неполна и должна быть дополнена, по меньшей мере, гипотезой, предполагающей вклад антигликановых EA в надзор над спорадически возникающими трансформированными клетками: узнавание и элиминирование клеток с абнормальным гликозилированием поверхности клетки. Такая объединенная гипотеза лучше и полнее объясняет происхождение идентифицированных нами антител к коровым мотивам гликанов.

## NATURAL ANTIBODIES AGAINST GLYCANS: FACTS AND HYPOTHESES

*Bovin N.V.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: bovin@carb.ibch.ru

Natural antibodies (NAb), part of the innate immunity system, are produced at strictly regulated levels in normal sera without immunization and thus they are the part of the innate immune system. The best studied NAb are those directed to blood group antigens A and B, xeno-antigens such as the "Galili epitope", Forssman glycolipid, and HD-antigen. Abnormal level of anti-carbohydrate NAb was found in a number of pathologies including cancer, diabetes, multiple sclerosis, peptic ulcer, cold agglutinin disease, neuropathies, etc. Genesis of normal anti-carbohydrate NAb and reasons of their changes in the pathologies are not fully understood. With a growing interest in diagnostic applications of anti-carbohydrate Ab, it is important to determine carbohydrate structures that are recognized by Ab present in circulation of healthy individuals.

We tested a cohort of 106 healthy donors using glycan array (PGA) in a microchip format. The PGAs contained ~200 glycans representing mostly normal mammalian structures of glycoproteins and glycolipids. As revealed by PGA, the sera interacted with at least 50 *normal human glycans*. The most unexpected found to be Ab capable of recognizing the short inner cores typical for glycolipids and glycoproteins as a fragment of bigger glycans. For instance, Ab against –Lac containing glycotope in composition of an X-X-X-Lac oligosaccharide. Similarly, inspection of Ab binding to glycans with –GalNAc $\alpha$  at the reducing end revealed numerous examples when this fragment functions as antigenic determinant of a large oligosaccharide, in spite of 'obvious' masking. According to our estimation, serum antibodies do bind to core fragments of up to 1/3 of 'high binding' glycans in the PGA, therefore this phenomenon seems to be general, and in contradiction to a conventional paradigm stating that terminal fragment of glycan possesses antigenic properties. If so, what is the target of anti-core Ab? Intriguingly, most of tumor-associated carbohydrate antigens are glycolipids with core –Lac fragment or glycoprotein O-chains with core –GalNAc $\alpha$  fragment.

Therefore, we hypothesize a surveillance role of anti-core NAb, for identification of: 1) tumor-specific membrane-bound architectures where normal glycolipids in combination with adjacent normal molecules form abnormal glycotopes, and 2) aberrant conformational glycotopes formed by –GalNAc $\alpha$  in combination with adjacent peptide chain fragments. Overview of wide repertoire of PGA-detected Ab in light of known chemical structures of bacterial polysaccharides suggests that conventional hypothesis about enterobacteria being a driving force for anti-glycan NAb is grossly incomplete, and that it should be complemented at least by a hypothesis proposing a contribution of anti-glycan NAb in surveillance over sporadically appearing transformed cells – recognizing and eliminating cells with abnormal cell surface glycosylation. Such combined hypotheses would then create a foundation of a search for the origin of identified Ab against glycan core motifs.

## THE UBIQUITIN PROTEOLYTIC SYSTEM: FROM BASIC MECHANISMS THROUGH HUMAN DISEASES AND ONTO DRUG TARGETING

Ciechanover A.

Cancer and Vascular Biology Research Center, Faculty of Medicine,  
Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel  
E-mail: c\_tzachy@netvision.net.il

Between the sixties and eighties, most life scientists focused their attention on studies of nucleic acids and the translation of the coded information. Protein degradation was a neglected area, considered to be a non-specific, dead-end process. While it was known that proteins do turn over, the large extent and high specificity of the process – whereby distinct proteins have half-lives that range from a few minutes to several days – was not appreciated. The discovery of the lysosome by Christian de Duve did not significantly change this view, as it was clear that this organelle is involved mostly in the degradation of extracellular proteins, and their proteases cannot be substrate-specific. The discovery of the complex cascade of the ubiquitin pathway revolutionized the field. It is clear now that degradation of cellular proteins is a highly complex, temporally controlled, and tightly regulated process that plays major roles in a variety of basic pathways during cell life and death, and in health and disease. With the multitude of substrates targeted, and the myriad processes involved, it is not surprising that aberrations in the pathway are implicated in the pathogenesis of many diseases, certain malignancies and neurodegeneration among them. Degradation of a protein via the ubiquitin/proteasome pathway involves two successive steps: **(a)** conjugation of multiple ubiquitin moieties to the substrate, and **(b)** degradation of the tagged protein by the downstream 26S proteasome complex. Despite intensive research, the unknown still exceeds what we currently know on intracellular protein degradation, and major key questions remain unsolved. Among these are the modes of specific and timed recognition for the degradation of the many substrates, and the mechanisms that underlie aberrations in the system that lead to pathogenesis of diseases. The recent discovery of modification by ubiquitin-like proteins along with identification of "non-canonical" polyubiquitin chains that serve non-proteolytic functions, have broadened the scope of the system beyond proteolysis and set new challenges in for biologists and proteomic experts. Major challenges in the field are clearly (i) identification of the cellular proteins tagged by ubiquitin and ubiquitin-like proteins, (ii) identification of the downstream elements recognized by these chains, and (iii) deciphering the structure of the different ubiquitin and ubiquitin-like chains that tag the different proteins.

## ПРОИЗВОДНОЕ ПЛАСТОХИНОНА, АДРЕСОВАННОЕ В МИТОХОНДРИИ, КАК СРЕДСТВО, БЛОКИРУЮЩЕЕ ПРОГРАММУ СТАРЕНИЯ ОРГАНИЗМА

Скулачев В.П.

Институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ  
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия  
E-mail: skulach@belozersky.msu.ru

Высказано предположение, что программа старения организма появилась в процессе биологической эволюции для ускорения этой эволюции. В рамках такой концепции старение человека нужно рассматривать как атавизм, так как люди не полагаются на свою эволюцию, поскольку она осуществляется слишком медленно. Если старение запрограммировано, то нарушение этой программы может его предотвратить так же, как и ингибирование программы клеточной смерти (апоптоза) предотвращает гибель клетки. Существует множество указаний на то, что программа старения приводит к угасанию физиологических функций организма за счет действия токсических производных кислорода (активных форм кислорода, АФК), которые образуются в митохондриях, являющихся основными потребителями  $O_2$  в клетке. Исходя из этой точки зрения, мы полагаем, что митохондриально-направленные антиоксиданты могут быть ингибиторами программы старения. Для исследования этой возможности был сформирован проект с участием нескольких групп исследователей из России, Швеции и США. В основу организации проекта были заложены принципы, так блестяще использованные Ю.А. Овчинниковым в его "Мегапроекте" Родопсин, в котором автору посчастливилось принять участие. Прежде всего, был синтезирован новый тип соединений (SkQ), состоящих из пластохинона (антиоксидантная часть), проникающего катиона и деканового или пентанового линкера. В экспериментах с использованием плоской бислоидной фосфолипидной мембраны (БЛМ) мы отобрали производные SkQ с наиболее высокой проникающей способностью, а именно 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфоний (SkQ1), 10-(6'-пластохинонил) децилродамин 19 (SkQR1) и 10-(6'-метилпластохинонил) децилтрифенилфосфоний (SkQ3). Анти- и прооксидантные свойства отобранных соединений, а также 10-(6'-убихинонил) децилтрифенилфосфония (MitoQ) были проверены в водных растворах, на мицеллах, липосомах, БЛМ, изолированных митохондриях и клеточных культурах. Эксперименты с митохондриями показали, что микромолярные концентрации исследуемых соединений оказывают прооксидантный эффект, однако, более низкие концентрации проявляют антиоксидантную активность, которая падает в ряду  $SkQ1 = SkQR1 > SkQ3 > MitoQ$ . Было показано, что SkQ1 способен восстанавливаться дыхательной цепью митохондрий, т.е. данное соединение является возобновляемым антиоксидантом. Наномолярные концентрации SkQ1 специфически предотвращают окисление митохондриального кардиолипина. В клеточных культурах SkQR1 флуоресцентное производное SkQ, окрашивало исключительно митохондрии. Чрезвычайно низкие концентрации SkQ1 и

SkQR1 блокировали апоптоз клеток HeLa и человеческих фибробластов, вызванный действием  $H_2O_2$ . Более высокие концентрации SkQ требовались для защиты клеток от некроза, вызванного АФК. Эксперименты с грибами *Podospora anserina*, рачками *Ceriodaphnia affinis*, дрозофилами, рыбами *Nothobranchius furzeri* и мышами показали, что SkQ1 удлиняет продолжительность жизни организмов, наиболее эффективно действуя на раннем и среднем этапах старения. У млекопитающих действие SkQ на процесс старения сопровождалось ингибированием развития таких возраст-зависимых патологий, как катаракта, ретинопатия, глаукома, облысение, остеопороз, инволюция тимуса, анемия, перекисное окисление липидов и белков и т.д. SkQ1 оказывал сильное терапевтическое действие на уже развившуюся ретинопатию, в особенности, на врожденную дисплазию сетчатки. С помощью капель, содержащих 250 нМ SkQ1, было восстановлено зрение 67 из 89 животных (собаки, кошки, лошади), ослепших вследствие ретинопатии. Капли SkQ1 предотвращали потерю зрения у кроликов в модели экспериментального увеита и возвращали зрение уже ослепшим животным. Благоприятный эффект тех же капель проявлялся и в модели экспериментальной глаукомы на кроликах. Кроме того, предварительная обработка крыс SkQ1 значительно снижала аритмию изолированных сердец, вызванную ишемией или  $H_2O_2$ . SkQ1 значительно уменьшал область повреждения при инфаркте миокарда или инсульте, а также предотвращал гибель животных при ишемии почки. В мутантных мышцах без белка p53 SkQ1 (5 нмоль/кг в день) снижал уровень АФК в селезенке и ингибировал появление лимфом в той же степени, что и традиционный антиоксидант N-ацетилцистеин, взятый в миллион раз более высокой концентрации. Полученные данные свидетельствуют о том, что соединения группы SkQ являются многообещающим средством для лечения старения, а также патологий, зависящих от возраста.

## MITOCHONDRIA-TARGETED PLASTOQUINONE DERIVATIVE AS A TOOL TO INTERRUPT SENESCENCE PROGRAM OF ORGANISM

Skulachev V.P.

Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

E-mail: skulach@belozersky.msu.ru

It is suggested that senescence was invented by biological evolution to accelerate this evolution. A consequence of such kind of reasoning consists in that for humans senescence should be regarded as an atavism since humans do not rely on their evolution which is too slow. If senescence is programmed, it might be prevented by inhibiting this program just as inhibition of the programmed cell death (apoptosis) is shown to prevent such a death. There are numerous indications that senescence program declines physiological functions by means of reactive oxygen species (ROS) produced in mitochondria which are responsible for consumption of the main portion of  $O_2$  by the cell. Assuming this point, one may hope that mitochondrial-targeted antioxidants might be inhibitors of senescence program. To study such a possibility, a project has been established with participation of several research groups from Russia, Sweden and USA. The project is based upon principles so brilliantly applied by Professor Yu.A. Ovchinnikov in his "megaproject" Rhodopsin in which the author took part. A new type of compounds (SkQs) consisting of plastoquinone (an antioxidant moiety), a penetrating cation, and a decane or pentane linker has been synthesized. Using planar bilayer phospholipid membrane (BLM), we selected SkQ derivatives with the highest permeability, namely plastoquinonyl decyltriphenylphosphonium (SkQ1), plastoquinonyl decylrhodamine 19 (SkQR1), and methylplastoquinonyl decyltriphenylphosphonium (SkQ3). Anti- and prooxidant properties of these substances and also of ubiquinonyl decyltriphenylphosphonium (MitoQ) were tested in aqueous solutions, detergent micelles, liposomes, BLM, isolated mitochondria and cell cultures. In mitochondria, micromolar cationic quinone derivatives were found to be prooxidants, but at lower (sub-micromolar) concentrations they displayed antioxidant activity that decreases in the series SkQ1 = SkQR1 > SkQ3 > MitoQ. SkQ1 was reduced by mitochondrial respiratory chain, i.e. it is a rechargeable antioxidant. Nanomolar SkQ1 specifically prevented oxidation of mitochondrial cardiolipin. In cell cultures, SkQR1, a fluorescent SkQ derivative, stained only one type of organelles, namely mitochondria. Extremely low concentrations of SkQ1 or SkQR1 arrested  $H_2O_2$ -induced apoptosis in human fibroblasts and HeLa cells. Higher concentrations of SkQ were required to block a ROS-initiated necrosis. In the fungus *Podospora anserina*, the crustacean *Ceriodaphnia affinis*, drosophila, fish *Nothobranchius furzeri* and mice, SkQ1 prolonged lifespan, being especially effective at early and middle stages of aging. In mammals, the effect of SkQs on aging was accompanied by inhibition of development of such age-related diseases and traits as cataract, retinopathy, glaucoma, balding, canities, osteoporosis, involution of the thymus, anemia, peroxidation of lipids and proteins, etc. SkQ1 manifested a strong therapeutic

action on some already pronounced retinopathies, in particular, congenital retinal dysplasia. With drops containing 250 nM SkQ1, vision was restored to 67 of 89 animals (dogs, cats, and horses) that became blind because of a retinopathy. Instillation of SkQ1-containing drops prevented the loss of sight in rabbits with experimental uveitis and restored vision to animals that had already become blind. A favorable effect of the same drops was also achieved in experimental glaucoma in rabbits. Moreover, the SkQ1 pretreatment of rats significantly decreased the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- or ischemia-induced arrhythmia of the isolated heart. SkQs strongly reduced the damaged area in experimental myocardial infarction or stroke and prevented the death of animals from kidney ischemia. In p53<sup>-/-</sup> mice, 5 nmol SkQ1/kg x day decreased the ROS level in the spleen and inhibited appearance of lymphomas to the same degree as million-fold higher concentration of conventional antioxidant N-acetylcysteine. Thus, SkQs look promising as potential tools for treatment of senescence and age-related diseases.

## CATIONIC HOST DEFENCE PEPTIDES – HOW DO THEY KILL MICROBES?

### Sahl H.-G.

Pharmaceutical Microbiology University of Bonn, Meckenheimer Allee 168, 53115 Bonn, Germany  
E-mail: sahl@microbiology-bonn.de

Cationic antimicrobial peptides (AMPs; synonyms: host defence peptides, HDPs; defensins) are most frequently occurring antibiotics and are produced by virtually every life form as a first line of host defence. They do have both direct antibiotic activities which lead to rapid killing of microbes as well a immunomodulatory activities which lead to upregulation of defence pathways and recruitment of immune cells (1). Both activities are highly interesting for the development of innovative anti-infective strategies. However, in spite of considerable development activities, AMP-based antibiotics did not reach the market so far, and it may be necessary to better understand their molecular activities for AMP based rational drug design.

Unlike conventional antibiotics which act via defined target molecules, antimicrobial host defence peptides are assumed to act unspecifically by permeabilising cell membranes. We used various naturally occurring HDPs and synthetic AMPs to study their antimicrobial activity in more detail. We found that the antibiotic activity of cationic amphiphilic peptides is based on multiple inhibitory activities and that the perturbation of the membrane lipid bilayer may at best be just one of the multiple activities. In general terms, AMPs appear to disturb the coordinated function of highly dynamic, membrane bound multi-enzyme machineries such as the cell wall biosynthesis machinery and respiratory chains.

This became most obvious from studies with human  $\beta$ -defensin 3 (hBD3), a highly charged molecule produced by epithelial cells and neutrophils. It retains antimicrobial activity against a broad range of pathogens, including multiresistant *Staphylococcus aureus*, even under high salt conditions. We could not observe hBD3 induced depolarization of the cytoplasmic membrane and ion leakage. The transcriptional response pattern of staphylococcal cells treated with the defensin indicated that hBD3, similar to vancomycin and some lantibiotics, induces the staphylococcal cell wall stress stimulon, strongly suggesting that cell wall biosynthesis is primarily inhibited. This was further supported by transmission electron microscopy and whole cell assays. Analysis of the intracellular pool of soluble cell wall precursors revealed the accumulation of the ultimate nucleotide-activated precursor UDP-MurNAc-pentapeptide, which typically occurs with antibiotics targeting membrane-bound steps of cell wall biosynthesis. The accumulation experiment also demonstrates that cells are not completely deenergised and rather continue to perform biosynthesis; also, small cytoplasmic compounds such as the soluble precursor do not leak out, i.e. cross membrane permeabilisation cannot occur. *In vitro* testing of the individual cell wall biosynthesis reactions taking place on the outside, such as the PBP2 crosslinking reactions, were substantially inhibited. Quantitative analysis suggested that hBD3 may stoichiometrically bind to the membrane carrier bound form of the precursor, designated Lipid II (2).

### *References*

1. Hancock R.E.W., Sahl H.G.: Antimicrobial and host defence peptides as novel anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, **24**, 1551-1557 (2006).
2. Sass V., Schneider T., Wilmes M., Tossi A., Novikova N., Shamova O., Sahl H.G.: Human beta-defensin 3 (hBD3) inhibits cell wall biosynthesis in staphylococci; submitted.



## МЕДИАТОРЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

Недоспасов С.А.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия  
E-mail: sergei.nedospasov@googlemail.com

Концептуальная революция, которая произошла в иммунологии за последнее десятилетие, придала врожденному иммунному распознаванию центральную роль в регуляции защитных и воспалительных ответов организма. Было открыто несколько семейств рецепторов, которые не только являются сенсорами молекулярных паттернов, присутствующих на компонентах микробов (например, ЛПС грамотрицательных бактерий), но они же и запускают внутриклеточные сигнальные каскады, обеспечивающие иммунную защиту и воспалительные реакции. Эти рецепторы включают в себя как мембранные, так и внутриклеточные Толл-подобные рецепторы (TLRs), цитоплазматические NOD-подобные рецепторы (NLRs) и некоторые другие. Группа важных молекулярных медиаторов, действующих как адапторные молекулы для этих рецепторов, включает MyD88, TRIF, TIRAP и другие молекулы, причем они также используются при передаче сигнала от цитокиновых рецепторов семейства ИЛ-1Р. Фактор некроза опухолей (ФНО), который изначально был открыт благодаря своим противоопухолевым эффектам у мышей, оказался важным медиатором сигналов врожденного иммунитета, в частности, запускаемых TLRs. Другие важные цитокины, индуцируемые как через TLRs, так и через RIG-подобные рецепторы, это – интерфероны первого типа и цитокины семейства ИЛ-1, которые индуцируются через NLRs посредством образования так называемых инфламмосом. В наших исследованиях мы используем генетически модифицированных мышей для изучения роли медиаторов врожденного иммунитета, с основным упором на регуляторную цепь ЛПС→TLR4→MyD88→ФНО. Мыши, дефицитные по ФНО, не могут развивать защитного ответа на заражение внутриклеточными бактериями, такими как листерия или микобактерии, предположительно, вследствие неспособности образовывать бактерицидные гранулемы. С другой стороны, патогенная сверхпродукция ФНО и ИЛ-1 лежит в основе ряда аутоиммунных и воспалительных заболеваний, и терапии, основанные на системной блокировке передачи сигнала от этих цитокинов, уже используются в клинике. Надо понимать, что при системной блокировке отменяются и некоторые из "полезных" функций цитокинов. Мы использовали несколько панелей мышей с контролируемым отключением или усилением передачи сигнала с участием ФНО для изучения баланса между "полезными" и "вредными" физиологическими функциями ФНО. В частности, мы создали мышей, которые позволяют изучать невырожденные эффекты ФНО, производимого конкретными видами иммунных клеток, а также ФНО, продуцируемого в растворимой или мембранно-связанной форме, в защите от бактерий. Оказалось, что ФНО, продуцируемый не только макрофагами, но и Т-лимфоцитами, играет уникальную (т.е. невырожденную) роль в защите организма. Кроме того, мы создали мышей, "гуманизированных" по ФНО, которые позволяют сравнивать эффекты клинически применяемых блокаторов ФНО на функции защиты организма в животной модели. Одной из наших целей является разработка более безопасных методов анти-цитокиновой терапии, которая минимально нарушала бы функции защиты организма.

## MEDIATORS OF INNATE IMMUNITY

Недоспасов С.А.

Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow, Russia  
E-mail: sergei.nedospasov@googlemail.com

Conceptual revolution that was taking place in immunology during the last decade placed innate immune recognition into the center of regulation of protective immune and inflammatory responses in the host. Several families of receptors have been discovered which are not only recognizing molecular patterns on microbial components (ex. LPS of Gram-negative bacteria), but also initiate intracellular signal transduction leading to immune protection and inflammatory reactions. Such receptors include membrane and intracellular Toll-like receptors (TLRs), cytoplasmic NOD-like receptors (NLRs) and some others. A group of important molecular mediators acting as accessory molecules on TLRs include MyD88, TRIF, TIRAP and others, some of them are also used in IL1 receptor signaling pathways. TNF which was originally discovered due to its potent anti-tumor activity in mice, turned out to be one of the critical mediators of innate immune signaling, in particular, triggered by TLRs. Other important cytokines induced by several TLRs and RIG-like receptors include type I interferon, while the cytokines of IL-1 family are induced by NLRs via inflammasome formation. In our work we are using engineered mice to uncover the role of mediators on innate immunity with major focus on LPS→TLR4→MyD88→TNF axis. TNF deficient mice fail to mount protective responses against intracellular bacteria, such as *Listeria* or *Mycobacteria*, presumably due to defective bactericidal granuloma formation. On the other hand, pathogenic overproduction TNF and IL-1 was implicated in several autoimmune diseases, and therapies based on systemic blockade of cytokine signaling are being used in clinic. It should be noted that systemic ablation could also inhibit beneficial functions of the same cytokines. Therefore, we used several panels of mice with specific ablation or enhancement of TNF signaling to uncover the balance between beneficial and deleterious physiological functions of TNF. In particular, we have generated mice allowing us to define the source (type of immunocyte) and molecular form (soluble versus membrane-bound) of TNF with non-redundant role in anti-bacterial defense. Surprisingly, not only macrophage, but also T-cell derived TNF is critical for host defense. Additionally, we have developed "humanized" mouse models allowing to compare effects on host defense of clinically used drugs. One of our goals is to design safer modes of anti-cytokine therapy which would minimally disturb host defense functions.

## **БИОАНАЛИТИЧЕСКИЕ РЕАГЕНТЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРНО-КАПСУЛИРОВАННЫХ (CdSe)ZnS НАНОКРИСТАЛЛОВ**

*Зубов В.П., Генералова А.Н., Сизова С.В., Деев С.М., Олейников В.А.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: zubov@ibch.ru

В последние годы интенсивно разрабатываются подходы к визуализации процессов на уровне клеток, тканей и целых организмов, основанные на введении специализированных флуоресцентных меток. Одними из наиболее перспективных меток нового поколения являются флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы (НК), состоящие из соединений групп II-VI, III-V и имеющие структуру ядро/оболочка.

Полупроводниковым НК присущи два основных достоинства, отличающие их от органических флуорофоров: 1) широкий набор узких полос флуоресценции, положение которых зависит от диаметра НК и является управляемым параметром при возможности возбуждения излучением с одной длиной волны; при этом длина волны возбуждения может варьироваться для получения максимального соотношения сигнал/шум с учетом конкретного изучаемого объекта; 2) высокая фотостабильность НК, в 100-4000 раз превышающая фотостабильность лучших органических флуорофоров.

Одной из проблем использования таких флуоресцентных НК является трудность получения биосовместимых, легко конъюгируемых с биологическими молекулами флуоресцентных комплексов, что ограничивает их применение в биотехнологии и медицине в качестве эффективных флуоресцентных биомаркеров и сенсоров.

Для решения указанной проблемы авторами был разработан ряд способов капсулирования нанокристаллов в полимерные матрицы и поверхностной модификации нанокристаллов органическими соединениями, что позволило получить серию флуоресцентных реагентов для различных видов биоанализа, а также для создания новых флуоресцентных сенсоров, действие которых основано на использовании эффекта резонансной передачи энергии (FRET-эффект). Эффективность этих систем показана на примерах различного вида иммуноагглютинации, проточной цитофлуориметрии, визуализации клеток, клеточных рецепторов и тканей.

## **BIOANALYTICAL REAGENTS BASED ON POLYMER-ENCAPSULATED FLUORESCENT SEMICONDUCTOR CdSe(ZnS) NANOCRYSTALS**

*Zubov V.P., Generalova A.N., Sizova S.V., Deyev S.M., Oleinikov V.A.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia  
E-mail: zubov@ibch.ru

Up to now there are great variety of bioanalytical and medical assays based on using fluorescent labels [1]. Recently, luminescent semiconductor nanocrystals, known also as quantum dots (QDs) are shown to be very promising fluorescent labels. The main advantages of nanocrystal as compared to organic dyes are: 1) control of the fluorescence emission wavelength by changing the nanocrystal size; 2) wide spectral excitation band which allows one to use one source of excitation light for exciting of all color fluorescence that is far away from the emission wavelength of nanocrystals (more than 100 nm). In addition, nanocrystals are characterized by unique luminescent properties: a high quantum yield and photostability. An important example of such particles is (CdSe)ZnS nanocrystals - inorganic particles containing the CdSe central core which determines the parameters of fluorescence, and ZnS shell which provides high fluorescence intensity [2]. However, their hydrophobic nature, insufficient photo- and chemical stability in physiological media, the lack of the surface functional groups limit their application in bioanalytical assays. To solve these problems we have suggested two ways of nanocrystal modification: 1) embedding nanocrystals into polymer particles; and 2) surface modification of nanocrystals with synthetic and natural polymers having anchor groups.

In the first case poly(acrolein-co-styrene) particles were synthesized by emulsifier-free radical copolymerization of acrolein with styrene at the various monomer ratios in the presence of initiator K2S2O8 and doped with nanocrystals after synthesis. Such procedure allowed obtaining the chemical and colloidal stable polymer dispersions with particle diameters about 0.1-0.7  $\mu\text{m}$  and aldehyde groups on their surface as well as to incorporate simultaneously several kinds of nanocrystals with various fluorescence emission peaks (from 536 to 620 nm) for multiplex coding of biological objects. Various methods of surface modification of co-poly(acrolein/styrene) particle using seed polymerization of thermosensitive polymer (polyvinylcaprolactam) in the presence of copolymer particles or layer-by-layer technique of polyelectrolyte deposition on particle surface enable to obtain environmentally responsive polymer particles.

In the second case our research is based on the one hand on the formation of the double-layered solubilizing shell on the surface of nanocrystals. The first layer contains molecules attached to the surface of QDs via formation of covalent or coordination bond, and the second layer consists of long-chain polymer molecules (poly-L-lysine, chitosan, insulin, antibody, etc.). On the other hand research is based on the modification of the nanocrystals through hydrophobic interaction of tri-*n*-octylphosphineoxide which is used for stabilization of nanocrystals during their preparation. Amphiphilic polymers, such as DOPE-substituted acrylamide,



poly(maleic-alt-1-tetradecene), (mercaptoundec-11-yl)tetra(ethylene glycol), 16-mercaptohexadecanoic acid, etc. are used. These modifications allowed to obtain aqueous dispersion of nanocrystals having diameters 5-10 nm with functional groups on their surface.

The opportunity of modified nanocrystal applications in immunoassay for detection of antigen *Y.pestis* and labeling of breast carcinoma cells were demonstrated.

#### References

1. L.B. Bangs, Immunological applications of microspheres, *Pure Appl. Chem.* **68** (1996) 1873-1877.
2. A.P. Alivisatos, Nanocrystals: Building blocks for modern materials design, *Endeavour* **21** (1997) 56-60.

## СВОРАЧИВАНИЕ БЕЛКА: ЗАВИСИМОСТЬ ОТ ЕГО РАЗМЕРОВ, ФОРМЫ, СТРУКТУРЫ И СТАБИЛЬНОСТИ

Финкельштейн А.В., Иванков Д.Н., Богатырёва Н.С.,  
Гарбузинский С.А., Галзитская О.В.

Институт белка РАН, Пушкино, Россия

E-mail: afinkel@vega.protres.ru

Универсальные свойства спонтанной самоорганизации белковой структуры (т.е. "сворачивания белка") наблюдаются вблизи точки термодинамического равновесия между "нативным" состоянием белка (полностью свернутым и структурированным) и его "денатурированным" (относительно рыхлым и слабо структурированным) состоянием. Здесь переход "денатурированное состояние" ↔ "нативное состояние" происходит как обратимый переход типа "все-или-ничего", т.е. протекающий без накопления метастабильных промежуточных состояний, так что только переходное, самое нестабильное на пути сворачивания белка состояние обнаруживает себя на опыте – по своему влиянию на кинетику сворачивания и разворачивания белка. Теория скоростей сворачивания (и разворачивания) белков сходна с классической физической теорией скорости инициации фазовых переходов первого рода. Она, в разумном соответствии с экспериментальными данными, показывает, что размер белка определяет диапазон возможных скоростей его сворачивания в окрестности точки термодинамического равновесия между нативным и денатурированным состояниями белка, – в то время как его форма, структура и стабильность позволяют более точно предсказать скорость сворачивания и разворачивания белка и очертить ядро его сворачивания.

Эта работа была поддержана программами "Молекулярная и клеточная биология" Российской академии наук и "Ведущие научные школы России", грантами Федерального агентства по науке и инновациям, Российского фонда фундаментальных исследований, INTAS и Howard Hughes Medical Institute.

**PROTEIN FOLDING: DEPENDENCE ON SIZE, SHAPE,  
STRUCTURE AND STABILITY OF THE PROTEIN**

***Finkelstein A.V., Ivankov D.N., Bogatyreva N.S., Garbuzinsky S.A.,  
Galzitskaya O.V.***

Institute of Protein Research RAS, Pushchino, Russia

E-mail: afinkel@vega.protres.ru

Universal features of spontaneous formation of protein structures (i.e. of "protein folding") are observed near the point of thermodynamic equilibrium between the "native" (completely folded and structured) and "denatured" (loose and poorly-structured) states of the protein. Here the "two-state" ("denatured state" ↔ "native state") transition is reversible and proceeds without accumulation of metastable intermediates, and here only the transition state, i.e. the most unstable state in the folding pathway, can be outlined experimentally by its essential influence on the folding/unfolding kinetics. A theory of protein folding (and unfolding) rates is similar to basic physical theory of rates of initiation of the first order phase transitions. It shows that protein's size determines, in a reasonable agreement with experimental data, a range of possible protein's folding rates in the vicinity of the point of thermodynamic equilibrium between the native and denatured states of the protein, while its shape, structure and stability help to do more accurate prediction of the protein folding and unfolding rates and to outline the protein folding nucleus.

This work was supported by programs "Molecular and Cellular Biology" of the Russian Academy of Sciences and "Leading Scientific Schools of Russia" and by the grants from the Federal Agency for Science and Innovations, Russian Foundation for Basic Research, INTAS and Howard Hughes Medical Institute.

**UNDERSTANDING LIVER PATHOLOGY USING BIOCHEMISTRY  
AND BIOPHYSICS TOOLKIT**

***Lutsenko S.V., Burkhead J., Ralle M., Huster D.***

Department of Biochemistry and Molecular Biology Oregon Health & Science  
University, Portland OR, USA

E-mail: slutsen1@jhmi.edu

Normal human growth and development depend on efficient uptake and distribution of copper in cells and tissues. Copper serves as a cofactor of key metabolic enzymes participating in radical detoxification, neurotransmitter biosynthesis, connective tissue formation and many others important physiological processes. In addition, copper modulates immune response, lipid biosynthesis, and angiogenesis. Disruption of copper metabolism in humans is associated with severe neurodegenerative and metabolic disorders. One such disorder is Wilson's disease, which is caused by inactivation of copper transporting ATPase ATP7B and large accumulation of copper in tissues. We have demonstrated that the *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice represent a useful animal model to study hepatic manifestations of Wilson's disease. Using X-ray fluorescent spectroscopy we observed correlation between the subcellular distribution of copper in hepatocytes and morphological changes in liver tissue. We also found that at the early stages of copper accumulation, copper preferentially enters cell nuclei. Once in the nucleus, copper does not alter the content of other metals nor does it induce non-specific oxidation of nuclear proteins. Rather, elevated copper selectively modulates nuclear RNA splicing machinery. Changes in RNA biogenesis are manifested by specific alterations of liver transcriptome and accompanying metabolic changes.

## FIGHTING BLINDNESS: FROM GENE DISCOVERIES TO DRUG DEVELOPMENT

Petrukhin K.

Department of Ophthalmology, Columbia University Medical Center, New York, NY, USA

E-mail: kep4@columbia.edu

Blindness ranks third (after cancer and heart disease) as people's major fear. Age-related macular degeneration (AMD) is the most common cause of legal blindness in elderly individuals. There are two major clinical presentations of AMD. The most prevalent atrophic (dry) AMD is characterized by degeneration of retinal pigment epithelium and neuroretina. A proportion of dry AMD patients (~10%) develop choroidal neovascularization which is known as neovascular (wet) form of AMD. Despite the prevalence and clinical importance of dry AMD (it affects more patients than Alzheimer's disease) its molecular mechanisms remain unknown; there are no treatments or established drug targets for this blinding condition.

One approach to finding AMD-related pathways and new drug targets for AMD treatment is to study rare early-onset Mendelian forms of macular degeneration with phenotypic similarities to AMD. There are five known forms of inherited macular dystrophies. We attempted identification of the disease genes responsible for two autosomal dominant forms of inherited maculopathies, Best's disease and Stargardt-like macular dystrophy. In pursuit of the Best's disease gene, we limited the minimum genetic region by recombination breakpoint analysis and mapped to this region a novel retina-specific gene, called *Bestrophin*. Mutation analyses of *Bestrophin* revealed five independent mutations segregating with the disease phenotype. Genetic mapping data and identification of independent disease-specific mutations provide convincing evidence that *Bestrophin* represents the BD gene. Subsequent studies established bestrophin as a founding member of the new family of Ca-activated Cl channels. Autosomal dominant Stargardt-like macular dystrophy (STGD3) is an inherited form of macular degeneration characterized by decreased visual acuity, macular atrophy and extensive fundus flecks. We limited the minimum genetic region for STGD3 to a 0.6-cM interval by recombination breakpoint mapping and identify a single 5-bp deletion within the protein-coding region of a new photoreceptor-specific gene, ELOVL4, in all affected pedigree members. ELOVL4 catalyses a critical elongation step in biosynthesis of very long chain fatty acids in the retina. Our results are the first to implicate the biosynthesis of fatty acids in the pathogenesis of macular degeneration. This provided rationale for currently conducted clinical trials on fatty acid supplementations as a treatment for AMD.

Our second approach to identification of new AMD treatments is evaluation of potential drug targets expressed specifically in the retina. The majority of current medicines are small molecule drugs. Small molecule drugs can be developed for a limited number of protein classes called drug targets. Nuclear receptors (NR) comprise a family of ligand-dependent transcription factors. One in ten of the most widely used drugs acts via nuclear receptors attesting to their importance as drug targets. We identified a nuclear receptor, NR2E3, expressed exclusively in photoreceptor cells of the retina. We performed a screen for small molecule NR2E3 agonists and currently work to establish their photoreceptor protection properties in animal models of retinal degeneration.

**Support:** NIH Grant 1R21NS061718-01, the Peacock Trusts grant, and gifts from the Burch Family Foundation, the Mary Jaharis-John Catsimatidis Scholarship Fund, the Eye Surgery Fund, and the Kaplen Foundation.

## N-АЦИЛДОФАМИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ЛИПИДНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ

Акимов М.Г., Бобров М.Ю., Грецкая Н.М., Зинченко Г.Н., Безуглов В.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: vvbez@mx.ibch.ru

Нейротрансмиттеры, ацилированные по аминокетильной группе жирными кислотами, – сравнительно недавно открытая группа липидных регуляторов, которая на данный момент включает ацилглицины, ацилгамма-аминомасляные кислоты и ацилдофамины. В головном и спинном мозге млекопитающих идентифицированы дофамины арахидоновой (AA-DA), пальмитиновой, олеиновой и стеариновой кислот. Нами установлено, что, по крайней мере, еще один ацилдофамин – N-докозагексаеноилдофамин (DHA-DA) является природным соединением, т.к. его наличие, биосинтез и сульфатирование были показаны в тканях пресноводных гидр. Кроме того, были определены основные звенья биосинтеза N-ацилдофаминов в тканях крысы. Установлено, что образование N-ацилдофаминов может осуществляться путём конъюгации жирной кислоты и дофamina или в результате превращения N-ацилтирозина, не требует участия кофактора А, а при биосинтезе с промежуточным образованием N-ацилтирозина стадия декарбоксилирования предшествует стадии окисления. Метаболизм N-ацилдофаминов включает процессы ферментативного метилирования, сульфатирования, глюкуронидирования, а также окисления как ацильной части, так и катехольной группы. В последнем случае образующиеся хиноны способны взаимодействовать с белками, вызывая их олигомеризацию.

AA-DA и DHA-DA обладают выраженным нейрозащитным действием. Они предохраняют нейроны мозга от гибели в условиях гипоксии и защищают гранулярные нейроны мозжечка крысы в модели  $K^+$ -сывороточной депривации. Последний эффект не чувствителен к ингибиторам каннабиноидного рецептора 1 типа (CB1) и дофаминовых рецепторов, но существенно снижается в присутствии ингибиторов CB2- или TRPV1-рецепторов. Показано, что эти ацилдофамины ингибируют активность проапоптотических каспаз 3 и 9. Механизм защитного действия AA-DA и DHA-DA реализуется, по-видимому, с участием фосфоинозитол-3-киназы и протеинкиназы С, т.к. соответствующие ингибиторы (LY294002 и GF109203X) снижали защитное действие обоих соединений на 40% и 25%, соответственно. Кроме того, ингибирование кальмодулин-зависимой протеинкиназы 2 снижало нейропротекцию AA-DA в 2 раза, эффект DHA-DA блокировался полностью, тогда как ингибитор протеинкиназы А (Kt 5720) уменьшал нейрозащитное действие только AA-DA. Ингибиторы MAPKK/MEK и MEK1/MEK2 киназ не оказывали влияния на защитное действие исследуемых соединений. Кроме рецепторопосредованного действия на системы передачи сигнала AA-DA и DHA-DA способны оказывать защитное действие на нейроны за счёт своих антиоксидантных свойств. В опытах *in vivo* на модели болезни Паркинсона у мышей, симптомы

которой индуцировали в течение 7 дней хроническим введением нейротоксина МРТР (значительное снижение локомоторной активности), однократная инъекция ДНА-ДА (10 мг/кг) в последний день введения МРТР приводила к частичному восстановлению (на 30%) локомоторной активности на следующие сутки.

N-Ацилдофамины оказывают сильное морфогенное действие при регенерации и на ранних стадиях эмбриогенеза. Эти эффекты проиллюстрированы опытами (совместно с ИБР РАН) на пресноводных гидрах, зародышах мышей и морских ежей.

N-Ацилдофамины обладают умеренной антиагрегационной активностью по отношению к тромбоцитам человека и способны увеличивать локальный мозговой кровоток, что делает их перспективными для разработки веществ – кандидатов новых лекарственных препаратов. Это показано на примере конъюгата ДНА-ДА с гамма-аминомасляной кислотой.

В дополнение к указанным эффектам N-ацилдофаминов следует упомянуть установленную другими исследователями способность их вызывать сокращение бронхов и мочевого пузыря, гиперальгезию, стимуляцию выброса субстанции P и пептида, родственного кальцитониновому пептиду. Эти нейролипиды влияют на активность фосфатаз, что приводит к подавлению транскрипции генома некоторых вирусов, и оказывают иммуносупрессорное действие. Всё это свидетельствует о многофункциональности N-ацилдофаминов и их важности в системе регуляции организма.

Работа поддержана РФФИ (проект 08-04-00144а).

## N-ACYLDOPAMINES AS MULTIFUNCTIONAL LIPID REGULATORS

*Akimov M.G., Bobrov M.Yu., Gretskeya N.M., Zinchenko G.N., Bezuglov V.V.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: vvbez@mx.ibch.ru

Amino-acylated neurotransmitters are a recently discovered group of lipid regulators comprising at the moment acylglycines, acylgamma-aminobutyric acids and acyldopamines. Dopaminamides of arachidonic (AA-DA), palmitic, oleic and stearic acids have been identified in mammalian brain and spinal cord. We have discovered that at least one more N-acyldopamine N-docosahexaenoyldopamine (DHA-DA) is a natural compound as its presence, biosynthesis and sulfation were shown in the tissues of freshwater hydras. Moreover, the key stages of N-acyldopamines biosynthetic pathway in rat tissues were also determined. It was found that N-acyldopamines could be formed via conjugation of free fatty acid with dopamine or via N-acyltyrosine conversion. The participation of coenzyme A is not required. During biosynthesis with N-acyltyrosine as an intermediate its decarboxylation precedes oxidation. The metabolism of N-acyldopamines includes enzymatic methylation, sulfation, glucuronidation and oxidation of fatty acid and dopamine moieties. In the latter case the quinones produced could interact with proteins inducing their oligomerization.

AA-DA and DHA-DA have profound neuroprotective action. They protect brain neurons from death by hypoxia and protect granular neurons of rat cerebellum in a model of K-serum deprivation. The latter effect was not sensitive to the inhibitors of cannabinoid receptor type 1 (CB1) or dopamine receptors. However it was markedly lower in the presence of TRPV1 or CB2 receptor inhibitors. The ability of these acyldopamines to inhibit proapoptotic caspases 3 and 9 was also demonstrated. The protective action of AA-DA and DHA-DA presumably realizes through phosphatidylinositol-3-kinase and protein kinase C as their inhibitors (LY294002 and GF109203X) decreased the potency of both compounds by 40 and 25% respectively. Moreover, the inhibition of calmodulin-dependent protein kinase 2 resulted in twofold decrease of AA-DA neuroprotective action and completely blocked the one of DHA-DA. At the same time protein kinase A inhibitor (Kt 5720) affected only AA-DA action. The inhibitors of MAPKK/MEK or MEK1/MEK2 kinases had no effect on protective action of compounds under study. Besides receptor-mediated action AA-DA and DHA-DA could produce neuroprotective effects due to their antioxidative properties. In the *in vivo* model of Parkinson disease in mice induced by chronically neurotoxin MPTP injection for 7 days (marked decrease of locomotor activity) single DHA-DA injection (10 mg/kg) at the last day of MPTP treatment resulted in partial (30%) restoration of locomotor activity next day.

N-Acyldopamines have profound morphogenetic action at regeneration and early embryogenesis stages. These effects are illustrated by the experiments (together with IDB RAS) on freshwater hydras, the embryos of mice and sea urchins.

N-Acyldopamines possess moderate antiaggregatory activity on human platelets and are able to increase local brain blood flow, which makes them an attractive candidate for drug design. This has been shown by the example of conjugate of DHA-DA with gamma-aminobutyric acid.

In addition to above-mentioned effects of N-acyldopamines other researchers discovered their ability to induce the constriction of bronchi and urinary bladder, hyperalgesia and ability to stimulate the release of calcitonin-gene related peptide and substance P. These neurolipins affect some phosphatases resulting in immunosuppression and in suppression of some viral genomes' transcription. Obviously N-acyldopamines are multifunctional molecules of great importance for an organism.

## **ELECTRONIC ENERGY TRANSFER/MIGRATION AND BIOMACROMOLECULAR STRUCTURE**

***Johansson L.B.-A.***

Department of Chemistry; Biophysical Chemistry, Umea University, Sweden

E-mail: Lennart.Johansson@chem.umu.se

A new approach to the application, the theory and the analysis of electronic energy transfer is presented. The applications concern the SERine Protease INhibitor (SERPIN) mechanism and the non-covalent polymerization of SERPIN proteins. This study focuses on the Plasmingen Activator Inhibitor type 1 (PAI-1) and the  $\alpha_1$ -antitrypsin. The former SERPIN regulates fibrinolysis (dissolving blood clots) and cell migration, while mutant forms of the latter are connected with neonatal hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. Here, the analysis of time-resolved fluorescence depolarization studies is brought to the same level of theoretical detail as in ESR- and NMR-spectroscopy.

## ЭФФЕКТИВНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ЛИПОСОМЫ С ЛИПОФИЛЬНЫМИ ПРОЛЕКАРСТВАМИ И УГЛЕВОДНЫМИ ЛИГАНДАМИ

*Кузнецова Н.Р., Кандыба А.Г., Гаенко Г.П., Бовин Н.В., Моисеева Е.В., Молотковский Ю.Г., Водовозова Е.Л.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: elvod@ibch.ru

Включение противоопухолевых агентов в липосомы размера 100-150 нм позволяет понизить системную токсичность благодаря уменьшению концентрации свободного лекарства в кровотоке и пассивному транспорту липосом в опухоли, обусловленному повышенной проницаемостью сосудистого эндотелия новообразований. В свою очередь, биodeградируемые конъюгаты липид-лекарство (липофильные пролекарства) обладают улучшенной фармакокинетикой. Мы предлагаем включать липофильные пролекарства химиотерапевтических препаратов в бислой липосом. По сравнению с инкапсулированием в водный объем липосом такой способ доставки дает существенные преимущества: прекращается утечка лекарства из липосом в кровотоке и на стадии взаимодействия с клеткой; изменяется механизм проникновения лекарства в клетку и его внутриклеточный трафик, что повышает потенциал преодоления множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Более того, упрощается технология получения лекарственных липосом.

Мелфалан (M<sub>1</sub>ph) – цитотоксический алкилирующий агент, действующий независимо от стадии клеточного цикла, – применяется как противоопухолевое средство почти 50 лет. Цитостатический агент метотрексат (MTX, антиметаболит фолиевой кислоты) широко применяется для лечения онкологических и аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит. Терапевтическая эффективность MTX ограничивается не только системной токсичностью, но и частым развитием резистентности, которая, в основном, обусловлена неполноценной системой активного транспорта, регулирующей поступление в клетку аналогов фолатов. Нами разработан синтез липидных конъюгатов M<sub>1</sub>ph и MTX (M<sub>1</sub>ph-DG и MTX-DG) на основе 1,2-диолеилглицерина. Сложноэфирная связь между остатками лекарств и диглицеридом легко расщепляется внутри клетки с высвобождением исходного агента благодаря низкой специфичности эстераз. В то же время, пролекарства в составе липосом оказались устойчивы к преждевременному гидролизу эстеразами плазмы крови человека. Нами также показано, что липосомы с MTX-DG преодолевают устойчивость клеток лейкемии человека, связанную с нарушением трансмембранного переноса исходного лекарства.

Физико-химическая стабильность липосом, полученных экструзией из M<sub>1</sub>ph-DG/MTX-DG и природных фосфолипидов, в том числе фосфатидилинозита, обладающего стерически стабилизирующими свойствами и защищающего липосомы от клеток иммунной системы, была

исследована с помощью динамического лазерного светорассеяния, электронной микроскопии и гель-хроматографии. Показано, что оба пролекарства полностью встраиваются в мембрану моноламеллярных липосом среднего размера менее 100 нм и образуют стабильные дисперсии, содержащие лекарственное начало в концентрациях, пригодных для системного введения животным. Для длительного хранения дисперсии можно замораживать в жидком азоте и хранить при температурах ниже -20°C; перед применением их необходимо разморозить и подвергнуть кратковременной обработке на ультразвуковой бане для диспергирования агрегатов.

Для увеличения селективности доставки нами сконструированы M<sub>1</sub>ph-DG/MTX-DG-липосомы, оснащенные углеводными лигандами, специфическими для опухолевых клеток. Терапевтическая эффективность адресных липосом показана *in vivo* на мышинных моделях рака молочных желез и лимфолейкоза. Наиболее выраженным противоопухолевым действием обладали липосомы, несущие тетрасахаридный лиганд селектинов Sialyl Lewis X. Селектины – углеводсвязывающие адгезионные белки, которые опосредуют первичные взаимодействия между циркулирующими лейкоцитами и клетками эндотелия, – вовлечены в многочисленные (пато)физиологические процессы, в том числе развитие воспалительного ответа, метастазирование и пр.

Результаты первой серии экспериментов по изучению сравнительной фармакокинетики липосомального MTX-DG и MTX, введенных мышам внутривенно, показывают, что липосомы обладают большим терапевтическим потенциалом для лечения злокачественной лимфомы и лейкемии.

Работа поддержана грантами РФФИ (проекты 97-04-48421, 00-04-48922, 03-04-48396, 06-04-49432) и МНТЦ (проект 1783).



## EFFECTIVE ANTICANCER LIPOSOMES BEARING LIPOPHILIC PRODRUGS AND CARBOHYDRATE LIGANDS

**Kuznetsova N.R., Kandyba A.G., Gaenko G.P., Bovin N.V., Moiseeva E.V., Molotkovsky J.G., Vodovozova E.L.**

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: elvod@ibch.ru

Inclusion of anticancer agents in 100-150 nm size liposomes allows to decrease systemic toxicity because of diminished free drug concentration in the circulation, and the liposome passive transport into tumors due to enhanced permeability of neovascular endothelium. In turn, lipid-drug conjugates (lipophilic prodrugs) possess improved pharmacokinetics. We propose to include lipophilic prodrugs of anticancer medicines into the liposome bilayer. As compared to the drug encapsulation into the liposome aqueous volume, such delivery way has serious advantages: i) the drug leakage ceases in the circulation and at liposome/cell interaction; ii) the drug penetration and its intracellular traffic change thus improving its ability to overcome multidrug resistance of tumor cells. Moreover, production of such liposomes is simplified.

Melphalan (Mlph), being cell-cycle non-specific cytotoxic alkylating agent, has been used as anticancer medicine for almost 50 years. Cytostatic agent methotrexate (MTX, folic acid antimetabolite) is widely used for the treatment of cancers and autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis. Therapeutic efficacy of MTX is hampered not only by its systemic toxicity but also by the development of tumor cell resistance caused mainly by the deficiency of an active carrier system regulating the folate entrance. We have developed syntheses of Mlph and MTX lipid conjugates (Mlph-DG and MTX-DG) on the basis of 1,2-dioleoylglycerol. Ester linkage between diglyceride and drug moieties provides easy intracellular prodrug splitting by intracellular esterases and release of initial anticancer agent. At the same time, the prodrugs in liposome formulations have been shown to be stable to the premature hydrolysis by esterases of human plasma. Also, liposomes bearing MTX-DG have been shown to overcome resistance of human leukemia cells related to impaired transport of initial drug across membrane.

Physicochemical stability of liposomes prepared by extrusion from Mlph-DG/MTX-DG and natural phospholipids, including phosphatidylinositol as sterically stabilizing component against the cells of immune system, have been studied by dynamic laser light scattering, electron microscopy and gel-chromatography. Both prodrugs have been shown to incorporate completely into unilamellar liposomes with the mean size below 100 nm and form stable dispersions containing the drug concentrations relevant for systemic injections in animals. For long-term storage, the dispersions can be subjected to deep freezing in liq. nitrogen and stored at below -20°C; before usage, they should be defrosted and treated shortly in an ultrasonic bath to break aggregates.

To increase selectivity, Mlph-DG/MTX-DG-loaded liposomes bearing carbohydrate ligands specific for tumor cells have been designed. Therapeutic efficacy of targeted liposome formulations has been shown *in vivo* on murine models

of breast cancer and lymphatic leukemia. The most pronounced antitumor effect caused liposomes equipped with selectin ligand tetrasaccharide Sialyl LewisX. Selectins, carbohydrate binding adhesion proteins, which mediate the initial interactions between circulating leukocytes and cells of the endothelium, are involved in multiple (patho)physiological processes including inflammatory responses, metastasis development etc.

Pharmacokinetic studies of intravenous liposomal MTX-DG against MTX in mice have testified to the superior therapeutic potential of liposomes for the treatment of malignant lymphoma and leukemia.

The work was supported by Russian Foundation for Basic Research (Projects 97-04-48421, 00-04-48922, 03-04-48396, 06-04-49432) and ISTC (Project 1783).

## METHYL CpG AND DIFFERENTIATION

Vinson Ch.

National Cancer Institute at Bethesda, Maryland, USA

E-mail: [Vinsonc@dc37a.nci.nih.gov](mailto:Vinsonc@dc37a.nci.nih.gov)

My talk will focus on the B-ZIP transcription factor domain, a dimeric complex with each monomer being a long bipartite  $\alpha$ -helix. There will be two parts to the talk, both done by postdoctoral fellows from Moscow. One part will address the structural rules that regulate the dimerization of the long bipartite  $\alpha$ -helix into a coiled coil leucine zipper done by Dmitry Krylov. The second part will address how the methylation of the cytosine in the CpG dinucleotide alters DNA binding specificity of B-ZIP proteins done by Julian Rozenberg.

The C-terminal half of the B-ZIP domain is an amphipathic  $\alpha$ -helix – one side is hydrophilic and likes to be in water and the second side is hydrophobic and likes to interact with the hydrophobic surface of a second amphipathic helix to create a dimeric coiled coil renamed the leucine zipper. We have determined the structural rules that regulate leucine zipper dimerization specificity and they will be described.

The second part of the talk will address methylation of the cytosine in the CpG dinucleotide and its affect on B-ZIP protein binding to DNA and subsequent affects on gene expression. Typically, CpG methylated is associated with gene inactivation because it both recruits repressor proteins and inhibits the DNA binding of activating transcription factors. However, recent data indicate that some methylated promoters are transcriptionally active. We have been differentiating mouse primary epithelial keratinocytes and observe that promoters that contain CpG methylation preferentially become activated. To determine if the CpG methylation is critical for the activation of tissue specific genes, we evaluated if there is an activity in nuclear extracts that preferentially bound DNA when the CpG is methylated. We focused of the CRE binding site (TGACGTCA) because many B-ZIP proteins bind it. When the central CpG dinucleotide is methylated, it is bound by C/EBP family members, proteins implicated in differentiation. The talk will conclude with data suggesting that CpG methylation creates a transcription factor binding site (TFBS) critical for recruiting C/EBP family members to tissue specific promoters and activating them. These data identify a new function of the methylated CpG dinucleotide.

## ГЕННЫЕ СЕМЕЙСТВА *POLR2J* И *PMS2* КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ЭВОЛЮЦИИ ВЫСШИХ ПРИМАТОВ

Шематорова Е.К., Шпаковский Д.Г., Прошкин С.А., Прошкина Г.М., Шпаковский Г.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: [gvs@ibch.ru](mailto:gvs@ibch.ru)

Одной из важнейших проблем биологии является происхождение и эволюция человека как живого существа. Начало научному осмыслению этого вопроса было положено в 1871 г. Ч. Дарвином в рамках симиальной гипотезы происхождения человека от высокоразвитых обезьян третичного периода [1]. Достижения молекулярной биологии последних лет хотя и перевели исследования родословной человека на геномный уровень, тем не менее всё ещё не смогли дать объяснение основному парадоксу возникновения рода *Homo*: практически "неограниченный" (по Дж. Хаксли) прогресс в направлении разумного существа при весьма ограниченных, если не сказать минимальных изменениях наследственного материала (*парадокс Н*). Вместе с тем, несомненным достижением наступившей постгеномной эры стало осознание того, что одним из важнейших молекулярных механизмов прогрессивной эволюции сложных геномов являются сегментные дубликации, способствующие возникновению новых генных семейств. С точки зрения антропогенеза наибольший интерес представляют относительно недавние, специфичные для высших приматов, дубликации [2].

Мы изучили молекулярную эволюцию двух таких "молодых" генных семейств: генов *POLR2J* системы транскрипции и *PMS2* системы репарации MMR. Выяснилось, что появление и совершенствование генной структуры обоих этих генных семейств чётко коррелируются с основными этапами биологической эволюции высших приматов. Именно в течение первого из них, начавшегося около 20 *Mya* (миллионов лет назад) и приведшего к отделению линии гоминид от эволюционной ветви маргышек Старого Света (*OWM*), произошло умножение, дробление и начало диверсификации *PMS2*-подобных генов, обеспечивших в конечном итоге (по-видимому, только у представителей рода *Homo*) возможность разделения некоторых из *PMS2*-опосредованных функций между тремя разными компонентами, способными к формированию аналогов *PMS2*-подобных белков *de novo* по модульному (блочному) принципу из небольших *PMS2L*-полипептидов [3].

Второй этап (с важными общими стадиями, произошедшими 12 и 8 *Mya* и специфичными для эволюционной линии, приведшей к роду *Homo*, событиями давностью ~5.7 и 2 *Mya*) характеризовался возникновением и эволюционным развитием семейства генов *POLR2J* системы регуляции транскрипции [4]. Он начался у общего предка гориллы, шимпанзе и человека и, вероятно, сыграл важную роль в дивергенции систем регуляции генной экспрессии у этих видов: с помощью дрожжевой двухгибридной системы и биохимических подходов нами обнаружены уникальные взаимодействия новых изоформ субъединицы hRPB11 с рядом специфических факторов

транскрипции и некоторыми компонентами важнейших сигнальных путей эукариотической клетки [5].

Работа выполнена при поддержке Программы РАН "Молекулярная и клеточная биология" (направление "Функциональная геномика") и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 07-04-01167).

#### Литература

- [1] Darwin C.R. "The descent of man, and selection in relation to sex" // London: John Murray – 1871 (Volumes 1 & 2; 1st edition).
- [2] Marques-Bonet T., Kidd J.M., Ventura M., Graves T.A., Cheng Z. et al. *Nature*. 2009, **457**, 877-881.
- [3] Шпаковский Д.Г., Шематорова Е.К., Шпаковский Г.В. *Доклады Академии наук*. 2006, **408**, 699-703.
- [4] Шпаковский Д.Г., Шематорова Е.К., Шпаковский Г.В. *Биоорганическая химия*. 2004, **30**, 621-625.
- [5] Прошкин С.А., Шпаковский Г.В. *Цитология*. 2005, **47**, 828-829.

## **POLR2J AND PMS2 GENE FAMILIES AS MOLECULAR MARKERS OF HIGHER PRIMATES EVOLUTION**

***Shematorova E.K., Shpakovski D.G., Proshkin S.A., Proshkina G.M., Shpakovski G.V.***

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: gvs@ibch.ru

One of the most important problems in biology is the origin of human species. By formulating in 1871 the so-called 'simian' hypothesis [1], Charles Darwin was the first who put the problem into the scientific prospective. Right now, African origin of both humans and modern great apes is well supported by both anthropological and DNA sequencing data, but the extent of the phenotypic change between human and Anthropoid primates is dissonant with the rate of molecular change (*paradox H*). Probably, the most important contribution to the problem of the post-genomic era researches was clear demonstration that segmental duplications have been major driving forces in shaping the complex eukaryotic genomes including this of *Homo sapiens* [2].

We have performed phylogenetic analysis of *POLR2J* and *PMS2*-like cDNA and genomic sequences in the primate lineage and have shown that their molecular evolution correlates well with the route of evolution of the ape lineage leading to hominids. First, our results indicate that amplification of the *PMS2*-related genes is characteristic only for higher primates and was originated as duplication of the *PMS2CL* region (exons 9-15) approximately 20 Mya [million years ago] in lineage leading to modern Lesser (gibbon) and Great Ape species after its separation from branch of Old World Monkeys. The evolution follows by multiple rounds of amplification of the region *PMS2NL* (exons 1-5) in orangutan (only one *PMS2NL* gene subgroup presents), gorilla and chimpanzee (appearance of the second *PMS2NL* subgroup with only two different members). *Homo sapiens* represents an extreme case of amplification of the second *PMS2NL* gene subgroup with eight for the most part clusterly arranged new *PMS2*-like gene members. Our data suggest that a novel tripartite polypeptide system of *PMS2*-like proteins, which could replace the original *PMS2* protein in some of its novel or substantially diverged functions, have been established at least in *Homo sapiens* – with possible impact on such vitally important genetic processes as gene conversion, somatic hypermutation and/or class switch recombination [3].

We also have showed that *POLR2J* gene, encoding absolutely essential component of the transcription machinery of the eukaryotic cell, i.e. Rpb11 subunit of RNA polymerase II, undergone three rounds of duplication events started in the African hominoid ancestor approximately 12 Mya [4]. Subsequent evolution of the *POLR2J* gene family occurred for the most part independently in each modern African apes species and resulted, at least in humans, in production of plural novel isoforms of Rpb11 subunit with new properties or possibly even with diversified functions: specific interactions were found for all these isoforms with other human proteome components with use of yeast two-hybrid system and different biochemical approaches [5].

The work was supported by the program "Molecular and Cell Biology" (direction "Functional Genomics") of the Russian Academy of Sciences and by the Russian Foundation for Basic Research (project No. 07-04-01167).

*References*

- [1] Darwin C.R. "The descent of man, and selection in relation to sex" // London: John Murray – 1871 (Volumes 1 & 2; 1st edition).
- [2] Marques-Bonet T., Kidd J.M., Ventura M., Graves T.A., Cheng Z. et al. *Nature*. 2009, **457**, 877-881.
- [3] Shpakovski D.G., Shematorova E.K., Shpakovski G.V. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2006, **408**, 175-179.
- [4] Shpakovski D.G., Shematorova E.K., Shpakovski G.V. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2004, **30**, 561-565.
- [5] Proshkin S.A., Shpakovski G.V. *Cytology*. 2005, **47**, 828-829.

## **RNA POLYMERASES IN PARASITIC PROTOZOAN**

### ***Vigneron M.***

Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Strasbourg FRE3211  
CNRS UDS 1, Bld Sebastien Brandt PB 10413, 67412 Illkirch Cedex, France  
E-mail: marc.vigneron@esbs.u-strasbg.fr

Among parasites, unicellular protozoan remain an important issue world wide. Although the RNA polymerases of some parasitic protozoan have been characterized with some details, this remains to be done for many others including apicomplexa such as *Plasmodium falciparum*. We propose an overview of the situation for major diseases.

The eucaryotic RNA polymerase II is in charge of the transcription of the vast majority of the nuclear genome. It happens to be the natural target of the alpha-amanitin toxin in most eucaryotes with the exception of some fungi. Its inhibition leads to the degradation of the complex and cell death. This observation is of interest in therapeutic views. For example, the specific targeting of the RNA polymerase II of parasitic cells may represent an innovative strategy.

## A PROTEOMIC VIEW OF VIRAL INFECTION AND TUMOR PROGRESSION: THE RIBOSOME, A KEY PLAYER?

**Belin S.<sup>1</sup>, Rosa-Calatrava M.<sup>2</sup>, Coute Y.<sup>3</sup>, Couderc C.<sup>4</sup>, Hacot S.<sup>1</sup>, Pourpe S.<sup>1</sup>, Magron A.<sup>1</sup>, Borson-Chazot F.<sup>5</sup>, E. Frobert<sup>2</sup>, Josset L.<sup>2</sup>, Cartet G.<sup>2</sup>, Albaret M.A.<sup>1</sup>, Roche C.<sup>4</sup>, Scaozec J.-Y.<sup>4</sup>, Sanchez J.-C.<sup>3</sup>, Diaz J.-J.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universite de Lyon, Universite Lyon 1, CNRS, UMR 5534, Centre de Genetique Moleculaire et Cellulaire, Villeurbanne France

<sup>2</sup>FRE 3011 CNRS-UCBL, Lyon, France

<sup>3</sup>Biomedical Proteomics Research Group, Departement de Biologie Structurale et Bioinformatique, Centre Medical Universitaire, Geneva Switzerland

<sup>4</sup>INSERM, U865, IFR Lyon-Est, Universite de Lyon, Universite Lyon 1, Lyon France

<sup>5</sup>INSERM, U664, IFR Lyon-Est, Universite de Lyon, Universite Lyon 1, Lyon France

E-mail: diazjj@lyon.fnclcc.fr

A great number of data suggest that ribosome biogenesis is altered during viral infection and tumorigenesis and that these alterations play a crucial role in the outcome of these pathologies (Derenzini, 2000; Hiscox, 2007; Pich et al., 2000).

The results obtained in our team during these past years are in favor of this hypothesis (Coute et al., 2006; Coute et al., 2007; Diaz et al., 1996; Diaz et al., 2002; Simonin et al., 1995a; Simonin et al., 1995b; Simonin et al., 1997).

Indeed, we have shown that infection of human cells with either herpes simplex virus or influenza viruses induces a redistribution of several nucleolar proteins which seems to be essential for viral replication (Calle et al., 2008). We have also shown that these viruses induce important modifications of ribosomal RNA maturation that probably allow them to escape cellular anti-viral defense.

Finally we have shown that ribosome biogenesis is extremely modified during the tumorigenesis process leading to a dramatic alteration of the ribosome translational abilities.

At present our objectives are to elucidate the molecular mechanisms underlying these structural and functional modifications.

Our results bring evidence that ribosome themselves could play a central role in the translational regulation that take place during viral infection and tumorigenesis.

### References

- Calle, A., Ugrinova, I., Epstein, A.L., Bouvet, P., Diaz, J.J., and Greco, A. (2008). Nucleolin is required for an efficient herpes simplex virus type 1 infection. *J. Virol.* **82**, 4762-4773.
- Coute, Y., Burgess, J.A., Diaz, J.J., Chichester, C., Lisacek, F., Greco, A., and Sanchez, J.C. (2006). Deciphering the human nucleolar proteome. *Mass Spectrom. Rev.* **25**, 215-234.
- Coute, Y., Kindbeiter, K., Belin, S., Dieckmann, R., Duret, L., Bezin, L., Sanchez, J.C.,

Derenzini, M. (2000). The AgNORs. *Micron.* **31**, 117-120.

Diaz, J.J., Dodon, M.D., Schaerer-Uthurralt, N., Simonin, D., Kindbeiter, K., Gazzolo, L., and Madjar, J.J. (1996). Post-transcriptional transactivation of human retroviral envelope glycoprotein expression by herpes simplex virus Us11 protein. *Nature.* **379**, 273-277.

Diaz, J.J., Giraud, S., and Greco, A. (2002). Alteration of ribosomal protein maps in herpes simplex virus type 1 infection. *J. Chromatogr B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **771**, 237-249.

Hiscox, J.A. (2007). RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 119-127.

Pich, A., Chiusa, L., and Margaria, E. (2000). Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron.* **31**, 133-141.

Simonin, D., Diaz, J.J., Kindbeiter, K., Denoroy, L., and Madjar, J.J. (1995a). Phosphorylation of ribosomal protein L30 after herpes simplex virus type 1 infection. *Electrophoresis.* **16**, 854-859.

Simonin, D., Diaz, J.J., Kindbeiter, K., Pernas, P., and Madjar, J.J. (1995b). Phosphorylation of herpes simplex virus type 1 Us11 protein is independent of viral genome expression. *Electrophoresis.* **16**, 1317-1322.

Simonin, D., Diaz, J.J., Masse, T., and Madjar, J.J. (1997). Persistence of ribosomal protein synthesis after infection of HeLa cells by herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* **78** (Pt. 2), 435-443.



## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ПРОТЕОМИКА МИКОПЛАЗМ

Говорун В.М.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Курчатовский институт, Москва, Россия  
E-mail: govorun@nanorf.ru

Молликуты (микоплазмы) представляют собой класс микроорганизмов, лишённых клеточной стенки, отличающихся малым размером генома и низким GC-составом. Микоплазмы, предположительно, произошли от грамположительных бактерий в результате редуکتивной эволюции вследствие паразитического образа жизни.

На сегодняшний день для микоплазм известно наибольшее количество аннотированных геномов, поэтому они являются удобными объектами для сравнительных исследований.

Микоплазмы обладают одними из самых маленьких известных на сегодняшний день геномов. Размер геномов микоплазм варьирует от 0,5 до 1,5 млн.п.о. Один из представителей микоплазм – *Mycoplasma genitalium* – является автономно реплицирующимся организмом с наименьшим известным на сегодняшний день размером генома – 580 т.п.о., содержащего 524 гена. Вследствие небольшого размера генома микоплазмы обладают лимитированным набором белков и метаболических функций и зависимы от метаболизма хозяина или содержания необходимых веществ в среде. Таким образом, микоплазмы наиболее близки к концепции "минимальной клетки", т.е. клетки, обладающей минимально возможным набором белков и способной самостоятельно делиться на богатой среде.

Геномно-протеомное профилирование позволяет понять, каков набор функций из имеющихся необходим клетке для её функционирования, а также уточнить аннотацию генома. Кроме того, знание протеома клетки даст возможность провести её метаболическую реконструкцию. Сравнительная протеомика позволяет выяснить, какой набор белков должен постоянно присутствовать в клетке и отвечает за её основные функции, а какие белки связаны с приспособлением отдельных видов микоплазм к своей среде обитания.

В нашей лаборатории сделаны протеомы *M. gallisepticum* и *Acholeplasma laidlawii*. Обнаружено что *M. gallisepticum* и *Ach. laidlawii* экспрессируют 55% и 58% белков, закодированных в геноме, соответственно. В настоящее время также известен протеом *M. mobile*, для которого показана экспрессия 88% закодированных белков.

*M. gallisepticum* и *Ach. laidlawii* и *M. mobile* – родственные организмы, однако их геномы значительно варьируют. Геном *Ach. laidlawii* составляет 1497 т.п.о., *M. gallisepticum* – 996 т.п.о., *M. mobile* – 777 т.п.о. В этом ряду количество известных регуляторных белков значительно уменьшается от нескольких десятков у *Ach. laidlawii* до нескольких штук у двух последних. Тем не менее, в стрессовых условиях, таких как, например, тепловой шок, у микоплазм, практически не имеющих известных механизмов регуляции, тем не менее, меняется профиль экспрессии белков, что, по-видимому, свидетельствует о наличии некоей регуляции.

Сравнение протеом трёх вышеуказанных микоплазм позволило выявить общий белковый кор, состоящий из 200 белков и отвечающий за такие функции клетки, как репликация, транскрипция, трансляция и синтез АТФ. Также в кор вошли 4 консервативных белка, функции которых неизвестны.

Интересно, что *M. gallisepticum* и *Ach. laidlawii* способны расти на абсолютно одинаковой богатой среде, но при этом *Ach. laidlawii* экспрессирует более 250 дополнительных белков, большая часть из которых выполняет метаболические функции.

Кроме того, было обнаружено, что микоплазмы экспрессируют около ста уникальных для каждого вида белков, которые не имеют ортологов в других организмах. Их функции остаются непонятными. По-видимому, эти белки могут расширять адаптогенный потенциал клетки без существенных перестроек в её пуле коровых белков.

## COMPARATIVE PROTEOMICS OF MYCOPLASMS

Govorun V.M.

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, RRC  
Kurchatov Institute, Moscow, Russia  
E-mail: [govorun@nanorf.ru](mailto:govorun@nanorf.ru)

Mollicutes (Mycoplasmas) clade consists of bacteria without a cell wall, possessing very small genomes with a low GC content. It is supposed that mycoplasmas originate from gram-positive bacteria which were a subject of reductive evolution during an adaptation to a parasitic lifestyle.

Mycoplasmas are a clade with the largest number of sequenced and annotated genomes to date. That is why they are a very convenient object of comparative studies.

Mycoplasmas are the organisms with the smallest genomes known up to date. Their genome sizes vary from 0,5 to 1,5 millions of base pairs. *Mycoplasma genitalium* is an autonomously replicating organism with the smallest known genome which consists of 580 thousands of base pairs comprising 524 genes. Mycoplasmas have very limited number of proteins and metabolic functions as a consequence of their small genome size. Thus they are hugely dependent on their host metabolism or media nutrition content. Thereby mycoplasmas closely resemble the "minimal cell" concept, meaning a cell that is capable of a self-replication on a rich medium having the less possible proteins.

Proteo-genomic profiling allows us to elucidate functions required for a cell to live and also helps to improve genome annotation. In addition it allows to carry out metabolic reconstruction of the cell. Comparative proteomics helps to find out a core protein content of the cell which is responsible for basic cellular processes and which proteins are involved in adaptation of a given Mycoplasma species to its environment.

Our laboratory has studied proteomes of *M. gallisepticum* and *Acholeplasma laidlawii*. We found out that *M. gallisepticum* and *Ach. laidlawii* express 55% and 58% of encoded proteins respectively. *M. mobile* which proteome is known up to date expresses 88% of encoded proteins.

*M. gallisepticum*, *Ach. laidlawii* and *M. mobile* are relative species but their genome size varies dramatically. Genome of *Ach. laidlawii* consists of 1497 thousands b.p., *M. gallisepticum* – 996 thousands b.p., *M. mobile* – 777 thousands b.p. In this series *Ach. laidlawii* possesses tens of regulatory proteins, whereas other two have only few. Nevertheless all mycoplasmas show significant changes in protein expression pattern under the stress conditions like a heat shock. This might be an evident that they are capable of some unknown ways of expression regulation.

Comparative studies of the three species revealed a constant protein core consisting of 200 proteins responsible for replication, transcription, translation and ATP production. Also core included 4 conserved proteins of unknown function.

Strikingly, *M. gallisepticum* and *Ach. laidlawii* are capable of growth on the same medium but *Ach. laidlawii* expresses 250 proteins more than *M. gallisepticum*. Most of these proteins carry out metabolic functions.

It was also found that mycoplasmas express about a hundred of unique proteins with unknown function which do not have any orthologs in other species. One can speculate that these proteins take part in adaptation, improving cell plasticity while evading significant changes in housekeeping protein core.

## HELICAL ANTIMICROBIAL AND HOST DEFENCE PEPTIDES – LESSONS FROM DESIGN AND EVOLUTION

Tossi A.

Department of Life Sciences, University of Trieste, Italy  
E-mail: [atossi@units.it](mailto:atossi@units.it)

Amphipathic helical peptides are amongst the most abundant natural AMPs, and their structure activity relationships have been extensively studied, also with the aim of obtaining novel anti-infective agents. We have applied both rational design approaches to determine SAR in artificial synthetic peptides, and analysed the effects of evolutionary variations in orthologous primate peptides, so as to gain a better understanding of the mode-of-action. This depends on the subtle interplay of numerous features, such as structuring propensity, cationicity, amphipathicity, hydrophobicity, structural characteristics of the polar and hydrophobic sectors, and the tendency of peptides to oligomerise. We have used a "sequence template" derived from the conserved features of numerous evolutionarily diverse helical peptides to design and synthesise self-contained sets of AMPs in which these features are systematically and independently varied, so as to correlate them with the potency and selectivity of antimicrobial action (1). The observed trends helped to explain the differential behaviour of the human cathelicidin LL-37 and its orthologues from several non-human primates (2), and to better understand the different stages of their trajectory from bulk solution, through the outer cell-wall layers, to and into the membrane (3). In particular, for some orthologues, a strong helix-forming propensity and consequent tendency to aggregate in bulk solution strongly influences both the antimicrobial capacity and effects on host cells, by affecting the manner in which they interact with both biological membranes and medium components (4).

### References

- 1 I. Zelezetsky, A. Pontillo, L. Puzzi, N. Antcheva, L. Segat, S. Pacor, S. Crovella, A. Tossi. (2006) Evolution of the primate cathelicidin. Correlation between structural variations and antimicrobial activity. *J. Biol. Chem.* **281**(29):19861-71.
- 2 I. Zelezetsky, A. Tossi (2006) Alpha-helical antimicrobial peptides-Using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. *Biochim. Biophys. Acta.* **1758**(9):1436-49.
- 3 F. Morgera, L. Vaccari, N. Antcheva, D. Scaini, S. Pacor, A. Tossi (2009) Primate cathelicidin orthologues display different structures and membrane interactions. *Biochem. J.*, **417**:727-735.
- 4 L. Tomasinsig, F. Morgera, N. Antcheva, S. Pacor, B. Skerlavaj, M. Zanetti and A. Tossi (2009) Structure dependence of biological activities for primate cathelicidins. *J. Pep. Sci.*, (in press).

## ИСТОРИЯ ГМДП: ОТ ИДЕЙ И.И. МЕЧНИКОВА ДО ЛИГАНДА РЕЦЕПТОРА NOD2

Андропова Т.М.<sup>1</sup>, Козлов И.Г.<sup>2,3</sup>, Несмеянов В.А.<sup>1</sup>, Иванов В.Т.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Российский государственный медицинский университет, Москва, Россия

<sup>3</sup>ФНКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва, Россия  
E-mail: ivavt@ibch.ru

Существенный прогресс, достигнутый в последнее пятилетие при исследовании молекулярных механизмов функционирования врожденного иммунитета, в целом, и понимание его роли в противоопухолевом иммунитете, в частности, создали новую теоретическую основу для расширения применения N-ацетилглюкозаминил-N-ацетил-мурамил-L-аланил-D-изоглутамина (ГМДП) в медицине в качестве иммуномодулятора.

В 1960-х годах болгарский ученый И. Богданов, основываясь на идеях И.И. Мечникова о важной роли молочнокислых продуктов в профилактике рака, получил из *Lactobacillus bulgaricus* смесь гликопептидов, названную бластолизином. Изучение противоопухолевой активности бластолизина, выделение и определение химической структуры его действующего начала привели к идентификации и синтезу обширной серии производных минимальной структурной единицы пептидогликана клеточной стенки бактерий – мурамилдипептидов (МДП). Среди многих МДП, испытываемых в качестве лекарственных препаратов, оптимальным оказался ГМДП, совмещающий в себе высокую биологическую активность и хороший профиль безопасности. Подобные характеристики обеспечили успешное применение ГМДП в клинической практике.

Однако на протяжении десятилетий многочисленные исследования не давали ответа на вопрос о молекулярных механизмах действия ГМДП. Переломным моментом стало описание рецепторов врожденного иммунитета (TLR и NOD) и их доминирующей роли во врожденном и адаптивном иммунном ответах. Эти рецепторы, являясь первым специфическим барьером на пути патогенов, запускают через транскрипционный фактор NFκB цитокиновый каскад, который, в свою очередь, активирует все звенья иммунитета и настраивает его на быструю элиминацию микроорганизма. Было показано, что ГМДП, имитирующий стандартное структурное звено клеточной стенки бактерий, специфически активирует внутриклеточный NOD2 рецептор иммунокомпетентных клеток, в частности макрофагов и дендритных клеток.

Этот вывод позволил систематизировать ранее полученные экспериментальные данные, касающиеся механизмов иммуномодулирующего эффекта ГМДП, и открыть новые перспективы его использования в клинике. Например, особенности цитокинового каскада, индуцируемого через Toll-подобные и NOD рецепторы, позволяют рассматривать их потенциальные лиганды в качестве поляризующих агентов, направленных на нормализацию Т-хелперного дисбаланса (Th1/Th2),

который является важнейшим патогенетическим звеном иммуоагрессий (атопии, аутоиммунные заболевания, псориаз). Последние исследования, проведенные независимо в нашей лаборатории и на кафедре иммунологии Кубанского медицинского университета, показали, что ГМДП резко снижает продукцию ИЛ-4 и усиливает в 3-8 раз секрецию ИФН-γ мононуклеарными клетками больных atopической бронхиальной астмой и atopическим дерматитом. *In vivo* данный эффект сопровождался достоверным снижением сывороточных уровней IgE. Полученные результаты объясняют ранее продемонстрированную в клинических исследованиях эффективность ГМДП при лечении atopических заболеваний и позволяют рассматривать данный препарат как новое патогенетическое лекарственное средство для их терапии.

Знание молекулярного механизма действия дало возможность систематизировать данные разрозненных экспериментальных и клинических исследований по противоопухолевым эффектам ГМДП. Антинеопластическая активность ГМДП обеспечивается, прежде всего, за счет ускорения созревания и усиления функций дендритных клеток, а также за счет поляризации иммунного ответа в сторону Th1 с продукцией противоопухолевых цитокинов и формированием активированных цитотоксических клеток. Кроме описанных выше противоопухолевых эффектов ГМДП, опосредованных активацией врожденного иммунитета, недавно открыто его прямое действие на опухолевые клетки, а именно:

- усиление экспрессии на трансформированных клетках опухолеспецифических антигенов, способствующее облегчению распознавания опухоли иммунной системой;

- повышение чувствительности опухолевых клеток к действию цитостатиков, что может быть в основе преодоления множественной лекарственной устойчивости.

Молекулярные механизмы этих эффектов ГМДП являются предметом наших исследований.

## GMDP STORY: FROM MECHNIKOV'S IDEAS TO NOD2 RECEPTOR LIGAND

*Andronova T.M.*<sup>1</sup>, *Kozlov I.G.*<sup>2,3</sup>, *Nesmeyanov V.A.*<sup>1</sup>, *Ivanov V.T.*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Russian State Medical University, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Federal Research and Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia

E-mail: ivavt@ibch.ru

Significant progress achieved for the last five years in investigation of molecular mechanisms of innate immunity in general, and understanding of its role in anti-tumor immunity in particular, formed new theoretical basis for application of N-acetyl-glucosaminyl-N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (GMDP) as an immunomodulatory drug.

In 1960s a Bulgarian scientist I. Bogdanov, basing on I. Mechnikov's ideas about the important role of fermented milk products in preventing cancer, obtained from *Lactobacillus bulgaricus* a mixture of glycopeptides called blastolysin. The study of anti-tumor activity of this agent, determination and elucidation of chemical structure of its effective components led to identification and synthesis of a series of glycopeptides, derivatives of muramyl dipeptide (MDP) – the minimal structural unit of bacterial cell wall peptidoglycan. Among the considerable diversity of MDP derived medicinal products, GMDP occupies a prominent position due to the optimal balance of high bioactivity and good safety profile. These characteristics ensured the successful use of GMDP in clinical practice.

However, for some decades numerous investigations failed to produce any significant information on the molecular mechanisms of GMDP action. The detailed description of innate immunity receptors (TLR and NOD) and of their key role in regulation of innate and adaptive immune response has marked the turning point. These receptors, being the first specific barrier on the way of microorganisms of any type, trigger through activation of the NFκ-B transcription factor the cytokine cascade, which in turn activates all components of the immune system and tunes it for efficient elimination of the pathogen. GMDP, acting as a standard structural unit of a bacterial cell wall was shown to specifically activate the NOD2 intracellular receptors of several immunocompetent cells, in particular macrophages and dendritic cells.

This conclusion allowed to systematize the earlier obtained experimental data related to the mechanisms of immunomodulatory effect of GMDP and to open new perspectives for its clinical use. For example, the features of cytokine cascade induced by the activity of Toll-like and NOD-receptors, allow to consider their potential ligands as polarizing agents focused on normalization of the T-helper imbalance (Th1/Th2), which is the most important pathogenic component of immune aggressions (atopy, autoimmune diseases, psoriasis). The recent studies independently performed in our laboratory and in the Department of immunology of the Kuban Medical University have demonstrated that GMDP suppresses the production of IL-4 and stimulates 3-8 fold secretion of IFN-γ by mononuclear

cells in patients with atopic bronchial asthma and atopic dermatitis. *In vivo* this effect was accompanied by significant decrease of serum IgE levels. The results obtained explain the origin of GMDP efficacy in treatment of atopic diseases, which was earlier demonstrated in clinical trials, and allow to consider this medicine as a new pathogenetic drug for their therapy.

The knowledge of molecular mechanisms provided new grounds for treating the anti-tumor effects of GMDP. Antineoplastic activity of GMDP is provided primarily by the accelerated maturation and potentiation of dendritic cells, and also by polarization of immune response toward Th1 followed by production of anti-tumor cytokines and formation of pool of activated cytotoxic cells. Besides the aforesaid anti-tumor effects of GMDP mediated by activation of the innate immunity, it was recently discovered that GMDP directly affects the tumor cells by:

- enhancement of expression of tumor-specific antigens on transformed cells, making the tumor more easily recognizable by the immune system;
- increase of sensitivity of tumor cells to the action of cytostatic drugs, that may provide the basis for overcoming the multiple drug resistance.

Molecular mechanisms of these effects of GMDP are the subject of current studies.



## "СИРОТСКАЯ" РЕЦЕПТОРНАЯ ТИРОЗИНКИНАЗА – СЕНСОР ЩЕЛОЧНОЙ СРЕДЫ

Petrenko A.G.

Институт биоорганической химии м. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: petrenkoag@gmail.com

Поддержание кислотно-щелочного равновесия является характерным и неотъемлемым свойством высших организмов. Изменение кислотности крови может происходить как вследствие нормальных физиологических факторов (питание, физическая и эмоциональная нагрузка), так и в результате разнообразных патологий, в первую очередь сердечно-сосудистой системы, легких и почек. Однако, правильный клеточный и системный ответ на изменение кислотно-щелочного равновесия приводит к компенсации отклонений pH, его же отсутствие или нарушения могут привести к катастрофическим последствиям, ведущим к гибели организма. В настоящее время достаточно подробно изучены физиологические механизмы поддержания pH крови и межклеточной жидкости в узком диапазоне около pH 7,4 за счет регуляции дыхания и секреции избыточной кислоты либо щелочи. Данные функции выполняют специализированные клетки, в первую очередь за счет трансмембранного транспорта протонов и бикарбоната, а также расщепления угольной кислоты с последующим удалением углекислого газа. Ключевыми компонентами регуляции этих процессов являются pH-зависимые рецепторы поверхности клетки, осуществляющие функцию сенсоров ацидоза или алкалоза.

Нами впервые был найден метаботропный рецептор, активирующийся под воздействием щелочной среды. Им оказалась ранее считавшаяся "сиротской" рецепторная тирозинкиназа, член минисемейства инсулинового рецептора, получившая название инсулиновый рецептор-подобный рецептор (ИРР). Нами было установлено, что близкие гомологи ИРР – рецепторы инсулина (ИР) и инсулиноподобного ростового фактора (ИРФР) – не реагируют на изменение pH. В то же время, ИРР абсолютно нечувствителен к инсулину и инсулиноподобному ростовому фактору. Более того, поиски белковых агонистов ИРР путем анализа полного генома человека не увенчались успехом. Вследствие этого, нами было предложено, что естественным лигандом и активатором ИРР является гидроксил-анион, а ИРР исполняет функцию щелочного сенсора. В подтверждение данной гипотезы мы установили, что pH чувствительность ИРР определяется структурными особенностями его внеклеточной части. В результате анализа сигнального пути, активируемого ИРР после обработки щелочной средой, было выявлено рецептор-зависимое фосфорилирование компонентов сигнального пути инсулинового рецептора. Также было установлено, что в ИРР-содержащих клетках при повышении pH среды происходят транслокация транспортеров глюкозы на цитоплазматическую мембрану, а также перестройки цитоскелета. ИРР активируется при pH выше 8,0, а полужффект достигается при pH 8,4. Поскольку ИРР специфично локализован в органах, контактирующих со средами, pH которых выходит за рамки гомеостаза (почки, поджелудочная железа, желудок), мы предполагаем, что ИРР является сенсором избыточного защелачивания внеклеточных жидкостей, и его активация приводит к стимуляции метаболизма клеток, осуществляющих секрецию щелочи.

## "ORPHAN" RECEPTOR-LIKE TYROSINE KINASE AS AN ALKALI SENSOR

Petrenko A.G.

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia  
E-mail: petrenkoag@gmail.com

The acid-base balance is an important intrinsic property of higher species. pH of the blood may vary under influence of normal physiological factors such as food consumption, physical or emotional stress, as well as in certain pathologies, especially those related to the heart, lungs, kidneys and blood vessels. However, a proper cellular and systemic response to shifts in the acid-base balance typically compensates such pH changes, while the deficit of such response or its incorrectness may lead to dramatic consequences eventually resulting in mortality. The well-studied physiological mechanisms, that keep the pH of blood and interstitial fluid at around 7.4, are based on the regulation of secretion of carbon dioxide in the lungs and of acid or base secretion and excretion by the kidneys and other organs. These functions are usually performed by specialized cells, primarily by transmembrane transport of protons and bicarbonate ions in a combination with decomposition of carbonic acid and removal of the resulting carbon dioxide. pH-Sensing cell surface receptors are expectedly key molecular components to regulate these processes.

We have identified a metabotropic receptor that can be activated by alkaline media. It appears to be a receptor-like tyrosine kinase, previously considered "orphan". This receptor is a member of the insulin receptor subfamily and was originally named the insulin receptor-related receptor (IRR). We showed that the close homologs of IRR, the insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) do not respond to pH changes. At the same time, IR shows no response to either insulin or insulin-like growth factor. Moreover, the search for protein agonists of IRR by the analysis of the human genome was of no success. We therefore postulated that the only natural ligand and agonist of IRR is hydroxylion while the primary physiological role of this receptor is being an alkali sensor. In support of this hypothesis, we have demonstrated that the pH sensitivity of IRR is defined by specific structural features of its ectodomain. The analysis of cellular responses to IRR activation by alkaline media revealed robust receptor-dependent phosphorylation of protein components of the insulin receptor signaling pathway. We also showed translocation of glucose transporters to the cytoplasmic membrane and also cytoskeleton rearrangements in the cells that exogenously express IRR. IRR activation becomes noticeable at pH 8.0 with the half-effect at about pH 8.4. Since IRR is localized in specific subsets of cells in the organs that contact with corporal fluids of extreme pH, such as the kidneys, pancreas and stomach, we propose that IRR works as a sensor of excessive alkalinization of the bodily fluids, and that the receptor activation results in the stimulation of metabolism in alkali-secreting cells.



## АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ БЕЛКА В СОВРЕМЕННЫХ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Чертов О.Ю.

Advanced Technology Program, Protein Chemistry Laboratory,  
SAIC-Frederick, NCI-Frederick, Frederick, MD 21702, USA  
E-mail: oleg@ncifcrf.gov

В 70-90 гг. XX века определение N-концевой последовательности белков и пептидов, основанное на методе Эдмана, было самым важным методом в анализе белков. Этот метод позволял определять последовательность белков, выделенных в чистом виде.

Появление практически полных баз данных белковых последовательностей для большинства организмов и достижения масс-спектрометрии изменили положение и роль классической белковой химии. В настоящее время возможна идентификация большого числа белков в сложных смесях с помощью масс-спектрометрии. Идентификация белков осуществляется в результате определения пептидов, полученных после расщепления белков в растворе или в полиакриламидном геле. Определение N-концевой последовательности белков с молекулярной массой более 10 кДа с помощью масс-спектрометрии является непростой задачей. Для сравнения возможностей автоматического N-концевого секвенирования (по Эдману) и масс-спектрометрических методов Ассоциация биохимических лабораторий (ABRF) в 2009 г предложила заинтересованным лабораториям два белковых образца в количестве 1 наномоля. Нужно было определить максимально длинную N-концевую последовательность, используя любые доступные методы. Сравнение результатов, представленных различными лабораториями, показало, что автоматическое N-концевое секвенирование по-прежнему является ценным методом для анализа белков. Несомненно, что этот метод будет и далее использоваться в анализе белков, особенно в сочетании с различными масс-спектрометрическими методами и ВЭЖХ.

Основные области применения: характеристика рекомбинантных белков, идентификация биологически активных форм белков и пептидов, включая пост-трансляционные модификации, идентификация антигенных эпитопов и биомаркеров.

## ANALYTICAL PROTEIN CHEMISTRY IN MODERN BIOMEDICAL RESEARCH

Chertov O.Yu.

Advanced Technology Program, Protein Chemistry Laboratory,  
SAIC-Frederick, Inc., NCI-Frederick, Frederick, MD 21702, USA  
E-mail: oleg@ncifcrf.gov

From the 1970's through the 1990's protein amino acid sequence determination based on step-wise N-terminal amino acid degradation (Edman) was the most important method in protein analysis. This method allows determination of partial amino acid sequences of purified proteins.

The availability of protein sequence databases based on genome sequences of most organisms and progress in mass spectrometry of peptides has changed the role of classical protein chemistry. Presently it is possible to identify large numbers of proteins in complex mixtures using mass spectrometry based methods. Proteins are identified based on identification of peptides obtained after protein cleavage in solution or in polyacrylamide gel. However, determination of sequences of intact protein larger than 10 kDa using mass spectrometry is still very challenging. To compare the possibilities of automatic N-terminal protein sequencing and mass spectrometry techniques for N-terminal sequence determination of proteins the Edman Sequencing Research Group (ESRG) of Association of Biomolecular Resource Facilities provided interested laboratories with two protein samples in the amount of 1 nmol. Participants were asked to use any available technique to determine maximum N-terminal sequence coverage. The submitted results demonstrated that Edman sequencing is still have advantages over existing mass spectrometry methods and therefore will remain a valuable technique for protein analysis in the near future especially in combination with different mass spectrometry techniques and HPLC. Edman sequencing is especially useful for characterization of recombinant proteins, identification of physiologically active forms of proteins and peptides, identification of antigenic epitopes and biomarkers.

Funded by NCI Contract No. HHSN261200800001E.

## MICELLISATION AND IMMUNO REACTIVITIES OF DIMERIC $\beta$ -CASEINS

Haertle Th.

Institut National de la Recherche Agronomique, 44316 Nantes Cedex 3, France  
E-mail: haertle@nantes.inra.fr

Bovine  $\beta$ -caseins ( $\beta$ -CN) are highly amphiphilic micellizing phospho-proteins showing chaperone-like activity *in vitro*. Recently, existence of multiple sequential epitopes on  $\beta$ -CN polypeptide chain in both hydrophilic-polar ( $\psi$ ) and hydrophobic-apolar domains ( $\phi$ ) has been reported. In order to clarify specific contribution of polar- and apolar domains in micellisation process and in shaping immuno reactivity of  $\beta$ -CN, its dimeric/bi-amphiphilic "quasi palindromic" forms covalently connected by a disulfide bond linking either N-terminal (C4  $\beta$ -CND) or C-terminal domain (C208  $\beta$ -CND) were produced and studied. Depending on C- or N-terminal position of inserted cysteine, each dimeric  $\beta$ -CN contains one polar/apolar region at the centre and two external hydrophobic/hydrophilic ends. Consequently, such casein dimers have radically different polarities/hydrophobicities on their outside surfaces. Dynamic light scattering (DLS) measurements indicate that these dimeric casein molecules form micelles of different sizes depending on arrangement of polar fragments of the  $\beta$ -CN mutants in their constrained dimers. Non-aggregated dimers have different hydrodynamic diameters what could be explained by their different geometries. Measurements of fluorescence showed more hydrophobic environment of Trp residues of C208  $\beta$ -CND, while in similar experimental conditions Trp residues of C4  $\beta$ -CND and native  $\beta$ -CN were more exposed to polar medium. Both fluorescence and DLS studies showed greater propensity for micellisation of the dimeric  $\beta$ -CNs suggesting that the factors inducing the formation of micelles are stronger in the bi-amphiphilic dimers. 1-Anilino-naphthalene-8-sulfonate (ANS) binding studies showed different binding of ANS by these dimers as well as different exposition of ANS binding (hydrophobic) regions in the micellar states. The differences in fluorescence resonance energy transfer (FRET) profiles of C4  $\beta$ -CND and C208  $\beta$ -CND can be explained by differences of distances and/or by differences of relative orientations of the donor (Trp) and acceptor (ANS), as well as by differences in quenching properties of the disulfide bridges and intra-molecular hydrophobic interactions. The immuno reactivity assays showed somewhat lower IgE response to C208  $\beta$ -CND than to C4  $\beta$ -CND. Thus, dimerization of C208  $\beta$ -CN, connecting two C-terminal hydrophobic domains of two monomers doubling long-range hydrophobic interactions, hides a part of epitopes in the hydrophobic interface/core of C208  $\beta$ -CND what is coherent with the results of DLS and fluorescence studies. This study not only demonstrated the importance of the organization of polar and hydrophobic regions during micellisation of the constrained and oriented  $\beta$ -CN dimers but also confirmed a possible role of C-terminal hydrophobic domain in defining the immuno reactivity of native  $\beta$ -CN.

## АНТИСМЫСЛОВОЙ ПОДХОД. ИСТОРИЯ И СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ

Кнорре Д.Г.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,  
Новосибирск, Россия  
E-mail: knorre@niboch.nsc.ru

Антисмысловая технология как подход к подавлению генетической информации олигонуклеотидами, комплементарными определенному участку смысловой нуклеиновой кислоты, впервые была опубликована в 1967 году в статье Н. Гриневой с сотр. в журнале "Tetrahedron Letters". Однако, в это время еще не были разработаны ни эффективные методы олигонуклеотидного синтеза, ни методы секвенирования нуклеиновых кислот. Поэтому возможность специфичной модификации определенного участка нуклеиновой кислоты с помощью комплементарного олигонуклеотида была продемонстрирована для случая алкилирования валиновой транспортной РНК с помощью тринуклеотида, несущего алкилирующий остаток. Только восемь лет спустя Пол Замечник с сотрудниками осуществили биологическую реализацию этого подхода в своих работах по подавлению размножения в культуре клеток вирусом саркомы Роуса и ВИЧ. Подход привлек внимание многих ученых своей простотой и кажущейся легкостью реализации. Дальнейшие исследования в этой области были направлены на улучшение свойств антисмысловых реагентов *in vitro* и *in vivo*. Очевидно также, что стабильность реагентов к действию внутри- и экстраклеточных нуклеаз существенна для исследований *in vivo* и последующих медицинских приложений. Эффективность повышалась путем присоединения реакционноспособных групп, ведущего к необратимости действия, усилению комплементарных взаимодействий реагентов и улучшению проницаемости через мембраны. Предпочтение в данном докладе отдается работам, выполненным в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (ранее – Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН). Большое число реакционноспособных групп было исследовано в качестве "боеголовки" комплементарных реагентов. Среди них остается как перспективная алкилирующая группа, предложенная в первой работе Н. Гриневой. Был изучен механизм химической модификации в комплементарных комплексах. Стабильность дуплексов достигалась путем использования морфолиноолигонуклеотидов, замкнутых нуклеотидов, пептидных олигонуклеотидов. Предприняты многочисленные попытки подавления роста опухолей антисмысловыми олигонуклеотидами. Главными мишенями в этих исследованиях являются факторы, ответственные за пролиферацию, подавление апоптоза и ангиогенез. В работах ИХБФМ в качестве мишени был использован ген множественной лекарственной устойчивости.

## ANTISENSE APPROACH. HISTORY AND PRESENT STATE

Knorre D.G.

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS,  
Novosibirsk, Russia  
E-mail: knorre@niboch.nsc.ru

At first the antisense approach to suppress genetic information by oligonucleotides complementary to some sense fragment of nucleic acid appeared in the press in 1967 in the paper of Nina Grineva and coworkers in "Tetrahedron Letters". However in that time neither efficient methods of oligonucleotide synthesis nor methods of nucleic acid sequencing were not yet elaborated. Therefore, possibility of specific modification of a definite region of nucleic acid via complementary oligonucleotide was demonstrated in the case of alkylation of valine transfer RNA with trinucleotide bearing alkylating residue. Only eight years later Paul Zamechnik and coworkers succeeded in biological realization of approach in their work on suppression of multiplication of Rouse sarcoma and HIV viruses in cell culture. The approach attracted attention of a multitude of scientists due to simplicity of the idea and seeming easiness of its realization. Further investigations in the field were directed firstly to improve properties of antisense reagents and secondly to demonstrate biological action of these reagents both *in vitro* and *in vivo*. Stability to action of extra- and intracellular nucleases was obviously essential for *in vivo* studies and further use in medicine. Efficiency was enhanced first of all by attachment of reactive groups, leading to irreversibility of action, by increase the strength of complementary interaction of reagent and target nucleic acid and by augmentation of membrane permeability. Versions elaborated in the Institute of chemical biology and fundamental medicine (ICBFM, former Novosibirsk Institute of bioorganic chemistry) are preferentially considered in the presentation. A great number of reactive groups were proved as warheads of reactive antisense reagents. Among them still remains as one of the most promising alkylating derivative proposed in the first work of Nina Grineva. The reaction mechanism of chemical modification within complementary complex was studied. Stability of duplexes was achieved by use of morpholino-oligonucleotides, locked oligonucleotides, PNA-oligonucleotides. Numerous attempts were carried out to suppress tumor growth by treatment with antisense oligonucleotides. Factors responsible for cell proliferation, for suppression of apoptosis, for vascular growth were main targets for antisense oligonucleotides. Some of reagents are already subjected at definite stages of clinical trials. One of the targets investigated in ICBFM, is mRNA coding protein responsible for multiple drug resistance.

## СИНТЕТИЧЕСКИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ, ИХ АНАЛОГИ И КОНЬЮГАТЫ: СИНТЕЗ, СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ

Ефимов В.А.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: eva@mx.ibch.ru  
Факс: (495) 330-56-38; тел.: (495) 336-59-11

Синтетические олигонуклеотиды нашли широкое применение для синтеза искусственных генов и других генетических детерминант, а также при сиквенсе НК. Помимо этого, они активно используются как эффективные реагенты ген-направленного действия для изучения механизмов регуляции экспрессии генов и картирования геномов, диагностики заболеваний, детекции патогенных вирусов и микробов, а также для лечения некоторых заболеваний с помощью антисенс-терапии. В рамках проведения комплексных работ по созданию новых генных технологий и разработке основы для создания новых терапевтических и диагностических средств в Институте развивается направление исследований по разработке методологии химического синтеза олигонуклеотидов, их аналогов и миметиков, а также химико-ферментативного синтеза двухцепочечных фрагментов нуклеиновых кислот.

В докладе будут представлены результаты исследований по разработке новых модификаций методов химического синтеза олигонуклеотидов ДНК и РНК ряда, а также двухцепочечных фрагментов НК, конъюгатов олигонуклеотидов, новых типов миметиков и аналогов нуклеиновых кислот, по изучению их биологических и физико-химических свойств и по применению этих соединений в качестве инструментов для молекулярно-биологических исследований.

## **SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDES, THEIR ANALOGUES AND CONJUGATES: SYNTHESIS, PROPERTIES AND APPLICATIONS**

***Efimov V.A.***

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: [eva@mx.ibch.ru](mailto:eva@mx.ibch.ru)

Fax: (495) 330-56-38; tel.: (495) 336-59-11

In recent years, synthetic oligonucleotides have assumed a central role in a multitude of molecular biology techniques as linkers, primers, gene probes and segments for the construction of artificial DNA fragments. More recently, a potential of modified oligonucleotides as antisense and antigene agents, diagnostic probes and therapeutics has attracted increasing interest.

The results obtained in the development of improved methods for the synthesis of DNA and RNA oligonucleotides, double-stranded nucleic acid fragments, novel types of oligonucleotide conjugates, analogues and mimics, as well as the investigation of their biological and physico-chemical properties will be presented. Also, the application of these compounds as universal tools for the solution of a wide range of problems in molecular biology, biotechnology, and medicine will be discussed.

## **ЧТО ДЕЛАЕТ НАС ЛЮДЬМИ? ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ ЭНДОГЕННЫЕ РЕТРОВИРУСЫ?**

***Свердлов Е.Д., Буздин А.А., Лебедев Ю.Б.***

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

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

В начале 80-х годов прошлого века Президент АН СССР А.П. Александров, вице-президент АН СССР Ю.А. Овчинников и чл.-корр. АН СССР Е.Д. Свердлов пришли к решению о целесообразности попытки выявить человек-специфичные гены путем сравнительного анализа геномов человека и шимпанзе. В частности, имелись в виду гены, ответственные за способность человека к речи. В качестве экспериментального подхода была выбрана зарождавшаяся тогда вычитаящая гибридизация. При всей наивности, с сегодняшнего уровня знаний, эта попытка привела к развитию широкого спектра методов несеквенирующего полногеномного сравнения различий в геномах близких видов. В частности, первые же эксперименты по сравнению человека и шимпанзе выявили различия в содержании часто-повторяющихся мобильных элементов генома. Среди возникших кандидатов на возможную роль в процессе видовой дивергенции наиболее вероятными казались человеческие эндогенные ретровирусы (Human endogenous retroviruses, HERV), попавшие в геном приматов, видимо, вследствие многочисленных повторяющихся волн эпидемических инфекций. Ретровирусные LTR (и другие ретроэлементы) были обнаружены в транскрибируемых фракциях отдельных хромосом человека; сравнение результатов исчерпывающего картирования LTR элементов на 19-ой, 21-ой и 22-ой хромосомах человека позволило выявить тенденцию к концентрации LTR в обогащенных генами участках генома; было показано сохранение промоторной и энхансерной активности LTR элементов различного эволюционного возраста; с помощью структурно-эволюционного анализа LTR элементов и определения эволюционной динамики распространения эндогенных ретровирусов доказано существование в эволюции генома приматов нескольких продолжительных волн ретротранспозиций, последняя из которых совпадает со временем эволюционного расхождения линий человека и шимпанзе. Полученные результаты легли в основу гипотезы, согласно которой распространение LTR эндогенных ретровирусов в геноме могут приводить к эволюционно значимым изменениям систем регуляции экспрессии генов и являться важной молекулярно-генетической причиной видообразования у приматов. Был разработан новый экспериментальный подход к сравнительному анализу распределения интеграций ретроэлементов в геномах близкородственных видов, основанный на применении разработанной серии оригинальных методов вычитаящей гибридизации геномных ДНК. С использованием этого подхода нами впервые, в масштабах целых геномов, осуществлен экспериментальный поиск различий в участках интеграций LTR и LINE1 ретроэлементов между геномами человека и шимпанзе. В ходе этих исследований открыта и картирована



представительная группа ретроэлементов (150 LTR и свыше 3000 L1), специфичных для генома человека, и составлены каталоги генов человека, содержащих видоспецифические интеграции ретроэлементов. В последующем аналогичная стратегия была успешно применена для полногеномной идентификации полиморфных инсерций AluY элементов в смесевых образцах индивидуальных ДНК человека. Были выявлены "эволюционно молодые" ретроэлементы, представленные членами четырёх групп: SVA, Alu, L1 и эндогенных ретровирусов HERV-K (HML-2). Особый интерес представляют обнаруженные нами человек специфичные эндогенные ретровирусы (hsERV), представленные 134 копиями и занимающие около 330 т.п.о. ДНК человека. Они добавили в геномную последовательность копии 50 функциональных ретровирусных генов, а также 134 потенциальных промотора и энхансера. Как минимум 67 таких элементов работают как человек специфичные промоторы *in vivo*. hsERV регулируют активность известных белок кодирующих генов посредством интерференции РНК и как энхансеры, а также предоставляют новые сигналы полиаденилирования для мРНК. Таким образом, есть все основания рассматривать эти элементы в качестве возможных участников эволюции *H. sapiens*. Они действительно занимают важное место среди других элементов, отличающих геном человека от генома шимпанзе, множество которых выявлено в ходе прямого сравнения двух родственных геномов, особенно после определения последовательностей геномов человека и шимпанзе. Как же обстоит дело с ответом на вопрос? Делают ли нас эти элементы тем, что мы есть - представителями вида *H. sapiens*? Как и все другие исследователи в этой области, мы сталкиваемся с неразрешимой сегодня проблемой - существованием разрыва в знании структурных особенностей и трансляцией этого знания в фенотипические признаки. Естественный отбор, который определяет в конечном счете роль того или другого элемента генома в эволюции, работает на уровне целого организма и поэтому, несмотря на множество усилий, разрыв между нашими знаниями геномных различий и тем, как они влияют на фенотипические различия, сохраняется и будет сохраняться еще долго. Необходим следующий принципиальный шаг в создании массивированного функционального анализа обнаруживаемых геномных различий. Только имея такой подход, мы будем в состоянии начать интеграцию всех геномных и фенотипических данных в единую картину, описывающую процесс приобретения нашим видом его уникальных особенностей. Поиск в этом направлении ведется, но успех, по-видимому, не дастся малой кровью.

## WHAT MAKES US HUMAN? HUMAN ENDOGENOUS RETROVIRUSES?

Sverdlov E.D., Buzdin A.A., Lebedev Yu.B.

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: edsverd@gmail.com

In early 80th of the last century President of the USSR Academy of Sciences A.P. Alexandrov, Vice-president Yu.A. Ovchinnikov and corresponding member of the USSR Academy of Sciences E.D. Sverdlov have decided it expedient to reveal human-specific genes by comparative analysis of the human and chimpanzee genomes. In particular, the planned study should be directed at speech genes responsible for the human ability to speak. The emerging at that time subtractive hybridization was chosen as an experimental approach. Although naive from the viewpoint of the present-day level of knowledge, this attempt has led to the development of a wide spectrum of genome-wide non sequencing strategies for comparison of closely related genomes. The very first experiments revealed differences in the content of highly repetitive mobile elements in the genomes of human and chimpanzee. The most probable candidates for playing a role in species divergence were seemingly human endogenous retroviruses (HERVs) intruded in the genomes of primates possibly due to multiple repetitive epidemic infections. Retroviral LTRs and other retroelements were found in transcribed regions of particular human chromosomes. Exhaustive mapping of LTRs on human chromosomes 19, 21 and 22 allowed to reveal a trend towards concentration of LTRs in gene-enriched regions of the genome. It was demonstrated that LTRs of various evolutionary age retained their promoter and enhancer activity. Structure evolutionary analysis and evolutionary dynamics of the spread of endogenous retroviruses suggested that in primate evolution there had been a number of extended waves of retrotranspositions, the last wave coinciding in time with the evolutionary divergence of human and chimpanzee lineages. The results obtained have underlain a hypothesis that the spread of ERV LTRs in the genome might lead to evolutionary significant changes in gene expression regulation systems and might be an important molecular genetic cause of primate speciation. It was developed a new experimental approach to comparative analysis of retroelement distribution in genomes of closely related species. The approach was based on a series of specially developed original methods of subtractive hybridization of genomic DNAs. Using this approach, we have, for the first time, experimentally identified differences in regions of integrations of LTR and LINE1 retroelements between the human and chimpanzee genomes on a genome-wide level. As a result, a representative group of human genome specific retroelements (150 LTRs and over 3000 L1s) was identified and mapped, and catalogs of human genes harboring species-specific integrations of retroelements were compiled. A similar strategy was then successfully used for a genome-wide identification of polymorphic insertions of AluY elements in mixed samples of individual human DNAs. There were revealed "evolutionary young" retroelements represented by the members of four groups: SVA, Alu, L1 and HERV-K (HML-2) endogenous retroviruses. Of



special interest were also identified 134 copies of human-specific endogenous retroviruses (hsERVs) that occupy ~330 kb of human DNA. The integrations of hsERVs added to the genomic sequence 50 copies of functional retroviral genes, as well as 134 potential promoters and enhancers. At least 67 of these elements function as human specific promoters *in vivo*. hsERVs regulate the activity of known protein coding genes through RNA interference and as enhancers, and also provide new polyadenylation signals for mRNA. Therefore, there are all grounds to consider retroelements as likely participants in *Homo sapiens* evolution. They do hold a prominent place among other elements differential between the genomes of human and chimpanzee, many of which were found by a direct comparison of these genomes, especially after their sequencing. How can we then answer the question 'Do these elements make us what we are – representatives of the *H. sapiens* species'? Just as other researchers in this field, we are facing a currently insoluble problem due to a gap between our knowledge of structural details and translation of this knowledge into phenotypic traits. Natural selection, that eventually determines the role and fate of genomic elements in evolution, works at the level of the whole organism. Therefore, despite continuous efforts the gap between our knowledge of genomic differences and their phenotypic embodiment still exists and will exist for a long time. We need a next fundamental stride in developing massive functional analysis of genomic differences. Only based on such an approach we will be able to initiate integration of all genomic and phenotypic data into a unified conception of the process of acquiring unique features by our species. A search in this direction is under way, but the success will probably not be achieved for cheap.

## **ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ ВГС С ВИРУСНЫМИ И КЛЕТОЧНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ**

***Иванов А.В., Белжеларская С.Н., Козлов М.В., Куханова М.К., Туницкая В.Л., Кочетков С.Н.***

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

E-mail: kochet@eimb.ru

Вирус гепатита С (ВГС) человека является основной причиной хронического гепатита. Хроническая инфекция ВГС вызывает высокий риск развития цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. Геном ВГС представляет собой одноцепочечную (+)РНК (9.6 т.нт.), кодирующую единственный полипротеин длиной 3010-3011 аминокислотных остатков. После кэп-независимой трансляции полипротеин последовательно расщепляется клеточными и вирусными протеиназами, в результате чего образуются четыре структурных (S) и шесть неструктурных (NS) вирусных белков. NS5B (РНК-зависимая РНК-полимераза, RdRp), NS3 (протеиназа/хеликаза/НТРаза) и белок NS5A, наряду с другими вирусными и клеточными факторами, образуют вирусный репликационный комплекс.

Для исследований взаимодействия белков ВГС с вирусными и клеточными компонентами мы экспрессировали большинство их в бактериальных и эукариотических системах. В этом сообщении мы приводим данные, согласно которым нефосфорилированный вирусный белок NS5A ингибирует активность RdRp на матрице polyA-oligoU, но практически не оказывает влияния на синтез вирусной РНК. NS5A, фосфорилированный казеинкиназой II, оказывает противоположный эффект в обеих системах определения активности, в то время как фосфорилирование казеинкиназой I не влияет на активность RdRp. Фосфорилирование NS5A казеинкиназой II не изменяет его сродства к RdRp и вирусной РНК. Мы предполагаем, что NS5A предотвращает связывание RdRp с матрицей.

NS5A и некоторые другие белки ВГС способны вызывать окислительный стресс клетки. Мы показали, что этот феномен опосредуется клеточными транскрипционными факторами и связан с фосфорилированием, осуществляемым протеинкиназой С и казеинкиназой II.

Поскольку терапия ВГС развита недостаточно, поиск новых ингибиторов жизненного цикла вируса весьма актуален. В докладе будут приведены данные о действии новых ингибиторов RdRp, NS3 и гликозилировании поверхностных гликопротеинов ВГС.

## INTERACTIONS OF HCV PROTEINS WITH VIRAL AND HOST COMPONENTS

*Ivanov A.V., Belzhelarskaya S.N., Kozlov M.V., Kukhanova M.K., Tunitskaya V.L., Kochetkov S.N.*

Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow, Russia

E-mail: [kochet@eimb.ru](mailto:kochet@eimb.ru)

Human hepatitis C virus (HCV) is a major cause of chronic hepatitis worldwide. Chronic HCV infection is associated with a high risk for development of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. HCV is a positive-sense single-stranded RNA virus with a genome of about 9.6 kb which encodes a polyprotein of 3010-3011 amino acids. After cap-independent translation the polyprotein is consecutively split by cellular and viral proteases, resulting in four structural (S) and six non-structural (NS) proteins. NS5B (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp), NS3 (proteinase/helicase/NTPase) and NS5A as well as some still unknown host factors form a complex, which replicates virus genome.

To study interactions of HCV proteins with viral and host components we expressed most of them in bacterial and eukaryotic cells. Here we demonstrate that *in vitro* unphosphorylated NS5A protein inhibits HCV RdRp activity in polyA-oligoU system but has little effect on synthesis of viral RNA. The phosphorylated casein kinase (CK) II NS5A protein causes the opposite effect on RdRp in each of these systems. The NS5A phosphorylation with CKI does not change the RdRp activity. The phosphorylation of NS5A protein with CKII does not affect its affinity to the HCV RdRp and RNA. Herein we report evidence that the NS5A prevents template binding to the RdRp.

NS5A and some other HCV proteins can cause the oxidative stress in the cells. We show here that this phenomenon is mediated by some cellular transcription factors and includes the action of protein kinase C and CKII.

As HCV therapy is not developed properly the search of new inhibitors of viral life cycle is urgently needed. In this report some new data on inhibitors of RdRp, NS3 and glycosylation of HCV envelop proteins will be demonstrated.

## ENVELOPE GLYCOPROTEIN ON HIV AND SIV VIRIONS: BIOCHEMICAL AND ELECTRON TOMOGRAPHY ANALYSIS

*Chertova E.N.*

AIDS and Cancer Virus Program, Protein Chemistry Laboratory, SAIC-Frederick, Inc., NCI-Frederick, Frederick, MD, 21702, USA

E-mail: [chertova@ncifcrf.gov](mailto:chertova@ncifcrf.gov)

Using detailed quantitative biochemical analysis we have estimated the average number of envelope trimers to be 7-19 for HIV-1 and wild type SIV and 50-130 for mutant SIVs (Chertova et al., 2002). Since such calculations inevitably involve certain assumptions, it would be highly desirable to quantitate virion envelope content using independent and preferably direct methods. To characterize the nature of envelope glycoproteins on the surface of HIV and SIV virions we used EM analysis coupled with electron tomography and image processing. The performance and interpretation of these studies were facilitated by three recent developments. First, we have developed a virus inactivation procedure preserving the functional and conformational state of viral envelope proteins which allowed safe specimen process for EM studies. Second, we have recently established methods for quantitative analysis of viral proteins in purified HIV and SIV which revealed that gp120 is not shed from the virus but is retained during the purification process providing viruses as representative samples for EM analysis (Chertova et al., 2002). Third, using these methods, we have characterized numerous HIV and SIV preparations, in the process identifying SIV isolates that have high envelope content. Taking advantage of these approaches, purified HIV-1 and SIV have been directly visualized and the trimeric structures on the surface of the virus enumerated. HIV-1 and wild-type SIV virions had an average of 8-9 env trimers per virion and mutant SIVs known to contain high levels of the viral env proteins had an average of 70-79 trimers (Zhu et al., 2003, Zhu et al., 2006). The results directly demonstrate the presence of env trimers on the surface virions, and have important implications for understanding virion formation, virus interactions with host cells, and virus neutralization.

Funded by NCI Contract No. HHSN261200800001E.

### References

- Zhu P., Liu J., Bess J. Jr, Chertova E., Lifson J.D., Grise H., Ofek G.A., Taylor K.A., Roux K.H. 2006. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature*. **441**(7095):847-52.
- Zhu P., Chertova E., Bess J. Jr., Lifson J.D., Arthur L.O., Liu J., Taylor K.A., Roux K.H. 2003. Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**(26): 15812-15817.
- Chertova E., Bess J., Crise B., Sowder R., Schaden T., Hilburn J., Hoxie J., Benveniste R., Lifson J., Henderson L., and Arthur L. 2002. Envelope glycoprotein incorporation, not shedding of surface envelope glycoprotein (gp120/SU), is the primary determinant of SU content of purified human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* **76**(11):5315-25.

## HIGH YIELD INTERNALIZATION OF PEPTIDES, PROTEINS AND NUCLEOTIDES INTO DIFFERENT CELLS BY CELL PENETRATING PEPTIDES

**Mussbach F., Zoch A., Franke M., Pietrucha R., Schafer B., Reissmann S.**

Jena Bioscience GmbH, Loebstedter Str. 80, 07749 Jena, and Friedrich-Schiller-University, Institute of Biochemistry and Biophysics, FSU, Hans-Knoll-Str. 2, 07745 Jena, Germany  
E-mail: siegmund.reissmann@uni-jena.de

The use of "Cell Penetrating Peptides and Proteins" (CPPs) for internalization of "cargos" such as phosphopeptide ligands, antibodies, enzymes, other functional proteins and nucleoside triphosphates (NTPs) for influencing intracellular signal pathways requires knowledge about as well as chemical characteristics and complex formation tendencies of CPPs, transduction process and amount of transported cargo. For influencing intracellular signal transduction the delivery of sufficient amounts of cargo into common cell lines alongside with tolerance of these cells toward the used transduction procedures remains a major bottleneck for the utility of CPPs.

We therefore investigated the uptake of fluorescence labelled and unlabelled peptides, proteins ( $\beta$ -galactosidase, BSA, primary and secondary antibodies) and of the fluorescence labelled deoxy nucleoside triphosphate dUTP into adherent (HeLa, COS-7, NIH 3T3) and suspension (Jurkat, NB-4, Kasumi-1) cells. These cell lines vary largely regarding sensitivity to the required amounts of CPPs and corresponding transduction rates and efficiencies. We systematically optimized the transduction efficiencies through fine-tuning of the parameters time, temperature, presence of auxiliary compounds (DMSO, BSA, protease inhibitors).

We chose only such CPPs, which are able to form non-covalent complexes with the cargo [1]. The applied CPPs are hydrophilic (Penetratin, HIV-Tat, MPG $\beta$ , CPPP-2) or hydrophobic (MPG $\alpha$ , CAD-2). They show different stabilities against proteolytic degradation and also different tendencies to form complexes with proteins or nucleotides. Based on systematic studies on relationships between type of CPP, type of cargo and cell line we developed for broader applications as well as a cocktail for peptides and proteins (*JBS-Proteoducin*) and for nucleotides (*JBS-Nucleoducin*).

The transduction of cargoes was qualitatively observed for enzymes by staining with a substrate or for labelled cargoes by fluorescence microscopy. Quantification of the internalized amounts was performed either by fluorescence measurements in solution or on the electrophoresis gel or by Western-Blotting. The internalized amounts were calculated to attomol per cell and compared to the extracellular applied cargo concentration to give the transduction efficiency. In the case of the phosphorylated octapeptide ligand for a SH2-domain the internalization was functionally characterized by influencing the activity of the protein tyrosine phosphatase SHP-1.

With the aim to avoid studies with damaged cells we estimated their viability [2] and the intactness of their cell membrane [3] under the used conditions and especially with the highest applied concentrations of CPPs, cocktails and auxiliaries.

The studied cell lines differ strongly in their sensitivity to enhanced concentrations of CPPs and cocktails.

The project was financially supported by the BMBF (IW061002).

### References

- [1] S. Deshayes, M. Morris, F. Heitz and G. Divita. Delivery of proteins and nucleic acids using a non-covalent peptide-based strategy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 537-547 (2008).
- [2] K. Saar and B. Langel. Toxicity Methods for Cell-penetrating Peptides in *Handbook of Cell Penetrating Peptides* (Ed. B. Langel), CRC Taylor and Francis, Boston, London, New York, 2007, pp.553-565.
- [3] A. L. Niles, R.A. Moravec, P.E. Hesselberth, M.A. Scurria, W.D. Daily and T.L. Riss. A homogeneous assay to monitor live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Anal. Biochem.* **366**, 197-206 (2007).

**ПИРИДОКСАЛЬНЫЙ КАТАЛИЗ, cAMP ЗАВИСИМЫЕ  
ПРОТЕИНАКИНАЗЫ И РЕЦЕПТОРНЫЕ СИСТЕМЫ МЕМБРАН (50 ЛЕТ  
СОТРУДНИЧЕСТВА)**

*Северин Е.С.*

Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва,  
Россия

E-mail: e.severin@mail.ru

Сразу после окончания химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова основными направлениями моей научной работы, проводимой под руководством Р.М. Хомутова в лаборатории биокатализа Института молекулярной биологии АН СССР (зав. лабораторией академик А.Е. Браунштейн), были разработка новых специфических ингибиторов активных центров пиридоксальных ферментов и изучение молекулярного механизма их действия. Объектом изучения была выбрана высокоочищенная аспартат-глутамат трансминаза, и целью исследования были изучение топографии активного центра, природы его функциональных групп и характеристика пептидных последовательностей активного центра этого фермента. В 1974 г. по решению Ученого совета Института молекулярной биологии АН СССР была организована лаборатория энзиматической регуляции клеточной активности, и я был избран на должность заведующего этой лабораторией.

По рекомендации директора Института молекулярной биологии АН СССР академика В.А. Энгельгардта основным направлением исследований новой лаборатории стало изучение биологической роли популярных в этот период развития молекулярной биологии вторичных посредников – cAMP, cGMP и Ca<sup>2+</sup>-связывающих белков. Объектом исследования был выбран фермент – cAMP-зависимая протеинкиназа, для которого нами были изучены топография cAMP-связывающего участка, структура и функциональные группы АТР-связывающего участка, механизм аллостерической регуляции активности фермента и подробно исследована субстратная специфичность фермента.

В 1985 г. по рекомендации академика Ю.А. Овчинникова я был назначен директором Института прикладной молекулярной биологии Министерства здравоохранения СССР с целевой задачей разработать возможные пути внедрения достижений молекулярной биологии и биохимии в практическую медицину. Научным консультантом Института был утвержден академик Р.В. Петров, в формировании научной программы Института участвовали академик Е.И. Чазов, академик В.Т. Иванов, академик В.А. Кабанов, академик РАМН Н.П. Бочков и другие видные ученые. Для понимания развития различных патологических состояний, нахождения возможных новых методов лечения и создания избирательно действующих лекарственных препаратов было предложено подробно изучить рецепторный портрет человека и его зависимость от течения патологического процесса в определенных органах-мишенях.

В докладе будут подробно обсуждены изменения рецепторного портрета в клетках-мишенях человека по мере развития заболевания, новые молекулярно-биологические подходы преодоления множественной лекарственной устойчивости с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза, а также возможные пути избирательной доставки цитостатиков в опухолевые ткани с целью преодоления токсического эффекта противоопухолевых лекарственных препаратов в отношении иммунной системы человека.

**PYRIDOXAL CATALYSIS, cAMP-DEPENDENT PROTEINKINASE AND  
MEMBRANE RECEPTOR SYSTEMS (50 YEARS OF COOPERATION)**

*Severin E.S.*

Research Centre of Molecular Diagnostics & Therapy, Moscow, Russia

E-mail: e.severin@mail.ru

Upon graduation of the Chemical Faculty of the Lomonosov Moscow State University, the main direction of my scientific work was the development of new specific inhibitors of active centres of pyridoxal enzymes and analysis of the molecular mechanism of their action.

The work was conducted under the direction of R.M. Khomutov at the Laboratory of Biocatalysis of the Institute of Molecular Biology of the USSR Academy of Sciences (head of laboratory academician A.E. Braunstein).

High-purity aspartate-glutamate transaminase was chosen as the main subject of the study; its purpose was to analyze topography of the active centre, the nature of its functional groups and characteristics of the peptide sequences of the active centre of this enzymes.

In 1978 by the decision of the Scientific Council of the Institute of Molecular Biology of the USSR Academy of Sciences, was organized the laboratory for enzymatic regulation of the cell activity. I was elected to the position of the head of this laboratory.

At the recommendation of academician V.A. Engelgardt, Director of the Institute of Molecular Biology of the USSR Academy of Sciences, the main direction of the scientific research carried out at the new laboratory became the study of the biological role of the secondary mediators – cAMP, cGMP and Ca<sup>2+</sup>-binding proteins, which were popular at that period of the development of the molecular biology.

The cAMP-dependent proteinkinase enzyme was chosen as the main subject of the scientific research; for this purpose we analysed the topography of the cAMP-binding part, the structure and functional groups of the ATP-binding part, the mechanism of allosteric regulation of the enzyme activity; we also studied in detail its substrate specificity.

In 1985 at the recommendation of academician Yu.A. Ovchinnikov I was appointed to the position of the Director of the Institute of Applied Molecular Biology of the Ministry of Health of the USSR. The main objective was to develop possible ways of introducing the achievements of molecular biology and biochemistry into practical medicine. Academician R.V. Petrov was approved as the scientific consultant of the Institute, academician E.I. Chazov, academician V.T. Ivanov, academician V.A. Cabanov, academician of the Russian Academy of Medical Sciences, N.P. Bochkov, took part in forming the scientific program of the Institute.

It was proposed to study in detail the receptor portrait of a human and its dependence on the pathological process course in certain target organs. This was essential for understanding the development of different pathological conditions, the discovery of new possible ways of treatment and creation of pharmaceuticals with selective action.

The report will give a detailed coverage of:

- the changes of the receptor portrait in the human target cells in the course of the disease development;
- new molecular-biology based approaches in overcoming multidrug resistance with the help of receptor-mediated endocytosis;
- possible ways of selective delivery of cytostatics to the tumour cells, for the purpose of overcoming the toxic effect of the anti-tumour drugs as to the human immune system.

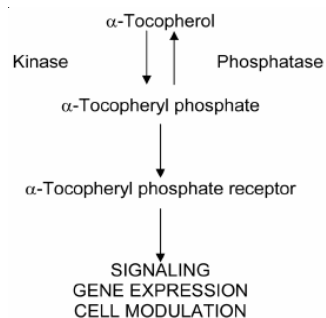
## VITAMIN E IS ACTIVATED BY PHOSPHORYLATION TO $\alpha$ -TOCOPHERYL PHOSPHATE

*Azzi A.*

Vascular Biology Laboratory, JM USDA-HNRCA at Tufts University, Boston, MA 02111, USA

E-mail: [angelo.azzi@tufts.edu](mailto:angelo.azzi@tufts.edu)

Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol), traditionally described as an antioxidant, has revealed to possess specific cellular functions that are independent of its radical scavenging properties. It inhibits protein kinase C and PI3 kinase, as well as activates protein phosphatase 2A and diacylglycerol kinase. Furthermore, at transcriptional level, several genes (the first to be described have been CD36,  $\alpha$ -TTP,  $\alpha$ -tropomyosin, and collagenase) are modulated by  $\alpha$ -tocopherol [1].  $\alpha$ -Tocopheryl phosphate ( $\alpha$ -TP) is synthesized and hydrolyzed in animal cells and tissues; it modulates also several cell functions [2,3]. While it is similar to  $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ -T),  $\alpha$ -TP appears to be more potent than  $\alpha$ -T in inhibiting cell proliferation, down regulating CD36 transcription, inhibiting atherosclerotic plaque formation etc. In cells and animals  $\alpha$ -TP does not act by liberating  $\alpha$ -T; rather, the intact molecule appears to be more potent than  $\alpha$ -T itself [4,5].  $\alpha$ -TP can be defined as the active form of  $\alpha$ -T. Administration of  $\alpha$ -TP to cells or to animals requires its transfer through membranes. Specific inhibitors, glybenclamide and probenecid showed to inhibit  $\alpha$ -TP transport and to eliminate the effects caused by  $\alpha$ -TP to cells, in a dose-dependent way. In a search for genes that are specifically and strongly affected by  $\alpha$ -TP, gene arrays representing essentially all human genes were used. A group of genes was found that is up-regulated by  $\alpha$ -TP but not by  $\alpha$ -T; suggesting that in some cells  $\alpha$ -T is not sufficiently converted to  $\alpha$ -TP. Genes which were regulated by both compounds were more affected by  $\alpha$ -TP than by  $\alpha$ -T.



## ТЕЗИСЫ СТЕНДОВЫХ СООБЩЕНИЙ ABSTRACTS OF POSTER PRESENTATIONS

### References

1. Azzi, A. (2007) Molecular mechanism of alpha-tocopherol action, *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 16-21.
2. Gianello, R., Libinaki, R., Azzi, A., Gavin, P. D., Negis, Y., Zingg, J. M., Holt, P., Keah, H.H., Griffey, A., Smallridge, A., West, S.M. & Ogru, E. (2005) Alpha-tocopheryl phosphate: a novel, natural form of vitamin E, *Free Radic. Biol. Med.* **39**, 970-6.
3. Negis, Y., Zingg, J.-M., Ogru, E., Gianello, R., Libinaki, R. & Azzi, A. (2005) On the Existence of Cellular Tocopheryl Phosphate, its Synthesis, Degradation and Cellular Roles: A Hypothesis. *IUBMB Life*. **57**, 23 - 25.
4. Munteanu, A., Zingg, J.-M., Negis, Y., Azzi, A., Ogru, E., West, S., Libinaki, R. & Gianello, R. (2004) Modulation of cell proliferation and gene expression by  $\alpha$ -tocopheryl phosphates: Relevance to atherosclerosis and inflammation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **318**, 311-316.
5. Negis, Y., Aytan, N., Ozer, N., Ogru, E., Libinaki, R., Gianello, R., Azzi, A. & Zingg, J. M. (2006) The effect of tocopheryl phosphates on atherosclerosis progression in rabbits fed with a high cholesterol diet, *Arch. Biochem. Biophys.* **450**, 63-6.



## РАСТВОРИМЫЙ Fas ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

*Аббасова С.Г., Липкин В.М.\*, Куилинский Н.Е.\*\**

Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия

\*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

\*\*Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва, Россия

E-mail: svetlanaabbasova@rambler.ru

Апоптоз – исключительно важный механизм элиминации опасных для организма клеток, к числу которых относятся вирус-инфицированные и опухолевые клетки. Устойчивость клеток злокачественных новообразований к противоопухолевой защите организма, к арсеналу средств которой относится система Fas-зависимого апоптоза, является серьезной проблемой как для фундаментальной науки, так и для практической медицины. Одной из причин устойчивости опухолевых клеток к цитотоксическому действию Fas-лиганда может быть повышенная продукция растворимого Fas этими клетками. Растворимый Fas (sFas) способен дистантно ингибировать действие Fas-лиганда, обеспечивая клеткам-продуцентам sFas преимущества в выживании и размножении.

В данном исследовании приводится характеристика первой отечественной тест-системы для иммуноферментного определения sFas в сыворотке крови человека. Приводится анализ экспериментальных данных определения концентрации sFas с помощью разработанной тест-системы у более тысячи больных с опухолями молочной железы, костей, яичников, тела матки, толстой кишки, надпочечников и щитовидной железы. В работе изучены корреляционные связи sFas с другими факторами, вовлеченными в патогенез онкологических заболеваний – рецепторами эстрогенов в ткани опухолей молочной железы, активатором плазминогена урокиназного типа (uPA), индуктором неоангиогенеза в опухоли – VEGF, провоспалительным цитокином с широким спектром биологической активности – IL-6 и общей активностью щелочной фосфатазы при саркомах костей. Показано, что растворимый Fas вовлечен в патогенез опухолевых заболеваний: "высокий" уровень sFas в сыворотке крови связан с поздними стадиями болезни при раке яичников, тела матки, толстой кишки и коры надпочечников; с низкой степенью дифференцировки опухоли при раке яичников и тела матки; с глубиной инвазии опухоли в ткань миометрия, стенку кишки и в окружающие ткани при раке тела матки и толстой кишки; с наличием отдаленных метастаз при колоректальном и аденокортикальном раке. Показано, что "высокий" исходный уровень sFas достоверно связан с ухудшением показателей общей и безрецидивной выживаемости больных остеосаркомой, раком яичников, эндометрия и аденокортикальным раком, а также является неблагоприятным фактором в оценке эффективности применения неoadъювантной противоопухолевой лучевой терапии для больных колоректальным раком.

## SOLUBLE Fas IN ONCOLOGY DISEASES

*Abbasova S.G., Lipkin V.M. \*, Kushlinskii N.E. \*\**

Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,  
Pushchino, Russia

\*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow,  
Russia

\*\*Cancer Research Center RAMS, Moscow, Russia

E-mail: svetlanaabbasova@rambler.ru

Apoptosis is the mechanism of paramount importance to the disposal of cells dangerous to the body, such as virus infected or cancerous cells. In the anti-tumor defense of a human organism, one aspect of the lack of apoptotic elimination stems from the development of resistance to the effects of the Fas-dependent system of apoptosis, which is both a fundamental scientific and practical medical problem. The resistance of malignant cells to the cytotoxic effect of Fas-ligand, among other reasons, can be mediated by the increased production of soluble Fas (sFas) by these cells. Soluble Fas is capable of distantly inhibiting the Fas-ligand action thus providing advantageous survival and proliferation to the sFas-producing cells.

In the present research, the first Russian ELISA test system for assaying sFas in human blood serum was characterized. The analysis of experimental sFas-concentration data obtained using the system in over 1,000 patients with breast, bone, uterine, colon, adrenal gland, thyroid gland, and ovarian cancer was performed. The correlation was explored between sFas and other factors involved in the pathogenesis of oncology diseases – the estrogen receptors in the mammary gland tumor tissue, the urokinase-type plasminogen activator (uPA), the inducer of tumor neoangiogenesis (VEGF), the proinflammatory cytokine with a broad spectrum of biological activity (IL-6), and the total activity of the alkaline phosphatase in bone sarcoma. It was demonstrated that soluble Fas is involved in the pathogenesis of cancer diseases: The 'high' sFas level in the blood serum was linked with: a late stages of ovary, uterine, colon, and adrenal cortex cancer; with a low-grade tumor differentiation in uterine and ovarian cancer; with the depth of invasion of the tumor into myometrium in uterine cancer and into the walls of colon and adjacent tissues in colon cancer; and with distant metastases in colorectal and adrenal cortex cancer. The 'high' sFas level was shown to reliably correlate with the deterioration of overall performance and relapse-free survival of patients with osteosarcoma, ovarian cancer, endometrial cancer, adrenocortical carcinoma; it was shown to be an adverse factor in assessing the effectiveness of neoadjuvant anti cancer radiation therapy for colorectal cancer patients.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОМЕНА УПРАВЛЯЮЩЕГО ДИСТАНЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ

*Авшалумов А.Ш.*

Институт кибернетической медицины, Москва, Россия

E-mail: alexander.avshalumov@gmail.com

Данная работа посвящена экспериментальной проверке сформулированной автором гипотезы, в соответствии с которой предполагается, что при разрушении структуры биологических объектов формируется излучение, несущее информацию об их свойствах; это излучение при определенных условиях может воздействовать на другие биологические объекты, целенаправленно изменяя их свойства, т.е. играет роль управляющего дистанционного воздействия.

Для проверки этой гипотезы создана специальная компьютеризированная установка. Она представляет собой двухкамерную систему, в одну из изолированных от внешней среды камер которой помещают биологическую субстанцию (объект-источник воздействия), а в другую – объект-приемник, биологическую субстанцию, свойства которой предполагается изменить с помощью дистанционного воздействия, возникающего в момент разрушения структуры объекта-источника – например, с помощью нагрева. Конструкция устройства исключает возможность переноса энергии от объекта-источника к объекту-приемнику.

Приведем характерные результаты, полученные при экспериментировании на клеточных культурах. Исследования проводились совместно с ведущими в области микробиологии научно-исследовательскими организациями (НИИ трансплантологии и искусственных органов, ОАО "Биохиммаш", ЗАО "Лейтран"). Эксперименты реализовывались по единой методике: стандартным способом формировались два образца клеточных культур – контрольный и экспериментальный. Условия, обеспечивающие их выращивание, хранение, транспортировку, были абсолютно идентичными. Различие заключалось только в том, что экспериментальный образец подвергался обработке в установке.

**1. Эксперименты с  $\beta$ -клетками.** В качестве объекта-приемника в данном случае использовалась культура  $\beta$ -клеток, продуцирующих инсулин. Дистанционное воздействие формировалось при разрушении структуры (сжигании) вещества-источника – субстанции, содержащей гепатоциты и панкреоциты. Измеряемые величины – количество вырабатываемого  $\beta$ -клетками инсулина до обработки в установке, через два часа после одно- или двукратной обработки и в контрольных образцах.

Установлено, что обработка оказывает явное стимулирующее влияние на культуру  $\beta$ -клеток, увеличивая количество вырабатываемого ими инсулина по сравнению с исходными значениями и контрольными образцами в среднем примерно на 30% при однократном воздействии и на 44% – при двукратном.

**2. Эксперимент с клетками Лейдига.** Использована клеточная культура Лейдига новорожденных поросят. Экспериментальный образец

подвергался пятикратному воздействию на установке; дистанционное воздействие формировалось при разрушении тестикул.

Получены следующие результаты: по сравнению с контролем коэффициент пролиферативной активности клеток в обработанном образце оказался выше на 54%, а продуцирование тестостерона больше на 19%.

**3. Эксперимент со стволовыми клетками человека.** В эксперименте использованы мезенхимальные стволовые клетки человека постнатального происхождения. Через 30 суток после начала культивирования экспериментальная часть подвергалась дистанционному воздействию, формируемому в установке в момент гибели под действием разрушающего фактора кардиомиоцитов объекта-источника.

Зафиксировано значительное увеличение основных характеристик жизнедеятельности клеток в экспериментальном образце по отношению к контрольному: индекса пролиферации – в среднем, на 21%, доли кардиомиоцитов в общем числе клеток – на 82%.

Отметим, что в качестве источника, продуцирующего дистанционное воздействие при своей деструктуризации, везде использовались именно те биосубстанции, которые непосредственно связаны со свойствами воспринимающей воздействие культуры клеток и теоретически могут носить стимулирующий характер в нужном для пользователя направлении (гепатоциты и панкреоциты для  $\beta$ -клеток, тестикулы – для клеток Лейдига, кардиомиоциты – для стволовых клеток человека). Характерно, что при экспериментировании со стволовыми клетками в результате целенаправленного воздействия при деструктуризации кардиомиоцитов увеличилось процентное содержание именно кардиомиоцитов, а не каких-либо иных клеток, присутствовавших в исходной культуре в примерно равной пропорции.

Последующее широкое подтверждение обнаруженного феномена управляющего дистанционного воздействия и выявление его физического носителя могут открыть новое перспективное направление в молекулярной биологии, представляющее существенный научный и практический интерес.

## EXPERIMENTAL STUDY OF REMOTE CONTROL EFFECT ON CELL CULTURES

Avshalumov A.S.

Institute of Cybernetic Medicine, Moscow, Russia

E-mail: alexander.avshalumov@gmail.com

This work describes experimental validation of author's hypothesis, which assumes that during breakdown of biological objects structure radiation is generated carrying information about their properties; under certain conditions this radiation can affect other biological objects, directionally changing their properties, i.e., it plays the role of remote control effect.

To check this hypothesis, a special computerized unit was created. It represents a double-chamber system; one chamber isolated from an environment houses a biological substance (a source-object), the other houses the receiver-object, which is a biological substance whose properties should be changed with the remote effect arising at a moment of breakdown of the source object structure, e.g., by heating. The unit design precludes the energy transfer from source-object to receiver-object.

The studies were performed together with the research organizations leading in microbiology (Research Institute for Transplantology and Bioartificial Organs, JSC "Biohimmash", Closed-JSC "Leytran"). The experiments were implemented according to the same technique: two samples of cell cultures (control and experimental) were formed the same way. The conditions ensuring their growth, storage and transportation were identical. The only difference was that the experimental sample was subjected to processing in the unit.

**1. Beta-cell experiments.** Here insulin producing culture of  $\beta$ -cells was used as receiver object. The remote effect was formed during breakdown (combustion) of source object structure – a substance containing hepatocytes and pancreocytes. The measured values are amount of insulin generated by  $\beta$ -cells before processing in the unit, two hours after single- or double- processing and in controlled samples.

The processing has obvious stimulating effect on the  $\beta$ -cell culture increasing the amount of insulin generated by cells compared to initial values and controlled samples on the average of approximately by 30% at single effect and by 44% – at double effect.

**2. Experiment with Leydig cells.** Leydig cell culture of newborn pigs was used. The experimental sample was subjected to the fivefold effect in the unit; the remote effect formed at breakdown of testicles.

The following results were obtained: compared to the control one, the cell proliferation index in the processed sample turned out to be higher by 54%, and testosterone production was higher by 19%.

**3. Experiment with human stem cells.** Here, human mesenchymal stem cells of postnatal period were used 30 days after culturing started the experimental part was subject to the remote effect formed in the unit at a moment of source object cardiomyocytes destruction caused by the breakdown factor.

Significant increase of main characteristics of cell vital activity in the experimental sample compared to the control one was recorded: proliferation index – on the average by 21%, cardiomyocyte percent of total cell value – by 82%.

As a source producing the remote effect during its destruction, those biosubstances were used which were directly related to properties of the cell culture under effect and, theoretically, they can have a stimulating nature in direction needed for user (hepatocytes and pancreocytes for  $\beta$ -cells, testicles – for Leydig cells, cardiomyocytes – for human mesenchymal stem cells). Characteristically, when experimenting with the stem cells, the directional effect on the cardiomyocyte destruction resulted in significant increase of percentage of just cardiomyocytes, and not other cells, presented in the initial culture in approximately equal proportion.

Subsequent broad confirmation of the discovered phenomenon of the remote control effect and revealing its physical carrier can open a new perspective direction in the molecular biology representing essential scientific and practical interest.

## **КОНСТРУИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ЛИПИД-ДНК НА ОСНОВЕ КАТИОННОГО ПРОИЗВОДНОГО ХОЛЕСТЕРИНА**

*Алексеева А.С., Маслов М.А. \*, Болдырев И.А.*

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

\*Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: anna@lipids.ibch.ru

Комплексы липидов с ДНК могут быть использованы как инструмент генной терапии. В настоящее время развитие этого направления ограничено эффективностью имеющихся средств направленной доставки ДНК в клетки-мишени. Метод липофекции, основанный на использовании катионных липидов для создания системы доставки ДНК, имеет ряд преимуществ: молекулы ДНК, защищенные липидной оболочкой, не разрушаются в кровотоке, не инфекционны и не иммуногенны.

Конструирование комплексов, состоящих из ДНК, окруженных слоем катионных липидов и липидами, выполняющими функции защиты комплексов от иммунокомпетентных клеток за счет образования стерически-стабилизированной поверхности, является наиболее перспективным. Однако, существенное влияние на эффективность липофекции оказывают структура используемых липидов, состав липидной смеси и способ приготовления комплексов. Кроме того, комплексы могут иметь различную структуру. В литературе имеются сведения о комплексах в виде ДНК, связанной с поверхностью катионных липосом, либо заключенной во внутренний водный объем обращенной гексагональной фазы, либо связанной между слоями ламеллярной фазы и др. Такая неоднозначность структуры не дает возможности ни оптимизировать технологию получения комплексов, ни повлиять на их устойчивость и эффективность доставки ДНК.

На основе синтезированного нами ранее катионного производного холестерина – N-[4-холест-5-ен-3 $\beta$ -илоксикарбонил)бутил] пиридиний бромида в сочетании со вспомогательными липидами нами была отработана технология приготовления комплексов липидов с ДНК, характеризующихся узким и регулируемым распределением по размерам. Размеры и структура комплексов исследованы с помощью лазерного динамического светорассеяния и электронной микроскопии. Слияние комплексов с липосомами изучено с помощью индуктивно-резонансного переноса энергии.

Работа поддержана РФФИ, грант № 09-03-00874-а.

## DESIGNING OF LIPID-DNA COMPLEXES BASED ON CATIONIC DERIVATIVE OF CHOLESTEROL

*Alekseeva A.S., Maslov M.A.\*, Boldyrev I.A.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

\*Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow, Russia

E-mail: [anna@lipids.ibch.ru](mailto:anna@lipids.ibch.ru)

Lipid-DNA complexes can be used as the instrument of gene therapy. Evolution of this field is now restricted by existing techniques of targeted delivery of DNA to cells. Lipofection, which is a cationic lipid based transfection technology, has a number of advantages: DNA molecules, covered by lipid shield, are protected from decomposition in blood flow; lipid-DNA complexes are neither infectious nor immunogenic. Perspective structure of such complexes includes DNA surrounded with a cationic lipid layer and a second lipid layer which provides a steric barrier to interaction with biological fluid components and prevents uptake of complexes by cells of the RES. However, lipofection efficiency depends on structure of lipids, composition of lipid mixture and a method of preparation. Moreover, structures of complexes can be different. Possible structures include DNA bound on the surface of cationic liposomes, as well as encapsulated in internal water volume of inverted hexagonal phase or fixed between layers of lamellar phase, etc. This uncertainty restricts further development of the methodology. It is difficult to optimize stability of the complexes and efficiency of DNA delivery.

Previously we have synthesized cationic derivative of cholesterol – N-[4-(cholest-5-en-3 $\beta$ -yloxy carbonyl)butyl] peridinium bromide. Using these lipid and lipid-helpers we have developed a technique of lipid/DNA complexes preparation. Resulting cationic cholesterol complexes have narrow and adjustable size distribution. The size and structure of these complexes have been studied using dynamic laser light scattering and electron microscopy. Interactions with liposomes have been studied using FRET (fluorescence resonance energy transfer).

This work was financially supported by RFBR, grant 09-03-00874-a.

## ВЛИЯНИЕ МЕЛАФЕНА НА СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ P53 И BCL-2 В КЛЕТКАХ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

*Албантова А.А., Миль Е.М.\*, Бинюков В.И.\*, Алексеева О.М.\*, Фаттахов С.Г.\*\*\*, Коновалов А.И.\*\*\*, Бурлакова Е.Б.\**

Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

\*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

E-mail: [olgavek@yandex.ru](mailto:olgavek@yandex.ru)

Факс: (495) 137-41-01; тел.: (495) 939-74-09

\*\*Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова РАН, Казань, Россия

Мелафен (производное меламина и фосфиновой кислоты) – синтетический регулятор роста растений, действующий в сверхмалых дозах, повышающий урожайность и стрессоустойчивость. В настоящее время изучается его биологическая активность и исследуется его действие на клетки животных – асцитные клетки на 7-е сутки развития карциномы Эрлиха (АКЭ).

Как было показано ранее, мелафен влияет на две мишени на поверхности клеток – на пуринорецепторы P<sub>Y2</sub> и Ca<sup>2+</sup>-проводящие каналы емкостного входа (CRAC), значительно снижая их активность. Ca<sup>2+</sup>-Сигнальная система клеток АКЭ подвергается угнетению даже при концентрациях 10<sup>-10</sup>-10<sup>-11</sup> М. В то же время Ca<sup>2+</sup>-сигнальная система клеток оказывает влияние на кальций-связывающие белки ряда S100, которые связываются с белком p53, изменяя его транскрипционную активность, и тем самым, возможно, осуществляя пути трансдукции сигнала апоптоза. При этом, белок S100B может оказывать как протективный (в наномолярных концентрациях), так и дегенеративный или проапоптотический эффект (в микромолярных концентрациях).

Методом иммуноблоттинга было изучено влияние мелафена в низкой концентрации (10<sup>-10</sup> М) на содержание белка регулятора p53 и антиапоптотического белка Bcl-2 в клетках АКЭ в зависимости от продолжительности воздействия. Полученные данные показывают увеличение количества p53 и снижение Bcl-2 через 1,5 часа после воздействия, в то время как через 0,5 часа существенных изменений не наблюдалось. По-видимому, наблюдаемые эффекты свидетельствуют о развитии апоптоза через 1,5 часа после воздействия мелафена. Это согласуется с тем фактом, что сверхмалые концентрации мелафена (10<sup>-12</sup>, 10<sup>-13</sup> М) стимулируют передачу сигнала, усиливая первичное освобождение ионов Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных Ca<sup>2+</sup>-депо, в то время как при концентрации 10<sup>-10</sup> М и выше препарат начинает угнетать систему Ca<sup>2+</sup>-ответа. Предполагаются возможные механизмы действия мелафена.



## INFLUENCE OF MELAFEN ON THE CONTENT OF P53 AND BCL-2 PROTEINS IN THE EHRLICH ASCETIC CARCINOMA

*Albantova A.A., Mil E.M.\* , Binyukov V.I.\* , Alekseeva O.M.\* ,  
Fatahov S.G.\*\* , Konovalov A.I.\*\* , Burlakova E.B.\**

MPTI, Dolgoprudnyi, Russia

\*Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, Moscow, Russia

E-mail: olgavek@yandex.ru,

Fax (495 137-41-01; tel.: (495) 939-74-09

\*\*Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, Kazan Research Center RAS, Kazan, Russia

Melafen (derivative of melamine and phosphinic acid) – a synthetic growth factor of plants raising their productivity and stress stability, operating in super low doses. Now its biological activity is studying and its action on the cells of animals – ascetic cells on 7 days of development is investigated.

Earlier was shown melafen influence on two targets surfaces of cells simultaneously – on purinoreceptors PY2 and on Ca<sup>2+</sup>-release-activated Ca<sup>2+</sup>-channels (CRAC), considerably reducing their activity in therapeutical doses. The Ca<sup>2+</sup>-transduction system of animal cells – Ehrlich ascetic carcinoma is inhibited even at concentration of 10<sup>-10</sup>-10<sup>-11</sup> M. At that the Ca<sup>2+</sup>-transduction system of the cells have influence on calcium-binding proteins of S100 family which interacts with p53 and modulates its transcriptional activity and by that probably carry out of transduction paths of apoptosis. So proteins S100B can induce as protective (in nanomolar concentration) and also degenerative or proapoptotic effect (in micromolar concentration) because that the different ways in which S100 proteins modulate p53 function.

In work has been studied the influence of melafen in concentration of 10<sup>-10</sup> M on the content of the protein- regulator p53 and the antiapoptotic Bcl-2 protein in ascetic cells during the time by immunoblotting method . The obtained data shows increase of p53 and decrease Bcl-2 in 1,5 hours after influence, while through 0,5 hours no changes were observed. Apparently, these effects may be connected with the development of apoptosis in 1.5 hours after influence.

It agree with data that at super low concentrations of melafen (10<sup>-12</sup>, 10<sup>-13</sup> M) stimulated the signal transduction, increasing the Ca<sup>2+</sup>-releasing from intracellular Ca<sup>2+</sup>-store. But at the bigger concentrations melafen begin to depress the overall cell response. Possible mechanisms of action melafen are assumed.

## ПОЛИПЕПТИДНЫЕ МОДУЛЯТОРЫ TRPV1 РЕЦЕПТОРА ИЗ МОРСКОЙ АНЕМОНЫ *HETERACTIS CRISPA*

*Андреев Я.А., Козлов С.А., Гришин Е.В.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: ay@land.ru

Полипептидные модуляторы TRPV1 могут иметь важное значение для разработки новых анальгетических средств. По сравнению с низкомолекулярными аналогами они способны оказывать более специфичное терапевтическое воздействие и вызывать меньшее количество системных побочных эффектов. Кроме того, на их основе открывается возможность оптимизации структуры и, следовательно, биологических свойств молекулы путем мутагенеза.

Морские анемоны – одни из самых древнейших хищных животных. Они охотятся на мелких рыб, ракообразных и моллюсков, обездвиживая их при помощи стрекательных клеток (нематоцитов) щупалец, расположенных вокруг ротового отверстия. Из яда нематоцитов анемон было выделено большое количество биологически активных молекул: мембраноактивные пептиды и белки, нейротоксины (блокаторы Na<sup>+</sup>- и K<sup>+</sup>-каналов), ингибиторы сериновых протеиназ.

Помимо нейтральных и токсичных компонентов анемоны продуцируют полипептидные компоненты с анальгетическим действием. Такой эффект достигается за счет блокирования или изменения характеристик проведения сигнала (модулирование действия) ряда нейрональных рецепторов.

Целенаправленные исследования по поиску природных анальгетических соединений позволили нам комбинацией различных хроматографических методов выделить из экстракта нематоцитов морской анемоны *Heteractis crispa* 3 активных полипептида АРНС1, АРНС2, АРНС3. Эти полипептиды обладают различной способностью ингибировать в экспериментах *in vitro* один из основных рецепторов и интеграторов болевых стимулов TRPV1. Эффективность их анальгетического действия на животных моделях была также различна. Полученные данные позволяют предположить, что полипептиды АРНС1-3 способны эффективно ингибировать TRPV1 каналы *in vivo*, а также могут быть использованы в качестве основы для создания новых селективных анальгетических лекарственных препаратов. Анализ пространственной структуры полипептидов АРНС1-3 и неактивных гомологов из экстракта нематоцитов *H. crispa* позволяет предположить функционально важные остатки, необходимые для взаимодействия с TRPV1.

## POLYPEPTIDE MODULATORS OF TRPV1 RECEPTOR FROM SEA ANEMONE *HETERACTIS CRISPA*

Andreev Ya.A., Kozlov S.A., Grishin E.V.

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: ay@land.ru

Polypeptide modulators of TRPV1 receptor can have great value for analgesic drugs development. They could have more specific therapeutic action and less systemic side effects than small molecule antagonists. Moreover polypeptide molecule gives an opportunity for optimization of pharmacological properties by changing structure using mutagenesis.

Sea anemones are one of the oldest preying animals. Anemones prey for small fish, crustaceans and shellfishes using their tentacles that contain stinging cells (nematocysts). Venoms of nematocysts are well-known sources for the isolation of biologically active polypeptide molecules such as membrane active peptides and proteins, neurotoxins (Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>-channel blockers), serine protease inhibitors.

Beside of toxic and neutral components, anemones produce polypeptide components with analgesic action. This effect is a result of blocking or modulating (changing features of signal transduction) of neuronal receptors.

Searching of natural analgesic compounds resulted in isolation of 3 analgesic polypeptides (APHC1, APHC2, APHC3) from extract of sea anemone *Heteractis crispa*. These polypeptides have different ability to inhibit one of the main receptor and integrator of pain stimuli TRPV1. Their ability to produce analgesia *in vivo* models of pain is also different. Our data suggest that polypeptides APHC1-3 can efficiently inhibit TRPV1 *in vivo* and could be a base for new selective analgesic pharmaceuticals. Spatial structure analysis of APHC1-3 and neutral homologues from extract of *H. crispa* revealed potential residues necessary for TRPV1 binding.

## РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАЛИЧИЯ БЕЛКА СУРВИВИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

Антипова Н.В., Завалова Л.Л., Шахпаронов М.И.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: nadine.antipova@gmail.com

Тел.: (495) 330-64-56

Сурвивин экспрессируется в большинстве раковых опухолей и в эмбриональных клетках, но отсутствует в терминально дифференцированных клетках, за исключением тимуса, эндотелиальных клеток и нервных стволовых клеток при ангиогенезе. Показана экспрессия сурвивина при раке легкого, кишечника, желудка, пищевода, поджелудочной железы, печени, мочевого пузыря, матки, яичника, крупноклеточных не-Ходжкинских лимфомах, лейкомиях, нейробластомах, опухолях мозга, феохромоцитозе, саркомах, меланомах и т.д. Кроме того, экспрессия сурвивина была обнаружена в различных пренеопластических и доброкачественных опухолях, включая полипы кишечника, аденомы молочной железы, эпидермис атипичных кератиноцитов при болезни Боуэна, гипертрофический актинический кератоз. Это позволяет предположить, что экспрессия его возобновляется на ранних стадиях злокачественной трансформации или вследствие нарушения баланса между пролиферацией и клеточной смертью. Увеличение экспрессии в опухолях человека подтверждается полногеномными исследованиями. Высокий уровень экспрессии сурвивина в опухолях коррелируется с их прогрессией и считается негативным прогностическим фактором для некоторых опухолей. Например, было показано, что высокое содержание белка сурвивина ассоциировано с более агрессивным фенотипическим проявлением различных опухолей и с меньшей вероятностью выживания пациента [Dohi et al., 2004; Fortugno P. et al. 2002].

Клинические исследования выявили, что пациенты, раковые клетки которых имели повышенный уровень экспрессии гена BIRC5 (белок-сурвивин), были значительно устойчивее к химиотерапии [Altura R.A. et al., 2003]. Снижение уровня экспрессии этого белка в раковых опухолях приводит к увеличению апоптоза и остановке роста опухоли [Altieri D.C. et al., 2003].

В силу ярко выраженной дифференциальной экспрессии сурвивина между нормой и опухолью, этот белок служит опухолевым маркером. Повышенная экспрессия сурвивина приводит к прогрессированию раковых заболеваний, образованию опухолей, устойчивых еще и к радиотерапии. Сурвивин можно детектировать в опухолевых тканях иммунохимическими методами, что служит быстрым и удобным методом диагностики характера развивающейся опухоли.

Для диагностического определения белка сурвивина в различных образцах был получен рекомбинантный сурвивин и специфические моноклональные антитела к нему. В результате исследования разработан и проходит апробацию диагностический набор по определению сурвивина в различных биологических образцах методом ИФА.

## DEVELOPMENT OF DIAGNOSTICUM SYSTEM FOR DETECTION OF PROTEIN SURVIVIN IN BIOLOGICAL SAMPLES

*Antipova N.V., Zavalova L.L., Shahparonov M.I.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: nadine.antipova@gmail.com

Survivin expresses on the majority of tumor and embryonic cells but it is absent on terminally differentiated cells with the exception of thymus, endothelial cells and founder nerve cells in angiogenesis. Survivin expression has been demonstrated for lung cancer, intestine cancer, stomach cancer, esophagus cancer, pancreas cancer, liver cancer, urocyt cancer, womb cancer, ovarian carcinoma, microcellular (none-Hodgkin) lymphoma, leukemia, neuroblastoma, tumors of brain, pheochromocytoma, sarcoma, melanoma, etc. Survivin expression has been also detected for different pre-neoplastic and benign tumors, including intestine polypus, breast adenoma, Bowen's disease, hypertrophic actinic keratosis. It allows suggesting that survivin expression renewed at early stages of malignant transformation or due to breaking of balance between proliferation and cell death. Increasing of survivin expression in human tumors is confirmed by full genomic investigations. High level of survivin expression in tumors correlates with their progression and is considered as negative prognostic factor for some tumors. For example, it has been demonstrated that high content of survivin protein associates with more aggressive phenotypical manifestation of different tumors and lower variety of patient survival [Dohi et al., 2004; Fortugno P. et al. 2002].

It has been demonstrated in clinical trials that patients with increased level of BIRC5 (survivin protein) gene expression cancer cells were considerably stable to chemotherapy [Altieri D.C. et al., 2003].

Due to highly marked differential expression of survivin between norm and tumor this protein serves as tumor's marker. Increased expression of survivin brings to cancer diseases progress, formation of tumors stable to radiotherapy. survivin can be detected in tumor tissues by immunochemistry methods as fast and convenient methods for diagnosis of progressing tumor character.

Recombinant survivin and specific monoclonal antibodies have been obtained for diagnostic determination of survivin protein in different samples. As a result of investigation diagnosticum for survivin detection in different biological samples by solid phase ELISA has been worked out and is the process of approbation.

## ПОИСК МАРКЕРОВ АУТОИММУННОГО ПРОЦЕССА У МЫШЕЙ С ПОМОЩЬЮ ПЕПТИДНО-БЕЛКОВОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ СЫВОРОТОК КРОВИ

*Арапиди Г.П., Красильщикова М.С., Зацепина О.В., Зиганшин Р.Х.*

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

E-mail: msk@ibch.ru

Факс/тел.: (495) 727-38-61

Аутоиммунные болезни относятся к одним из наиболее распространенных заболеваний в мире и занимают третье место по частоте встречаемости, проявляясь у 5-8% населения. К факторам, индуцирующим развитие этих заболеваний, относятся генетическая предрасположенность, инфекция и ксенобиотики, среди которых особое место занимают тяжелые металлы и их соединения. Инъекции сублетальных доз хлорида ртути (1,6 мг/кг) мышам линии SJL/J приводят к развитию аутоиммунного процесса, характеризующегося появлением в крови аутоантител к белку ядрышка фибрилларину (34 кДа). Наличие в крови аутоантител к фибрилларину характерно для ряда аутоиммунных заболеваний человека и коррелируется с плохими прогнозами. Существуют также литературные данные, хотя и весьма ограниченные, об обнаружении аутоантител к фибрилларину у людей с определенным генотипом, подвергающихся систематическому воздействию ртути. В настоящее время механизм возникновения аутоантител к фибрилларину под действием хлорида ртути неизвестен. Одна из гипотез – изменение под действием ртути конформации фибрилларина, имеющего в своем составе аминокислоты, богатые цистеином. Вследствие "неправильного" протеолиза измененного ртутью белка в организме появляются пептиды, нетипичные для протеолиза "нормального" фибрилларина. Эти пептиды узнаются клетками иммунной системы, признаются "чужими" и происходит выработка антител к целому белку. В нашей работе мы провели пептидно-белковое профилирование сывороток крови с использованием времяпролетной МАЛДИ масс-спектрометрии с целью поиска характерных для индуцированного хлоридом ртути аутоиммунного процесса пептидно-белковых паттернов сывороток крови мышей. Было установлено, что, уже начиная с третьей недели после инъекции доз хлорида ртути мышам, возникают изменения пептидно-белкового состава сыворотки крови, сопряженные с появлением у животных аутоантител к фибрилларину.

## SEARCH FOR MARKERS OF AUTOIMMUNITY IN MICE USING MALDI TOF MS PROFILING OF SERA

*Arapidi G.P., Krasilshchikova M.S., Zatsepina O.V., Ziganshin R.H.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: msk@ibch.ru

Fax/tel.: (495) 727-38-61

Autoimmune diseases affect approximately 5-8% of the human population. It has been proposed that predisposing genetics, infections and xenobiotics, for example heavy metals, are among the crucial factors responsible for the autoimmunity induction. Sublethal doses (1,6 mg/kg) of mercuric chloride administered to SJL/J mice induce the production of the autoantibodies targeting the nucleolar protein fibrillarin (34 kDa). Antifibrillarin autoantibodies found in the autoimmune patients correlates with poor prognosis. Some, but rather limited data, have shown that antifibrillarin autoantibodies were present in the sera of people, chronically exposed to mercury. The mechanism of mercury induced autoantibody production is unknown. The direct alteration of fibrillarin, rich in cysteins, with mercury - is one of the existing hypothesis. The abnormal proteolysis of altered fibrillarin leads to the production of "cryptic" peptides, atypical for the proteolysis of normal fibrillarin. These "cryptic" peptides may be recognized as non-self by the immune system resulting in development of autoantibodies targeting native fibrillarin.

To find peptide-protein patterns specific for the mercury-induced autoimmunity in mice we have conducted the peptide-protein profiling of the blood sera of the autoimmune mice using the time-of-flight MALDI MS. We have observed changes in the peptide-protein composition of the autoimmune sera possibly associated with the appearance of anti-fibrillarin autoantibodies.

## МЕХАНИЗМ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ФИЛЬТР-ЭЛЕМЕНТОВ ИЗ ПОРИСТОГО ПОЛИЭТИЛЕНА, МОДИФИЦИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА

*Артамонов А.А., Цетлин В.В., Ревина А.А.\*, Ермаков В.И.\*\**

Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

\*Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия

\*\*Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

На сегодняшний день существует мнение, что действие наночастиц (НЧ) серебра связано с переходом их в ионное состояние и растворением в воде, но, по данным спектроскопии, растворения НЧ не обнаруживается для модифицированных наночастицами серебра поверхностей. По нашим представлениям, основным фактором, оказывающим антибактериальное действие, является возникающая контактная разность потенциалов на поверхности этих частиц. Если учесть, что микроострие накапливает заряд, при этом вокруг него электростатическое поле усиливается в несколько раз, то можно предположить, что антимикробное воздействие оказывают именно электрические силы, возникающие между бактерией и НЧ, что может вызывать электропорацию и лизис мембран. Еще один фактор – возникновение выделенных направлений аккумуляции, что позволяет концентрировать электромагнитную энергию в широком диапазоне длин волн непосредственно около НЧ. Это предположение было проверено на экспериментальной установке, представленной в работе [Цетлин В.В., Артамонов А.А., Бондаренко В.А., Федотова И.В. О временных вариациях токов проводимости воды в электрохимической ячейке. Солнечно-земная физика. 2008. Т.2. С.361-363]. Экспериментально показано, что наномодификация внутренней поверхности электрохимической ячейки приводит к изменению контактной разности потенциалов в 2,5 раза.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 09-08-00758.

**THE MECHANISM OF BIOLOGICAL ACTION OF THE FILTER-ELEMENTS FROM POROUS POLYETHYLENE MODIFIED NANO-PARTICLES SILVER**

*Artamonov A.A., Revina A.A., Tsetlin V.V.\*, Ermakov V.I.\*\**

Institute of Medical and Biological Problems RAS, Moscow, Russia

\*Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry RAS, Moscow, Russia

\*\*Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

For today there is an opinion, that action nano-particle of silver binded with their transition in an ionic condition and dissolution in water, but according to spectroscopy LF dissolution is not found out for modified nano-particle silver of surfaces. On our representations, a major factor. Having antibacterial an effect, is an arising contact potential difference on a surface of these particles. If to consider, that the microedge accumulates a charge, thus round it the electrostatic field amplifies several times it is possible to assume, that antimicrobial influence is rendered by the electric forces arising between a bacterium and nano-particle that can cause destruction under the influence of electric field and lysis membranes. One more factor – occurrence of the allocated directions of accumulation that allows to concentrate electromagnetic energy in a wide range of lengths of waves directly about nano-particles. This assumption has been checked up on experimental installation presented in work [Tsetlin V.V., Artamonov A.A., Bondarenko V. A., Fedotova I.V. About time variations of currents of conductivity of water in an electrochemical cell. Sun-terrestrial physics. 2008. V.2. P.361-363]. It is experimentally shown, that nano-updating of an internal surface of an electrochemical cell leads to change of a contact potential difference in 2,5 times.

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТНЫХ ЭФФЕКТОВ ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ПИЩЕВОГО СЫРЬЯ ПРИ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОЙ АГРЕГАЦИИ И ИНАКТИВАЦИИ МОДЕЛЬНЫХ БЕЛКОВЫХ СУБСТРАТОВ**

*Артемова Н.В., Бумагина З.М., Гурвиц Б.Я.*

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

E-mail: ximikk@gmail.com

Факс: (495) 954-27-32; тел.: (495) 954-30-66

Представлены новые данные, касающиеся активности опиоидных пептидов. Широкий спектр физиологических функций коротких пептидных фрагментов белков пищи, не связанных с проявлением их опиоидных или пищевых свойств, вызывает интерес к исследованию способности "неклассических" экзогенных опиоидных пептидов, рубисколина-5 (Туг-Pro-Leu-Asp-Leu) и экзорфина С (Туг-Pro-Ile-Ser-Leu), связываться также с развернутыми белками, предотвращать их стресс-индуцированную необратимую агрегацию и инактивацию и поддерживать их в растворимом состоянии. Эти пептиды проявляют устойчивость к ограниченному протеолизу и способны накапливаться в крови и различных тканях в значительных количествах. Исследовали две модельные системы: агрегацию альфа-лактальбумина (ЛА) из коровьего молока, индуцированную под действием дитиотреитола, и агрегацию и инактивацию карбоксиангидразы (КА) быка в процессе ее рефолдинга после снятия денатурирующего воздействия гуанидингидрохлорида. С использованием методов динамического лазерного светорассеяния и турбидиметрии продемонстрировано концентрационно-зависимое подавление интенсивности светорассеяния аморфных агрегатов ЛА в присутствии синтетических пептидов и перераспределение популяций наночастиц с образованием агрегатов с меньшей величиной гидродинамического радиуса по сравнению с контролем, а также ускорение реактивации КА и увеличение выхода растворимого белка. Данные триптофановой флуоресценции и кругового дихроизма свидетельствуют о взаимодействии между пептидом и белком. Предположено, что комплекс белок – пептид лежит в основе проявления исследуемыми опиоидными пептидами различных биологических функций.

Работа поддержана программой Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" и грантом РФФИ 08-04-00666-а.



**MOLECULAR MECHANISMS OF PROTECTIVE EFFECTS OF FOOD-DERIVED OPIOID PEPTIDES IN STRESS-INDUCED AGGREGATION AND INACTIVATION OF MODEL PROTEIN SUBSTRATES**

*Artemova N.V., Bumagina Z.M., Gurvits B.Ya.*

A.N. Bach Institute of Biochemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: ximikk@gmail.com

Fax: (495) 954-27-32; tel.: (495) 954-30-66

A new view of the opioid peptides is presented. The activity of food-derived small opioid peptides having many physiological functions beyond the opioid-like activity or the nutritional

requirement, as a result of interaction with a wide variety of proteins, resistance to partial proteolysis and accumulation in blood and tissues in large quantities prompted us to examine whether the "nonclassical" exogenous opioid peptides, rubiscolin-5 (Tyr-Pro-Leu-Asp-Leu) and exorphin C (Tyr-Pro-Ile-Ser-Leu) can also bind to partly unfolded stressed proteins to prevent their irreversible aggregation and inactivation and keep them soluble. To address this concept, we investigated two model systems: the dithiothreitol-induced aggregation of alpha-lactalbumin (LA) and aggregation and inactivation of bovine carbonic anhydrase (CA) in the process of its refolding after removal of stress conditions. Using dynamic light scattering and turbidimetry we have demonstrated the concentration-dependent suppression of light scattering intensity of the amorphous aggregates of LA in the presence of the synthetic peptides, the populations of nanoparticles with higher hydrodynamic radii being shifted to the lower ones. The presence of the peptides in the refolding solution was shown to promote reactivation of CA and enhance the yield of soluble protein. Results of intrinsic tryptophan fluorescence and circular dichroism measurements revealed the peptide - protein interaction suggesting that the complex could be involved in various biological activities of the peptides.

The research is supported by the grant from the Presidium of the Russian Academy of Sciences, Program "Molecular and Cell Biology" and RFBR grant 08-04-00666-a.

**ОПТИМИЗАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА LIF (LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR)**

*Базалий А.В., Рымарь С.Е.*

Институт молекулярной биологии и генетики НАНУ, Киев, Украина

E-mail: bazalii\_andrii@mail.ru

Тел.: 8(044) 526-55-96

Цитокины – это большая и разнообразная группа белков, которые являются белками-посредниками, принимающими участие в межклеточной передаче сигналов и запуске сигнальных каскадов внутри клетки. Одним из таких цитокинов является LIF (Leukemia inhibitory factor). LIF регулирует множество биологических функций, в частности, контролирует иммунную систему, является ключевым фактором в имплантации бластоцисты у млекопитающих, влияет на гемопоэтическую систему, принимает участие в ответе организма на повреждение нервных волокон, усиливает выживание и пролиферацию мышечных клеток и т.д. Он обеспечивает состояние плюрипотентности мышинных эмбриональных стволовых клеток, играет важную роль в пролиферации различных стволовых клеток *in vitro*.

Исходя из важной биологической роли LIF, целью работы было клонирование гена LIF человека, получение рекомбинантного белка в клетках *E. coli* и его очистка. С помощью RT-PCR на матрице мРНК плаценты была получена кДНК, кодирующая зрелый белок. Последовательность, кодирующая зрелый белок, была субклонирована в вектор экспрессии pET24. Экспрессия полученной плазмиды приводила к синтезу рекомбинантного белка с молекулярной массой приблизительно 20 кДа. Оптимизация экспрессии LIF привела к выходу белка в 100-120 мг в литре культуры. Для дополнительного повышения уровня экспрессии рекомбинантного LIF на 5'-конце кДНК, кодирующей LIF, была сделана замена нуклеотидов в шести кодонах с целью адаптации матрицы к изоакцепторному спектру тРНК *E. coli*, которая привела к повышению уровня экспрессии на 25%. Были подобраны условия очистки телец включения, содержащих рекомбинантный LIF, в результате чего степень очистки составила 50%. При помощи ионообменной хроматографии растворенный белок в аналитических количествах был очищен до 95% чистоты. Биологическая активность белка была проверена на клетках мышинной миелоидной лейкемической линии M1. Показано, что полученный нами рекомбинантный белок приводит к дифференцировке клеток линии M1.

Таким образом, нами получен продуцент рекомбинантного белка LIF человека. Максимальный уровень экспрессии составляет 170-180 мг/л культуры.

## OPTIMIZATION OF EXPRESSION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT PROTEIN LIF (LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR)

***Bazalii A.V., Rymar S.E.***

Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU, Kiev, Ukraine

E-mail: bazalii\_andrii@mail.ru

Tel.: 8(044) 526-55-96

Cytokines are a various and large group of proteins, which are protein messengers and participate in intercellular signaling and the intracellular signaling pathways. One of the pleiotropic cytokines is leukemia inhibitory factor (LIF). LIF regulates a lot of biological functions and in particular controls immune system. It is a crucial factor in mammalian blastocyst implantation. LIF is involved in pituitary development, cell proliferation, and tumor formation. It influences on hemopoietic system, participates in organism response on injure of nerves, improves the self-renewal and muscle cells proliferation and so on. LIF is a factor which maintains a pluripotency of murine embryonic stem cells and plays an important role in proliferation of different stem cells *in vitro*.

Starting from important biological role of LIF the aim of our study were a cloning of LIF gene, obtaining of recombinant proteins in *E. coli* cells and its purification. During our investigation cDNA encoding mature protein was obtained on human placenta mRNA by using RT-PCR.

Sequence which encodes mature protein was subcloned into pET24 expression vector. *E. coli* strain BL21(DE3)RP were transformed by obtained recombinant plasmid. Induction by IPTG (isopropyl-D-thiogalactopyranoside) led to synthesis of recombinant protein whose molecular mass was 20 kDa approximately. Selection of respective cultural mediums and induction conditions resulted production of protein in concentration 100-120 mg/l of culture.

Nucleotides of six codons on 5'-terminal cDNA which encodes LIF were substituted in order to adapt mRNA to isoacceptor spectrum of *E. coli* tRNAs for additional increasing of expression level of recombinant LIF. Substitution of nucleotides resulted in increasing of expression level by 25%. Inclusion bodies were purified using 1% Triton X-100 and 6M urea. The dissolved protein was purified in analytical quantity (95%) using ion exchange chromatography. Biological activity of protein was tested using murine myeloid cell line M1. Our investigation showed that obtained recombinant protein resulted in M1 cells differentiation.

Thus, first in Ukraine human LIF gene was cloned and *E. coli* strain producer of human recombinant protein LIF was obtained. Its expression was optimized. Maximum level of expression was 170-180 mg/l.

## ОТ НАУЧНОЙ РАЗРАБОТКИ ДО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

***Баирамашвили Д.И.***

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: bdi@kou.ibch.ru

В Российской Федерации оказалась не реализованной стандартная для зарубежного опыта модель разработки лекарственных средств с последующим их производством, основанная на передаче/продаже результатов научного исследования в "start up"-компанию. "Start up" занимается коммерциализацией продукта с продажей и правом использования компаниями "Бигфармы", которые таким образом финансируют всю цепочку. Отсутствие подобной схемы и разрушение старой системы (академические НИИ – отраслевые НИИ – фармацевтические заводы) связаны, в первую очередь, с не очень четкой государственной политикой в области развития фармпромышленности.

Принятие концепции развития отрасли "Фарма-2020" позволяет надеяться на позитивные изменения и востребованность существующего опыта создания и внедрения в производство биофармацевтических лекарственных средств (ЛС) на Опытном биотехнологическом производстве ИБХ РАН. Специфика Биофармы дает возможность выделить производство активной фармацевтической субстанции (АФС) в отдельную технологическую бизнес-единицу. Конечное ЛС (готовая лекарственная форма – ГЛФ) может выпускаться любым фармацевтическим предприятием. Наше подразделение имеет: лицензию на производство ЛС; аккредитованную контрольно-аналитическую лабораторию; опыт регистрации ЛС; алгоритм оформления интеллектуальной собственности, квалифицированных специалистов – технологов; опыт расчета экономической эффективности и проектирования. Используя существующий базис, разумной представляется следующая последовательность работы:

- маркетинговая экспертная оценка научной разработки;
- оценка возможности патентования результатов научной разработки;
- оценка возможности регистрации ЛС;
- технологическая возможность реализации;
- расчет экономической эффективности при внедрении в производство.

На существующих реализованных и текущих проектах демонстрируется эффективность предложенной концепции.

## FROM SCIENTIFIC RESEARCH TO A DRUG PREPARATION

*Bairamashvili D.I.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: bdi@kou.ibch.ru

The scheme of the development of pharmaceuticals with their subsequent production based on the handover/ selling of scientific research results to a startup company which is conventional for a foreign practice remains unrealized in Russian Federation. A startup company deals with the commercialization of a product together with selling and the right to use by Bigpharma companies which therefore finance the whole chain. The absence of such a scheme and the destruction of the old one (academic research institutes – industry research centers – pharmaceutical plants) are connected primarily with an indistinct state policy in the field of the pharmaceutical industry.

The acceptance of the branch development concept "Pharma 2020" holds out a hope of positive changes and the state of being in demand of the existing experience of the creation and manufacturing application of biotechnological medicinal products (MP) at the place of Experimental Biotechnological production of IBCh RAS. The specificity of Biopharma offers a logical opportunity to single out the production of the Active Pharmaceutical Substance (APS) as a separate technological business unit. Of course medicinal products can be manufactured by any pharmaceutical company. Our division has: a medicinal product production certificate; an accredited analytical laboratory; experience in medicinal product registration; arrangements concerning intellectual property, highly-qualified specialists – production engineers; the experience in economical efficiency evaluation and engineering. And using the existing basis the following model appears to be rational:

- marketing expert evaluation of a scientific research result;
- the estimation of the possibility of scientific research patenting;
- the evaluation of the possibility of medicinal product registration;
- technological possibility of realization;
- economical efficiency evaluation during manufacturing application

Furthermore, the efficiency of the suggested concept is shown by the implemented and current projects.

## БЕЛОК НОГГИН2 – СЕКРЕТИРУЕМЫЙ ИНГИБИТОР Smad2-ЗАВИСИМОГО TGF-beta СИГНАЛЬНОГО КАСКАДА РЕГУЛИРУЕТ РАННЕЕ РАЗВИТИЕ ПЕРЕДНЕГО МОЗГА

*Байрамов А.В., Ерошкин Ф.М., Мартынова Н.Ю., Ермакова Г.В., Соловьева Е.А., Серебрякова М.В., Зарайский А.Г.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: andrbayr@gmail.com

Известный эмбриональный индуктор ноггин1 играет ключевую роль в закладке и формировании нервной системы позвоночных, а также в широком спектре других онтогенетических процессов, в частности, в дифференцировке скелетных мышц, развитии суставов, черепных швов, волосяных луковиц и кровеносных сосудов. Было установлено, что в основе действия белка ноггин1 лежит его способность связывать и инактивировать молекулы BMP (bone morphogenetic proteins) – ростовых факторов из суперсемейства TGF-beta. Кроме "классического" белка ноггин1 (ранее – ноггин) недавно были открыты еще две группы ноггин белков позвоночных – ноггин2 и ноггин4. Отличия аминокислотных последовательностей и экспрессии ноггин1, ноггин2 и ноггин4 указывают на возможные различия биологических функций этих белков.

На ранних стадиях развития шпорцевой лягушки ген ноггин2 экспрессируется в области зачатка будущего переднего мозга, где он, подобно ноггин1, может ингибировать Smad1-зависимый (BMP) TGF-beta сигнальный каскад. Нами показано, что, в отличие от белка ноггин1, ноггин2 обладает способностью связывать молекулы белка activinB и подавлять активность Smad2-зависимого (nodal/activin) сигнального каскада. Это подтверждается способностью ноггин2 подавлять фосфорилирование молекул Smad2, участвующих во внутриклеточной активации данного каскада, ингибировать экспрессию активин-зависимого люциферазного репортера, а также экспрессию эндогенной мишени nodal/activin сигнального каскада – гена brachyury. Мы показали, что данное свойство ноггин2 играет важную роль в развитии переднего мозга. Так, экспериментальное подавление трансляции ноггин2 приводит к нарушениям развития головных структур зародышей. С другой стороны, эктопическая сверхэкспрессия ноггин2 вызывает формирование дополнительных переднеголовных структур, включая передний мозг и глаза. В то же время, повышение уровня экспрессии activinB в передней части нервной пластинки на ранних стадиях развития приводит к редукции головного отдела зародышей. При этом направленная экспериментальная экспрессия ноггин2 в той же области нормализует развитие головных структур у трансгенных по activinB зародышей.

Полученные данные впервые показывают, что подавление сигнала activinB белком ноггин2 в передней части нервной пластинки необходимо для нормального развития переднеголовных структур.

## NOGGIN2 – SECRETED INHIBITOR OF Smad2 DEPENDENT TGF-beta SIGNALING PATHWAY THAT REGULATES THE EARLY FOREBRAIN DEVELOPMENT

*Bayramov A.V., Eroshkin F.M., Martynova N.Yu., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Serebryakova M.V., Zاراisky A.G.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: andrbayr@gmail.com

Noggin1 is a famous embryonic neural inducer that plays a key role as in formation of neural system of Vertebrates as in many others ontogenetic processes like differentiation of skeletal muscles, development of joints, cranial sutures, hair bulbs and blood vessels. It has been established that noggin1 can bind and inactivate molecules of BMP (bone morphogenetic proteins) – growth factors from TGF-beta superfamily.

Besides "classical" noggin1, two other groups of noggin proteins, noggin2 and noggin4, were recently identified in Vertebrates. Different expression patterns of noggin1, noggin2 and noggin4 in early embryonic development and their amino acid sequence distinctions suggest that these factors may execute different biological functions.

Noggin2 is specifically expressed at early stages of the *Xenopus* embryonic development in the rostral forebrain primordium where it presumably duplicates antagonizing effect of noggin1 on BMP signaling. Now we report that in addition to latter function noggin2 can also antagonize another TGF-beta factor, activinB, and down-regulate the activity of Smad2-dependent signaling pathway. It is confirmed by the ability of noggin2 to inhibit phosphorylation of Smad2, that acts as intracellular activator of this pathway, by its ability to inhibit expression of activin-response reporter and also by inhibition by noggin2 the expression of brachiury - intracellular target gene of Smad2-dependent pathway. We've shown that this property of noggin2 plays important role in the forebrain development. Down-regulation of noggin2 causes severe abnormalities of forehead development of *Xenopus* embryos. On the other hand, ectopical expression of noggin2 results in development of secondary forehead structures, including forebrain and eyes. At the same time, overexpression of activin in the anterior part of neural plate at early stages of development leads to the reduction of forehead structures, but direct experimental co-expression of noggin2 in the same area normalize the forehead development.

Consistently, the data received demonstrate for the first time that inhibition of activin signaling by noggin2 in cells of the anterior neural plate is essential for the forebrain development in normal embryogenesis.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРА МУТАЦИОННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ГЕНА 21-ГИДРОКСИЛАЗЫ У ПАЦИЕНТОК С ПРИЗНАКАМИ ГИПЕРАНДРОГЕНИИ

*Баранник А.П., Колтунова А.А. \*, Озолина Л.А. \*, Гузов И.И. \*\*, Патрушев Л.И.*

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

E-mail: abarannik@mx.ibch.ru

Тел.: (495) 429-86-10

\*Российский государственный медицинский университет, Москва, Россия

\*\*Центр иммунологии и репродукции, Москва, Россия

Врожденная гиперплазия коры надпочечников (ВГКН), тяжёлое заболевание с аутосомным рецессивным наследованием, вызванное нарушением биосинтеза жизненно-важных стероидных гормонов кортизола и альдостерона, относится к одному из наиболее распространенных генетических нарушений у человека. Более 90% всех случаев этого заболевания являются следствием уменьшения активности фермента 21-гидроксилазы P450c21 (21OH; EC 1.14.99.10), который превращает прогестерон в 11-дезоксикортикостерон, а также 17-ОН-прогестерон в 11-дезоксикортизол. Два главных последствия ВГКН – недостаток или отсутствие кортизола и альдостерона и избыточный синтез андрогенов в организме пациентов. 21-Гидроксилаза P450c21 является продуктом гена *CYP21*, который вместе с его псевдогеном *CYP21P* расположен на хромосоме 6p21.3 в области главного комплекса гистосовместимости (HLA) III класса. Последовательности *CYP21* и *CYP21P* гомологичны на 98% и 96% в интронах и экзонах, соответственно. Ген *CYP21* является одним из самых полиморфных в геноме человека. В настоящее время известно ~70 мутаций в гене *CYP21*, ассоциированных с ВГКН. Из них 9 точечных мутаций, а также делеции размером 26-32 т.п.н. происходят из псевдогена по механизму генной конверсии и в 90-95% случаях являются причиной заболевания. Высокая генетическая изменчивость гена *CYP21* затрудняет ДНК-диагностику ВГКН и проведение адекватного лечения.

Несмотря на большую актуальность проблемы, имеющиеся современные системы ДНК-диагностики ВГН характеризуются малой эффективностью. В соответствии с этим, целью нашего исследования была разработка новой, основанной на ПЦР в реальном времени, системы ДНК-диагностики для выявления вышеупомянутых наиболее часто встречающихся мутаций в гене *CYP21*, ассоциированных с исследуемым фенотипом. Кроме того, значительные усилия были направлены на поиск новых мутаций в этом гене. Главное преимущество аллель-специфической ПЦР в реальном времени – простота и точность прямого обнаружения точечных мутаций. Были разработаны новые аллель-специфические праймеры и зонды TaqMan для каждой из восьми наиболее часто встречающихся мутаций. Метод был вначале апробирован на искусственных ДНК-матрицах, содержащих анализируемые мутации, введенные направленным мутагенезом с помощью



ПЦР с перекрывающимися праймерами. Высокая эффективность разработанной системы была далее подтверждена на ДНК пациентов с клиническими и биохимическими признаками неклассической формы ВГКН. Всего исследовали ДНК 45 пациентов, 7 из которых не проявляли признаков заболевания (контрольная группа). С помощью данной системы были обнаружены два мутантных аллеля у двух разных индивидуумов: нонсенс-мутация, приводящая к обрыву полипептидной цепи в положении 318GlnX, и миссенс-мутация, сопровождающаяся заменой аминокислотного остатка V281L (последняя – в образце из контрольной группы). Наличие обеих мутаций было подтверждено рестриктазным анализом и прямым секвенированием гена. Прямое секвенирование гена *CYP21* в 10 образцах ДНК больных с наиболее выраженным фенотипом также выявило в четырёх образцах гетерозиготные мутации, расположенные в интронах *CYP21* и происходящие, по-видимому, из псевдогена. Их влияние на активность 21-гидроксилазы пока не ясно. Таким образом, среди исследованных генов *CYP21* у 45 пациентов найдено 7 мутантных. Крупные делеции гена, а также наличие химерной последовательности *CYP21P/CYP21* исследовали с помощью ПЦР в присутствии локус-специфических праймеров, фланкирующих место потенциальной геновой перестройки. В полученных продуктах ПЦР размером 8,5 т.п.н., далее инкубированных с рестриктазой *TaqI*, больших геновых перестроек не было обнаружено.

В целом, полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования разработанной новой системы обнаружения точечных мутаций в ДНК-диагностике ВГКН и дают возможность исследовать спектр мутационных изменений гена *CYP21*, ассоциированных с симптомами этого заболевания в российской популяции.

## ANALYSIS OF THE MUTATION SPECTRUM OF THE STEROID 21-HYDROXYLASE GENE IN PATIENTS WITH SIGNS OF THE EXCESSIVE ANDROGENS

*Barannik A.P., Koltunova A.A. \*, Ozolinya L.A. \*, Guzov I.I. \*\*, Patrushev L.I.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: abarannik@mx.ibch.ru

Tel.: (495) 429-86-10

\*Russian State Medical University, Moscow, Russia

\*\*Medical Center of Immunology and Reproduction, Moscow, Russia

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is one of the most common severe autosomal recessive hereditary disease. CAH is caused by impaired biosynthesis of cortisol and aldosterone, the steroid hormones necessary for survival. More 90% of CAH cases occur due to deficiency in steroid 21-hydroxylase (P-450C21, 21OH; EC 1.14.99.10) which is required for the conversion of progesterone to 11-deoxycorticosterone and 17-hydroxyprogesterone to 11-deoxycortisol. Two main consequences of CAH are deficiency or the lack of cortisol and aldosterone production and the excessive synthesis of androgens in patients. 21-Hydroxylase (P450c21) is the product of gene *CYP21A2*, which together with its nonfunctional pseudogene *CYP21P* are located on the chromosomal locus 6p21.3 of the HLA region class III of MCH. The primary structure of these two sequences are ~98% and ~96% homologous in exons and introns, respectively. The *CYP21* gene is considered to be one of the most polymorphic human genes. At present it is known ~70 mutations in the gene *CYP21* associated with CAH. There are 9 point mutations and also the large deletions of 26-32 kb in size, originated from the above mentioned pseudogene as a result of gene conversion lead to disease in 90-95% cases. The high genetic variability at *CYP21* locus complicates the DNA diagnostics and clinical adequate treatment. Despite large actuality of the problem, the modern systems of DNA diagnostics of CAH are low effective. In accordance with this, the goal of our study was the development of a new, real time PCR-based, system of DNA diagnostics for detection of the most frequently *CYP21* gene mutations, associated with the phenotype being investigated. Furthermore significant efforts were directed toward the search of possible new mutations in this gene. The principal advantage of allele-specific real time PCR is simplicity and the accuracy of the direct detection of point mutations. For each of the 8 most frequently occurred mutations new allele-specific primers and TaqMan probes were developed. Method was first tested thoroughly on the artificial DNA-matrices, which contain the analyzed mutations, introduced by the site-directed mutagenesis by overlap extension PCR. The high efficiency of this system was confirmed on DNA of patients with the clinical and biochemical manifestations of nonclassical form of CAH. The total of 45 patients was studied, 7 of them had no signs of disease (control group). This system revealed two mutant alleles in two different individuals: nonsense 318GlnX and missense V281L mutations (latter was found in the control group). The presence of both mutations was confirmed by restriction endonuclease analysis and by direct gene sequencing. Sequencing of *CYP21* gene in 10 DNA



samples of patients with the most explicit phenotypes also revealed the heterozygous mutations in four samples. They locate in the *CYP21* gene introns and originated apparently from the pseudogene. Their influence on the activity of 21-hydroxylase is not clear yet. Thus, among the investigated *CYP21* genes in 45 patients are found 7 mutant genes. The large deletions of gene, and the presence of fusion *CYP21P/CYP21* gene, investigated by the PCR with locus-specific primers, which flanked the region of potential genetic rearrangement. The further digestion of obtained PCR fragments of 8.5 kb by restriction endonuclease *TaqI* did not reveal large rearrangements.

Our results show the convenience of new system for detecting point mutations in DNA diagnostics of CAH, and also enable us to investigate the spectrum of mutations in the gene *CYP21*, which associated with CAH in the Russian population.

## **НОВЫЙ МЕТОД ШИРОКОМАСШТАБНОГО ПОИСКА ГИПОМЕТИЛИРОВАННЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОМА**

***Баскаев К.К., Буздин А.А.***

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: konstantinbaskaev@gmail.com  
Факс.тел.: (495) 727-38-63

Метилирование ДНК у млекопитающих заключается в присоединении метильной группы к цитозину в позиции С5 пиримидинового кольца в составе динуклеотидов CG. Метилирование остатков цитозина оказывает влияние на структурные характеристики ДНК и на транскрипцию как непосредственно через изменение эффективности связывания транскрипционных факторов с регуляторными участками ДНК, так и опосредованно через формирование протяжённых участков гетерохроматина.

Нами был предложен новый экспериментальный метод широкомасштабного поиска гипометилированных последовательностей генома (назван n-METR от англ. Non-Methylated Tag Recovery). Принцип метода состоит в следующем: геномная ДНК обрабатывается чувствительной к метилированию эндонуклеазой рестрикции (например, ферментом BspFNI, который расщепляет ДНК только по последовательности неметилированного тетра-нуклеотида CGCG с образованием тупых концов), к полученному рестриктиту лигируют супрессионные адапторы и затем производят ПЦР-амплификацию с праймерами к адапторам и последовательности геномных повторов Alu. Продукты ПЦР клонируют в *E. coli* и секвенируют. Дополнительной сложностью являлась низкая активность метил-чувствительной рестриктазы BspFNI при расщеплении геномной ДНК человека. Для повышения эффективности рестрикции в протокол метода нами была введена дополнительная стадия предварительной фрагментации геномной ДНК редкощеплящими эндонуклеазами рестрикции.

Полученные нами таким образом пилотные клонотеки, действительно, содержали последовательности, фланкированные участками узнавания рестриктазы BspFNI, с одной стороны, и геномным повтором Alu, с другой.

## NEW METOD OF LARGE-SCALE RECOVERY OF HYPOMETYLATED GENOMIC SEQUENSES

*Baskaev K.K., Buzdin A.A.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: konstantinbaskaev@gmail.com

Fax/tel.: (495) 727-38-63

Mechanism of DNA methylation in mammals includes joining of methyl groups to pyrimidine ring in position C5 of dinucleotide CG. Methylation exerts influence on structural characteristics of DNA and on DNA transcriptional peculiarities by changing transcriptional factor affinity to their target sites.

We propose a novel experimental technique for genome wide recovery of hypomethylated sequences called n-METR (Non-Methylated Tag Recovery). This technique includes the following major stages: digestion of genomic DNA with methyl-sensitive restriction endonuclease (for example, enzyme BspFNI which cuts DNA only on non-methylated tetranucleotide CGCG). Then suppression adapters are ligated to digested DNA and the ligation mixture is PCR-amplified with primers specific to adapter sequence and to widespread genomic repeat Alu. PCR products are further cloned in *E.coli* and sequenced. An additional obstacle was the low activity of many methyl-sensitive restriction endonucleases when digesting human genomic DNA. In order to increase the digestion efficiency, we included an additional step of fragmentation of initial genomic DNA with regular restriction endonucleases before BspFNI restriction. Genomic libraries obtained in such a way indeed had sequences flanked with BspFNI restriction site and Alu repeat at the opposite ends.

## АНАЛИЗ КАЧЕСТВА РОССИЙСКОГО ПРЕПАРАТА РАСТАН® В СРАВНЕНИИ С ЗАРУБЕЖНЫМИ АНАЛОГАМИ ГЕНОТРОПИН® И ХУМАТРОП® МЕТОДАМИ ЕВРОПЕЙСКОЙ ФАРМАКОПЕИ

*Кононова Н.В., Пучков И.А., Галкина Т.Г., Свешникова Е.В., Бобрускин А.И., Демин А.В., Баирамашвили Д.И.\**

Российская фармацевтическая компания ЗАО "Мастерклон", Москва, Россия

\*Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: alexeybob@rambler.ru

В настоящее время рекомбинантный гормон роста человека (рГРЧ) широко применяется в медицинской практике, в том числе в спортивной медицине. Главными требованиями, предъявляемыми в медицине к готовым лекарственным формам (ГЛФ), содержащим генно-инженерные белки, являются чистота и структурная целостность. Эти же параметры определяют и их конкурентоспособность.

Для молекулы рГРЧ известны модификации, содержащие как дезамидированные остатки аспарагина, возникающие в результате прямого гидролиза или гидролиза через циклический сукцинимидный интермедиат с формированием различного количества L-asp-hGH, L-iso-asp-hGH, D-asp-hGH, и D-iso-asp-hGH; окисленные до сульфоксида остатки метионина; межмолекулярные дисульфидные димеры; агрегаты и рГРЧ с неотщепленным N-концевым метионином. Присутствие в ГЛФ подобных "родственных" примесей, а также следовых количеств ДНК, белков *E. coli* и эндотоксинов снижает активность препарата и вызывает нежелательные побочные реакции у пациентов. Обнаружение примесей модифицированного рГРЧ в ГЛФ позволяет выявить некачественные препараты, а также служит маркером допинга при нелегальном использовании рГРЧ в спорте.

Целью данной работы являлось проведение сравнительного анализа российского препарата рекомбинантного гормона роста человека (Растан®, Фармстандарт) с двумя аналогами зарубежного производства, существующими на российском фармацевтическом рынке в настоящее время, такими как Генотропин® (Пфайзер Хелс, США) и Хуматроп® (Эли Лилли, США). Для оценки качества препаратов использовали методы Европейской фармакопеи 6.0.

В результате проведенных исследований было установлено, что все три препарата практически не отличались по содержанию в них следующих примесей: димеров, полимеров и рГРЧ с неотщепленным N-концевым метионином было менее 1%, эндотоксинов – менее 1 ЕЭ/мг белка, ДНК штамма-производителя – менее 5 пг/мг белка, а иммунореактивных белков штамма-производителя – менее 0,2 нг/мг белка. Однако, общее содержание дезамидированных форм и окисленных метионинов во всех трех препаратах было различным, но не превышало порогового значения – 6%. Так, в Генотропине® (Пфайзер Хелс, США) было отмечено наименьшее содержание дезамидов, которое составляло 1%. Хуматроп® (Эли Лилли, США) содержал около 6% указанных примесей, а Растан®, (Фармстандарт) – 2,5%. Также нами было определено, что все исследуемые препараты имеют идентичную полипептидную структуру.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что российский препарат Растан®, (Фармстандарт) не уступает по качеству своим импортным аналогам.

## COMPARATIVE QUALITY ANALYSIS OF THE RUSSIAN PREPARATION RASTAN® AND FOREIGN ANALOGUES LIKE GENOTROPIN® AND HUMATROP®

*Kononova N.V., Puchkov I.A., Galkina T.G., Sveshnikova E.V., Bobruskin A.I., Demin A.V., Bairamashvili D.I.\**

Russian pharmaceutical company ZAO "Masterclon", Moscow, Russia

\*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: alexeybob@rambler.ru

At present recombinant human growth hormone (rh-GH) widely applies both in medical practice and in sport medicine. Purity and structural integrity are the principal demands for prepared drug formulations (PDF) which contain recombinant proteins. Same parameters determine competitiveness of theirs.

For recombinant human growth hormone molecule have known such modifications like desamidated residues of Asn arising as a result of direct hydrolysis or of hydrolysis through cyclic succinimide intermediate with appearance different quantity of L-asp-hGH, L-iso-asp-hGH, D-asp-hGH, D-iso-asp-hGH, the methionine residues converted to sulfoxides, intermolecular disulfide dimers, aggregates and the non-segregated N-methionine rh-GH. The presence of similar "familiar" impurities in prepared drug formulations both like traces of DNA, *E.coli*-proteins and endotoxins decrease an activity of drug simultaneously causing unwanted secondary reactions testing in patients. Detection of impurities of modified rh-GH in prepared drug formulations allow to detect low-quality preparations as well as serves as marker of dope at illegal use of rh-GH in sport.

The intent of this work is the comparative analysis of Russian preparation rh-GH (Rastan®, Pharmstandard, Russia) with two foreign analogues existing in Russian pharmaceutical emporium like Genotropin® (Pfizer, USA) and Humatrop® (Eli Lilly, USA). For evaluation of drug quality had been used the methods of European Pharmacopoeia 6.0.

As a consequence of conducted researches was assigned all three drugs virtually hadn't differed by impurities content such as dimers, polymers, non-segregated N-Met rh-GH (was less than 1%), endotoxins (less than 1 EU/mg proteins), producer's culture DNA (less than 5 pg/mg proteins), producers culture immune-reactions proteins (less than 0,2 ng/mg proteins). However, desamide pattern's overall content as well as oxidized methionine's residues was differed in all three preparations but wasn't exceeded threshold value 6%. Then in Genotropin® (Pfizer, USA) was noticed the least desamide's substance what constituted 1%. Humatrop® (Eli Lilly, USA) contained about 6% of indicated impurities and Rastan® (Pharmstandard, Russia) – 2,5%. Also was evaluated all studied preparations have identical polypeptide structures.

Obtained results indicate that Russian preparation Rastan® (Pharmstandard, Russia) did not concede foreign analogues at quality.

## ТРИТЕВЯЯ ПЛАНИГРАФИЯ КАК МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАНООБЪЕКТОВ: ВИРУС ГРИППА А

*Богачева Е.Н., Шишков А.В., Баратова Л.А.\**

Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия

\*НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ

им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: ben@chph.ras.ru

Факс: (495) 137-83-18

В биологических системах функциональные свойства, как правило, реализуются надмолекулярными объектами наномасштабных размеров. Очевидно, что знание их пространственной организации имеет большое теоретическое и прикладное значение. Между тем, практически отсутствуют прямые методы получения информации о структуре такого рода объектов. Электронная микроскопия и криоэлектронная томография сегодня являются единственными методами исследования строения наномасштабных биообъектов, однако, их разрешающая способность (1-2 нм) недостаточна для выяснения тонких деталей структуры. Метод тритиевой планиграфии (ТП) может оказаться весьма эффективным средством получения информации как об общих чертах архитектуры частицы, так и о структуре входящих в ее состав молекулярных комплексов. Метод уже хорошо зарекомендовал себя при изучении структуры таких объектов, как рибосомы, нуклеосомы, растительные и животные вирусы и др.

В настоящей работе представлены результаты исследования вириона вируса гриппа А и пространственной структуры одного из важнейших вирусных белков – белка М1. Сведения о структуре полноразмерного белка отсутствуют. Имеются лишь данные кристаллографического исследования NM-домена, составляющего 2/3 аминокислотной последовательности. Метод ТП в сочетании с компьютерными алгоритмами предсказания вторичной структуры, моделирования бомбардировки объекта атомами трития и модифицированной программой Rosetta позволили предложить модель целого белка, включая С-концевой домен. Анализ данных для свободного белка, в составе вириона и в кристаллическом состоянии для NM-домена показал ряд существенных различий в их структуре. Определена ориентация М1 белка в составе вирусной частицы по отношению к липидной мембране.

Работа поддержана грантом РФФИ (09-03-00469, 09-04-01160).

**TRITIUM PLANIGRAPHY AS THE METHOD OF STUDYING OF BIOLOGICAL NANOOBJECTS SPATIAL ORGANIZATION: THE INFLUENZA VIRUS A**

*Bogacheva E.N., Shishkov A.V., Baratova L.A.\**

Institute of Chemical Physics RAS, Moscow, Russia

\*A.N. Belozersky Institute of Physical and Chemical Biology, Lomonosov

Moscow State University, Moscow, Russia

E-mail: ben@chph.ras.ru

Fax: (495) 137-83-18

In biological systems functional properties as a rule are realised by supramolecular nanosize objects. It is obvious that the knowledge of their spatial organization has the important theoretical and applied value. Meanwhile practically there are no direct methods of obtaining of the information on structure of such objects. Electronic microscopy and cryoelectronic tomography today are unique methods of research of a structure nanosize bioobjects, however their resolution (1-2 nanometers) is insufficient for finding-out of thin details of structure. The method of tritium planigraphy can appear rather an effective remedy of information obtaining both on common features of architecture of a particle, and about structure of molecular complexes entering into its structure. The method has already well proved at studying of structure of such objects as ribosomes, nucleosomes, vegetative and animal viruses, etc.

In the present work are presented results of research of influenza virus A and spatial structure of one of the major virus proteins – protein M1. Data on structure of full-size protein are absent. X-Ray diffraction researches only of the NM-domain (2/3 amino acid sequence) are available now. Tritium planigraphy method in a combination to computer algorithms of a prediction of secondary structure, modelling of bombardment of object by tritium atoms and modified program Rosetta have allowed to offer model of the whole protein, including the C-end domain. The analysis of the data for free protein, in structure of virion and in a crystalline state for the NM-domain has shown a number of essential differences in their structure. The orientation M1 protein as a part of a virus particle in relation to lipid membrane is defined.

Work is supported by RFBR grant (09-03-00469, 09-04-01160).

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ЭКСТРАКТА ИЗ ЧЕРНЫХ ЛИСТЬЕВ БАДАНА ТОЛСТОЛИСТНОГО НА ИММУННЫЙ СТАТУС ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ХОЛОДОВОМ СТРЕССЕ**

*Большунова Е.А., Ламажанова Г.П., Жамсаранова С.Д.*

Восточно-Сибирский государственный технологический университет,

Улан-Удэ, Россия

E-mail: biochim@esstu.ru

Факс: (3012) 43-14-15; тел.: (3012) 41-71-46

Большая потребность в адаптогенах, иммуномодуляторах, антиоксидантах и антиоксикантах диктует современным исследователям требование к разработке новых более эффективных лекарств. Предпочтительными являются лекарственные средства на основе природного сырья, обладающие, как правило, комплексным действием и редко приводящие к осложнениям после применения. Прогресс биоорганической химии и биотехнологии сделал возможным получение биологически и фармакологически активных компонентов практически из любого биосубстрата. Известно, что адаптация к неблагоприятным меняющимся условиям среды нередко сопровождается снижением некоторых специфических функций организма. Настоящее исследование посвящено изучению влияния липосомальной формы экстракта черных листьев бадана толстолистного (ЭБТ) на иммунный статус животных, находившихся в условиях длительного холодого воздействия.

Исследование выполнено на 25 белых крысах обоего пола с массой тела 200-220 г, которые ежедневно в течение 3-х часов подвергались холодому воздействию в течение 21 суток. Показатели иммунного статуса экспериментальных животных на фоне введения испытуемых средств (ЭБТ в виде водного раствора и ЭБТ, включенный в липосомальные структуры) оценивали по количеству лейкоцитов и субпопуляций лимфоцитов в крови при постановке непрямой реакции поверхностной иммунофлуоресценции.

Данные иммунограммы показали, что в экспериментальной группе животных, получавших ЭБТ в липосомальной форме, на 21-е сутки эксперимента отмечалось повышение как абсолютного, так и относительного количества Т-хелперной популяции лимфоцитов до 2-х раз по сравнению с контролем и в 1,5 раза по сравнению с животными, получавшими не включенный в липосомы ЭБТ. Одновременно с этим наблюдалась обратная тенденция к понижению количества Т-супрессоров. Таким образом, введение липосомальной формы ЭБТ сопровождается улучшением показателей иммунной реактивности животных, что свидетельствует о положительной динамике специфической адаптации организма при холодогом воздействии.

**RESEARCH OF INFLUENCE OF LIPOSOMAL FORM OF EXTRACT FROM BLACK LEAVES OF *BERGENIA CRASSIFOLIA* (*L*) *FRITSCH* ON THE IMMUNE STATUS OF LABORATORY ANIMALS AT COLD EXPOSURE**

***Bolshunova E.A., Lamazhapova G.P., Zhamsaranova S.D.***

East-Siberian State University of Technology, Ulan-Ude, Russia

E-mail: biochim@esstu.ru

Fax: (3012) 43-14-15, tel.: (3012) 41-71-46

The big requirement in adaptogenes, immunomodulators, antioxidants and antitoxicants dictates to modern researchers the requirement to working out of new more effective medicines. Medical products on the basis of the natural raw materials, possessing, as a rule, complex action and seldom leading to complications after application are preferable. Progress of bioorganic chemistry and biotechnology has made possible development of biologically and pharmacologically active components practically of any biosubstratum. It is known that adaptation to adverse varying conditions of environment is quite often accompanied by decrease in some specific functions of an organism. The present research is devoted to studying of influence of liposomal form of extract from black leaves of *Bergenia crassifolia* (*L*) *Fritsch* (EBC) on the immune status of the animals that were in conditions of long cold exposure.

Research is executed on 25 white rats of both sexes with weight of a body 200-220 g which daily within 3 hours were exposed by cold influence within 21 days. Indicators of the immune status of experimental animals against introduction of examinees of means (EBC in the form of a water solution and EBC, included in liposomal structures) estimated by quantity of leukocytes and lymphocytes subpopulations in blood at statement of indirect reaction superficial immunofluorescence.

Data of immune formula has shown that in experimental group of the animals receiving EBC in liposomal form for 21 days of experiment increase both absolute and relative quantity of T-helper lymphocytes to 2 times in comparison with the control and in 1,5 times in comparison with the animals receiving not included in liposomes EBC was marked. Simultaneously with it the return tendency to fall of quantity T-suppressor lymphocytes was observed. Thus, introduction of EBC' liposomal form is accompanied by improvement of immune reactance indicators of animals that testifies to positive dynamics of specific adaptation of an organism at cold exposure.

**РАЗНООБРАЗИЕ ДИМЕРНОЙ УПАКОВКИ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ РЕЦЕПТОРНЫХ ТИРОЗИНКИНАЗ НА ПРИМЕРЕ РЕЦЕПТОРОВ ЭФРИНОВ EphA**

***Бочаров Э.В., Майзель М.Л., Минеев К.С., Гончарук М.В., Волюнский П.Е., Ефремов Р.Г., Арсеньев А.С.***

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: bon@nmr.ru

Эфриновые (Eph) рецепторы, представители самого большого семейства среди рецепторных тирозинкиназ, и их мембрано-связанные лиганды эфрины контролируют межклеточные взаимодействия и играют ведущую роль в процессах роста, развития и дифференцировки клеток организма. Уникальное отличие сигнальной системы Eph рецепторов – в обоюдной направленности передаваемого сигнала между двумя клетками, вследствие чего эфриновая система межклеточного общения задействована в морфогенезе и разделении тканей, как в эмбриональном, так и постэмбриональном развитии организма человека, а нарушения в ее работе связаны со многими патологиями, в том числе онкогенными и нейродегенеративными процессами. Необходимым условием активации Eph рецепторов является их латеральная димеризация и последующая олигомеризация на поверхности клетки. В последнее время для разных представителей рецепторных тирозинкиназ появляются экспериментальные данные о том, что непосредственное участие в их латеральной гомо- и гетеродимеризации (олигомеризации) принимает трансмембранный (ТМ) домен рецептора.

В представленной работе были исследованы пространственная структура и внутримолекулярная динамика рекомбинантных ТМ фрагментов рецепторов EphA1 и EphA2 с помощью гетероядерной спектроскопии ЯМР в липидных бицеллах, имитирующих мембранное окружение, и молекулярной динамики в явно заданном липидном бислое. Пространственные структуры ТМ доменов EphA1 и EphA2 в бицеллах ДМФХ/ДФХ представляют собой симметричные гомодимеры с правой и левой сверхспирализациями ТМ спиралей (остатки 544-569 и 535-559), взаимодействующих по димеризационным мотивам  $A^{550}X_2G^{554}X_3G^{558}$  (т.н. "глициновый зиппер") и  $L^{535}X_3G^{539}X_2A^{542}X_3V^{546}X_2L^{549}$  (т.н. "семичленный мотив"), соответственно. Важно, что помимо задействованных димеризационных мотивов в ТМ доменах EphA1 и EphA2 существуют еще другие потенциальные мотивы. Так, для ТМ домена EphA2 помимо семичленного мотива, ответственного за левую сверхспирализацию, существует, по крайней мере, еще один характерный димеризационный мотив  $A^{536}X_3G^{540}X_3G^{544}$ , схожий с глициновым зиппером, участвующим в димеризации ТМ домена EphA1 с правой сверхспирализацией. Таким образом, существует возможность переключения димеризационного интерфейса между двумя мотивами, что может быть аргументом в пользу "вращательно-сцепленного" (rotation-coupling) механизма активации рецепторных тирозинкиназ – механизма, включающего конформационный переход рецептора из неактивной в активную форму



посредством изменения топологии димера ТМ доменов в плазматической мембране. Эти предположения соответствуют данным о том, что Eph рецепторы предварительно сгруппированы в липидных рафтах в виде слабо аффинных димеров, их взаимодействие с эфринами приводит к конформационным перестройкам, перегруппировке и агрегации рецепторов в большие лиганд-рецепторные кластеры в клеточной мембране. Полученные структурно-динамические данные свидетельствуют также о возможности совместного существования альтернативных димерных конформаций ТМ домена EphA1, предположительно соответствующих активной и неактивной конфигурациям рецептора. Более того, с использованием литературных данных было продемонстрировано, что наблюдаемая зависимость структурно-динамических свойств ТМ домена EphA1 от ионизационного состояния E547, заглубленного в липидные бислои, видимо, напрямую связана с биологической функцией данного рецептора в организме человека как в норме, так и при различных патологиях, связанных с локальным подкислением тканей.

#### **DISTINCT DIMERIC CONFORMATIONS OF EphA TRANSMEMBRANE DOMAINS REVEAL DIVERSITY OF TRANSMEMBRANE HELIX PACKING AMONG RECEPTOR TYROSINE KINASES**

*Bocharov E.V., Mayzel M.L., Mineev K.S., Goncharuk M.V., Volynsky P.E., Efremov R.G., Arseniev A.S.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia  
E-mail: bon@nmr.ru

The Eph receptors, largest family of receptor tyrosine kinases, and their membrane-bound ephrin ligands control a diverse array of cell-cell interaction in the developing and adult organisms, coordinating cell migration and positioning during tissue development and tissue repair. The Eph-ephrin interactions may have a role in synaptic plasticity, learning, and memory formation. The physiological significance of the Eph receptor tyrosine kinases for therapeutical applications is obvious since they play an important role in development of many human diseases, including oncogenic and neurodegenerative diseases. During signal transduction, the Eph receptors, like other receptor tyrosine kinases, are involved in lateral dimerization and subsequent oligomerization processes within specialized plasma membrane microdomains, known as 'lipid rafts', which can impart additional specificity to the ephrin-Eph signaling. While accumulating evidences reveal that the proper lateral dimerization of transmembrane (TM) domains of receptor tyrosine kinases is required for biochemical signal transduction across plasma membrane, the functional role of the TM domains in the Eph receptor association was so far unclear. The structural-dynamic properties of the homodimeric TM domains of EphA1 and EphA2 receptors were investigated with the aid of solution NMR in lipid bicelles and molecular dynamics energy relaxation in explicit lipid bilayer. The distinct right- and left-handed parallel helix-helix packing was revealed for the TM domains embedded into the DMPC/DHPC bicelles. The EphA1 TM domain self-associates in a right-handed parallel  $\alpha$ -helical bundle (544-569)<sub>2</sub> through the N-terminal glycine zipper motif A<sup>550</sup>X<sub>3</sub>G<sup>554</sup>X<sub>3</sub>G<sup>558</sup>. In turn, the left-handed parallel EphA2 TM helices (535-559)<sub>2</sub> interact through the extended heptad repeat motif L<sup>535</sup>X<sub>3</sub>G<sup>539</sup>X<sub>2</sub>A<sup>542</sup>X<sub>3</sub>V<sup>546</sup>X<sub>2</sub>L<sup>549</sup>, whereas the characteristic motif A<sup>536</sup>X<sub>3</sub>G<sup>540</sup>X<sub>3</sub>G<sup>544</sup> responsible for the EphA1 TM domain dimerization is not employed, enabling the receptor to adopt more than one dimeric conformation in plasma membrane. These findings serve as an instructive example of the diversity of TM domain formation within the same family of protein kinases and appear to favor the assumption that the so-called rotation-coupled activation mechanism may take place during the Eph receptor signaling. In addition, our data suggest that the TM domains of Eph receptors and surrounding lipid bilayer do not merely play a passive role in signal transduction, but can provide an additional driving force for underlying conformational transition and extra specificity for the Eph receptor dimerization and clustering. Furthermore, observed dependence of the structural-dynamic properties of the EphA1 TM domain upon the ionization state of the Glu<sup>547</sup> residue implies that the conformational flexibility and activation of the EphA1 receptor can be regulated by such external and local factors as pH and lipid composition of the cell membrane. This can represent a new level of regulation of the EphA receptor activity integrated into a complex system of feedbacks involved in Eph-ephrin signaling. So, the structural investigation of the EphA TM domain association helps to understand the underlying mechanisms of the Eph-ephrin signal transduction and provides a basis to control the receptor kinase activity, especially in pathological states of organism.

**ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ – РИВАСТИГМИНА НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ЛИПИДОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВИДЫ ХОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ФОСФОЛИПИДОВ В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА**

*Бугайчук О.В., Круговов Д.А.*

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

E-mail: dioxan@yandex.ru

Факс: (495) 137-41-01; тел.: (495) 939-71-59

Болезнь Альцгеймера (БА) характеризуется нарушением когнитивных функций мозга, снижением памяти и интеллекта, что сопровождается выраженными патологическими поведенческими симптомами. Принято считать, что ключевым механизмом развития патологии Альцгеймеровского типа является токсическое действие  $\beta$ -амилоидного пептида и окислительный стресс, индуцируемый провоспалительными цитокинами. В настоящий момент акцент многих исследований причин гибели нейронов при деменции Альцгеймеровского типа концентрируется на функции липидов, которые, как предполагается, могут играть ключевую роль в амилоидогенезе и нейрональной дисфункции.

Целью нашего исследования явилось определение влияния ривастигмина – ингибитора ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы – на содержание молекулярных видов фосфолипидов (фосфатидилхолина, сфингомиелина и лизофосфатидилхолина) и скорость окисления липидов плазмы крови в ходе лечения пациентов, страдающих БА.

Ривастигмин применяется в клинике для лечения болезни Альцгеймера на стадии начальной и умеренной деменции. Ривастигмин больные принимали ежедневно в индивидуально переносимой дозе (от 3 до 12 мг/сут) ежедневно в течение 3 мес. Пациенты проходили курс лечения в Отделе по изучению болезни Альцгеймера Научного центра психического здоровья РАМН (руководитель – проф. С.И. Гаврилова). Возраст пациентов колебался от 60 до 85 лет. Плазму крови брали от пациентов до и после лечения препаратом. В качестве контрольной группы были пациенты, не проходившие лечения.

Липиды из плазмы крови извлекали по методу Блайя-Дайера. Анализ липидов проводили методом ВЭЖХ/МС с использованием жидкостного хроматографа Surveyor (Thermo Electron, Германия), соединенного с масс-спектрометром Esquire 4000 (Bruker, Германия) с интерфейсом для ионизации электрораспылением. Для ВЭЖХ использовали колонку Luna Silica, 2x150 мм, размер частиц 3 мкм (Phenomenex). Разделение смеси липидов проводили методом градиентного элюирования с использованием подвижных фаз А (97% ацетонитрила + 2% метанола + 1% уксусной кислоты, раствор содержал 5 мМ ацетата аммония) и В (99% метанола + 1% уксусной кислоты, раствор содержал 5 мМ ацетата аммония).

Результаты исследования показали, что ривастигмин оказывает заметно дифференцированное влияние на фосфолипиды с различным набором

жирных кислот. Наиболее четкие изменения, выраженные в уменьшении содержания, зафиксированы для ФХ 16:0/18:2, 18:1/20:2 и 18:0/20:4 с Мм 758.6, 808.6, 810.6 кДа. Лизофосфатидилхолины, содержащие в своей структуре одну жирную кислоту, также представлены в виде набора различных молекулярных видов, которые значительно уменьшаются по всему спектру при действии ривастигмина. Сфингомиелины представлены наименее богатым разнообразием молекулярных видов по сравнению с вышепредставленными фосфолипидами. Наибольшие изменения зафиксированы для СМ 16:0 с Мм 703.6 кДа.

Скорость окисления липидов плазмы крови измеряли при окислении липидов молекулярным кислородом в растворе хлорбензола в присутствии инициатора азоизобутиронитрила (АИБН, Aldrich) в термостатированной ячейке с использованием волнометрической установки типа "Варбург".

Лечение пациентов с БА ривастигмином приводило к снижению скорости окисления липидов по сравнению с пациентами, не принимавшими препарат. Данные результаты указывают на способность ривастигмина ингибировать окислительные процессы в липидах, отражающих патологические процессы, связанные с индукцией окислительного стресса при БА.

Снижение скоростей окисления липидов при лечении ривастигмином сопровождается снижением уровня молекулярных видов холинсодержащих фосфолипидов с ненасыщенными жирными кислотами, что может указывать на положительную коррекцию препаратом метаболизма липидов, нарушение которого вызвано окислительным стрессом.

Следовательно, наши результаты показывают, что ингибитор ацетилхолинэстеразы – ривастигмин, влияя на фермент-мишень, в конечном счете, способен модифицировать фосфолипидный спектр и окислительный потенциал липидов плазмы крови пациентов в процессе лечения.

**INFLUENCE OF ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITOR – RIVASTIGMIN ON OXIDATION POTENTIAL OF LIPIDS AND CONTENTS OF MOLECULAR SPECIES OF CHOLINE CONTAINING PHOSPHOLIPIDS DURING ALZHEIMER'S DISEASE TREATMENT**

***Bugaychuk O.V., Krugovov D.A.***

Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, Russia

E-mail: dioxan@yandex.ru

Fax: (495) 137-41-01; tel.: (495) 939-71-59

Alzheimer's disease (AD) leads to a dramatic decline in cognitive abilities and memory. Amyloid beta-protein (A $\beta$ ) and oxidative stress induced by proinflammatory cytokines is thought to be main primary factors causing neurodegeneration in AD. At the moment the attention of many studies of mechanisms of neurons death at Alzheimer's dementia concentrates on the function of lipids which it is supposed can play a key role in amyloidogenesis and neuronal disfunction.

The main goal of our study was detection of influence of rivastigmin – inhibitor of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – on changes in molecular species of phospholipids (phosphatidylcholine, sphingomyelin and lysophosphatidylcholine) and rate of lipids oxidation in blood plasma during treatment of patients with AD.

Rivastigmin is applied in clinic for AD treatment at the initial and moderate stages of dementia in doses from 3 to 12 mg daily within 3 months. AD patients received medical treatment in AD Department of Research Center for Mental Health RAMS (Head – prof. S.I. Gavrilova). The age of patients ranged from 60 to 85 years. Blood plasma was collected before and after drug treatment. As a control group, patients were not treated by rivastigmin.

Lipids were isolated from plasma according to Bligh-Dyer method. Phospholipid species levels were determined by chromat-mass-spectrometry with using liquid chromatograph Surveyor (Thermo Electron, Germany) connected to mass-spectrometer Esquire 4000 (Bruker, Germany) with the interface for ionization by electrodispersion. Luna Silica column (2x150 mm, the size of particles-3 microns (Phenomenex) was used for HPLC. Mobile fases A (97% acetonitrile + 2% methanol + 1% acetic acid, a solution contained 5 mM of ammonium acetate) and B (99% methanol+1% acetic acid, the solution contained 5 mM of ammonium acetate) were used for elution.

Our results have shown that rivastigmin considerably differentiated influence on phospholipids with various set of fatty acids. It was found that it reduced phosphatidylcholines 16:0/18:2, 18:1/20:2 and 18:0/20:4 with Mm 758,6, 808,6 and 810,6 kDa. Lysophosphatidylcholine containing one fatty acid in its structure, is also represented as a set of different molecular species that have significantly reduced during treatment by rivastigmin. The biggest changes were recorded for 16:0 sphingomyelin with Mm of 703,6 kDa.

The rates of lipids oxidation by pure oxygen in chlorbenzene solution in presence of AIBN (Aldrich) under the permanent pressure and temperature were measured on "Warburg" type plant.

Treatment of patients with AD by rivastigmin led to decrease in rates oxidation of plasma lipids in compare with untreated patients. Given results reflect the ability of rivastigmin to inhibit oxidative stress, induced in AD. Decrease in oxidation rates of plasma lipids of patients treated by rivastigmin is accompanied by decrease in the content of molecular species of choline containing phospholipids with unsaturated fatty acids that can indicate on positive correction of lipids metabolism, caused by oxidative stress.

Hence, our results showed finally that inhibitor of acetylcholinesterase - rivastigmin is capable to modify phospholipids spectrum and oxidative potential of plasma lipids during treatment of patients with AD.

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ОСИНЫ ГЕНАМИ ГЛУТАМИНСИНТЕТАЗЫ GS1 И ЗЕАМАТИНА

Будлатова И.В.<sup>1,2</sup>, Новиков П.С.<sup>1,3</sup>, Канарский А.В.<sup>3</sup>, Винокуров М.Г.<sup>2</sup>,  
Шестибратов К.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Филиал Института биоорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, Россия

<sup>2</sup>Институт биофизики клетки РАН, Пушкино, Россия

<sup>3</sup>Марийский государственный технический университет, Йошкар-Ола,  
Россия

E-mail: schestibratov@fibkh.serpukhov.su

Факс: (4967) 33-05-27; тел.: (4967) 33-09-66

Проведена серия агробактериальных трансформаций различных генотипов осины (*Populus tremula*) с целью создания трансгенных форм с модифицированным метаболизмом азота и повышенной устойчивостью к сердцевидной гнили.

Для оптимизации метаболизма азота выбран ген глутаминсинтетазы, катализирующей конверсию аммонийного азота в глутамин. С использованием векторной плазмиды pBIGS, несущей ген глутаминсинтетазы сосны под контролем 35S промотора, создана вторая серия трансгенных линий осины. В результате четырех агробактериальных трансформаций получено 37 трансгенных линий. Присутствие гена GS подтверждено у 34. Модификацию метаболизма азота в растениях осины оценивали путем измерения содержания азота в тканях растений, а также методом культивирования в присутствии сублетальных доз фосфинотрицина в условиях *in vitro*. Содержание общего азота в тканях GS линий превышало таковые значения у контрольных растений на 15-20%. При культивировании на средах с 0,5 мг/л фосфинотрицина у трансгенных линий не наблюдалось ингибирования роста, тогда как контрольные растения демонстрировали снижение частоты укоренения микропобегов, среднего количества корней на растение и суммарной длины корней.

С целью повышения устойчивости осины к фитопатогенам выбрана группа PR-5, а среди них – зеаматин. Для экспрессии данного белка в растениях осины были клонированы два гена зеаматина, ZP и ZPU и затем перенесены в бинарные векторы серии pBIN под контроль 35S промотора. Вариант гена ZP отличается от ZPU отсутствием 5'- и 3'-нетранслируемых последовательностей. В результате агробактериальной трансформации получено 15 трансгенных линий. Соматоклональных изменений у данных растений не обнаружено. В настоящее время проводится биологическое тестирование этих растений в условиях защищенного грунта.

## GENETIC TRANSFORMATION OF ASPEN WITH GLUTAMINE SYNTHETASE GS1 AND ZEAMATIN GENES

Bulatova I.V.<sup>1,2</sup>, Novikov P.S.<sup>1,3</sup>, Kanarskiy A.V.<sup>3</sup>, Vinokurov M.G.<sup>2</sup>,  
Schestibratov K.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,  
Pushchino, Russia

<sup>2</sup>Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Russia

<sup>3</sup>Mari State Technical University, Yoshkar-Ola, Russia

E-mail: schestibratov@fibkh.serpukhov.su

Fax: (4967) 33-05-27; tel.: (4967) 33-09-66

Different genotypes of aspen (*Populus tremula*) was transformed by agrobacterial methods to create transgenic plants with modified nitrogen metabolism and increased resistance to heart rot. To optimize nitrogen metabolism glutamine synthetase gene catalyzing the incorporation of ammonium into glutamine was chose. The pBIGS vector containing the glutamine synthetase gene from pine was used in our experiments. In all 37 transgenic lines were produced. PCR analysis confirmed presence of the GS gene in 34 lines. Modification of nitrogen metabolism was evaluated by measurement of nitrogen content in plant tissues and cultivation of plants on sublethal levels of phosphinotricin *in vitro*. Transgenic plants exhibited increased nitrogen content (15-20%) in comparison with control. On medium containing 0.5 mg/l phosphinotricin we did not observed growth inhibition on transgenic plants whereas control plants demonstrated decreased rooting frequency, root number and total root length.

To increase resistance of aspen to phytopathogenes zeamatin protein from the PR-5 families was used. ZP and ZPU genes were cloned into binary vectors pBIN under control of the CaMV 35S promoter. Unlike ZP gene ZPU gene contained 5'- and 3'-untranslated regions. As result of agrobacterial transformation 15 transgenic lines of aspen were produced. These plants did not show somaclonal variance. Now we test obtained transgenic plants under greenhouse conditions.

## ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССНОЙ ДЕТЕКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

*Бызова Н.А., Жердев А.В., Урусов А.Е., Зверева Е.А., Дзантиев Б.Б.*

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

E-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

Факс: (495) 954-28-04; тел.: (495) 954-31-42

Проведены исследования, направленные на создание и характеристику систем экспрессной детекции антибиотиков, микотоксинов и пестицидов в биопробах, продуктах питания и сельскохозяйственной продукции, основанных на принципе иммунохроматографии. Получены препараты наночастиц коллоидного золота (маркеров специфических иммунных комплексов) с диаметром от 5 до 40 нм и конъюгаты с антителами; проведена их характеристика на основании данных электронной и атомно-силовой микроскопии. Определены оптимальные режимы иммобилизации антител на коллоидном золоте. Проведен сравнительный экспериментальный анализ процессов формирования комплексов (иммобилизованный антиген – меченное коллоидным золотом антитело) в проточном режиме при использовании различных мембранных носителей и коллоидных конъюгатов, установлены оптимальные сочетания компонентов тест-систем для иммунохроматографии. С использованием биосенсорной системы Biacore получены кинетические характеристики взаимодействия антигенов с антителами и их конъюгатами с наночастицами коллоидного золота. Предложены способы направленного изменения порога детекции иммунохроматографического анализа. Оработаны условия количественной регистрации результатов анализа с применением портативного видецифрового оборудования отечественного производства. Предложены мультипараметрические аналитические системы для одновременного определения разных соединений в одной пробе. Разработана масштабируемая технология производства тест-систем для контроля содержания антибиотиков (хлорамфеникол, стрептомицин, ампициллин) в молоке. С помощью данных тест-систем исследованные соединения могут детектироваться в концентрациях до 1 нг/мл, продолжительность анализа – не более 10 мин. Благодаря высокой экспрессности и малой трудоемкости иммунохроматография является эффективным подходом при проведении анализов в лабораторных и внелабораторных условиях.

## IMMUNOCHROMATOGRAPHIC SYSTEMS FOR EXPRESS DETECTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

*Byzova N.A., Zherdev A.V., Urusov A.E., Zvereva E.A., Dzantiev B.B.*

Bach Institute of Biochemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

Fax: (495) 954-28-04; tel.: (495) 954-31-42

The presented studies are directed on the elaboration and characterization of express analytical systems based on a principle of immunochromatography. The systems are intended for the detection of antibiotics, pesticides and mycotoxins in biosamples, foodstuffs and agricultural production. Preparations of colloidal gold nanoparticles (labels for specific immune complexes in immunochromatographic tests) with diameters from 5 to 40 nm and their conjugates with antibodies were obtained and described using electronic microscopy and atomic force microscopy. Optimal conditions for antibodies immobilization on colloidal gold surface were determined. The comparative experimental analysis of the formation of complexes (immobilized antigen – antibody with colloidal gold label) in a flowing mode was carried out for different membranes and colloidal conjugates; optimal sets of compounds for realization of immunochromatographic assays were determined. With the use of biosensoric Biacore system kinetic dependences of antigens interaction with antibodies and antibody-colloidal gold nanoparticles were obtained. Approaches for directed change of the threshold level between positive and negative samples were proposed. Conditions of quantitative registration of the analyses results by portable video digital device of a domestic manufacturing were determined. Multiparametric analytical systems for simultaneous detection of several compounds in the same sample were proposed. Scaled technology of the test-systems manufacturing for the control of antibiotics (chloramphenicol, streptomycin, ampicillin) was developed. The developed test-systems allow to detect the studied compounds in concentrations to 1 ng/ml, time of the analysis is no more than 10 min. Due to rapidity and low laboriousness immunochromatography is the efficient approach for carrying out analyses both at laboratory and on-site conditions.



## ПЕПТИДЫ С РЕДКИМИ АМИНОКИСЛОТАМИ ИЗ МОРСКИХ ЧЕРВЕЙ POLYCHAETE КАК ИНГИБИТОРЫ РЕВЕРТАЗЫ И ИНТЕГРАЗЫ ИЗ HIV-1

Елякова Л.А., Васильковский Б.В., Хорошилова Н.И., Ванцева С.И., Агапкина Ю.Ю.\*

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

\*НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ

им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: svetvan@yandex.ru

Ранее нами была показана значимость новых объектов – морских полихет в качестве источников ингибиторов ряда ферментов, в т.ч. обратной транскриптазы и ревертазы (RT) [1]. В результате первого этапа работы определено строение пептида TYR-PRO-ILE-GLU-MeHIS, Mm 672 Da, из морской полихеты *Eunicidae* [1], показавшего  $IC_{50}$   $10^{-6}$  M по отношению к RT из HIV-1. Отмечено наличие необычной аминокислоты – метилгистидина. На это вещество был получен патент РФ [2]. В обзоре Bachem указывается на то, что такая последовательность присутствует в молекулах актина всех живых существ, от микроорганизмов до человека, и всегда в одном и том же месте (с 69 до 73 аминокислотного остатка).

Дальнейшая работа с этим объектом по поиску пептидов – ингибиторов интегразы (IN) из HIV-1 завершилась выделением гептапептида с Mm 683 Da. Интересно, что в его составе тоже обнаружена редкая аминокислота – гомосерин: ASP-LEU-HSE-HIS-ALA-GLN,  $IC_{50}$   $3 \times 10^{-5}$  M. Также заметно сходство этого пептида с элементами белковой последовательности червя *Caenorhabditis elegans*, чья полная структура уже давно определена. При установлении структур пептидов использован обычный набор методов белковой химии и масс-спектрометрия.

Проведённая работа подтвердила уже отмеченные в ряде обзоров положения о том, что пептидные ингибиторы RT и IN имеют некоторое сходство с пептидными последовательностями структур из HIV-1 и HIV-2 [3].

Исследование поддержано фондом МНТЦ, проект 3197p (04.06-03.08 г.).

### Литература

1. Elyakova L.A., Myastovskaya O.M., Mamontova V.A., Rasskazov "Potential antitumor and antiviral activities of marine polychaetes", *Biologiya Morya*, Vladivostok, 1998, v.24, N1, P.38-43.
2. Елякова Л.А., Васильковский Б.В., Бочаров Э.А., Туницкая В.Л., Кочетков С.Н., Еляков Г.Б. "Средство, обладающее ингибирующей способностью по отношению к обратной транскриптазе вируса иммунодефицита человека", Патент РФ №2314818. Бюлл. №2, 20.01.2008 г.
3. R. Dayam, R. Gundla, L.Q. Al-Mawsawi, N. Neamati "HIV-I Integrase inhibitors: 2005-2006 update", *Med. Res. Rev.*, 2008, v.28, N1, P.118-154.

## PEPTIDES WITH RARE AMINO ACIDS FROM MARINE POLYCHAETE AS INHIBITORS OF HIV-1 REVERTASE AND INTEGRASE

Elyakova L.A., Vaskovsky B.V., Khoroshilova N.I., Vantseva S.I., Agapkina Yu.Yu.\*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

\*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

E-mail: svetvan@yandex.ru

Earlier we showed the significance of new objects – marine polychaetes as the sources of enzymes' inhibitors, including reverse transcriptase (RT) [1]. During the first stage of our work the structure of the peptide TYR-PRO-ILE-GLU-MeHIS, Mm 672 Da, from marine polychaetes *Eunicidae* [1], was determined. The peptide showed  $IC_{50}$   $10^{-6}$  M relative to RT HIV-1. It is significant that the peptide contains the unusual amino acid - methylhistidine. The patent on the substance was received [2]. This sequence, as was shown in Bachem review, presents in the actine molecules of all living creatures, from microorganisms to human, and only in the one place (from 69-73 amino acid residues).

Further the study with these objects for searching the peptides – IN inhibitors from HIV-1, was completed by isolation of heptapeptide Mm 683 Da. It is interesting to see that also the rare amino acid homoserin was discovered in the peptide Mm 683 Da: ASP-LEU-HSE-HIS-ALA-GLN,  $IC_{50}$   $3 \times 10^{-5}$  M. There is a similarity between this peptide and the elements of protein sequence of worm *Caenorhabditis elegans*, whose structure has been already determined. The standard techniques of protein chemistry and mass-spectrometry were used under this study. The research confirms the states in other reviews that RT and IN peptide inhibitors have similarity with the some peptide structures from HIV-1 and HIV-2 [3].

The study was supported by the International Science and Technology Center, the Project 3197p (2006-2008).

### References

1. Elyakova L.A., Myastovskaya O.M., Mamontova V.A., Rasskazov "Potential antitumor and antiviral activities of marine polychaetes", *Biologiya Morya*, Vladivostok, 1998, v.24, N1, P.38-43.
2. Elyakova L.A., Vaskovsky B.V., Bocharov E.A., Tunitskaya V.L., Kochetkov S.N., Elyakov G.B. "Substance having inhibiting activity relative to HIV reverse transcriptase", Patent №2314818, Bull. #2, 20.01.2008.
3. R. Dayam, R. Gundla, L.Q. Al-Mawsawi, N. Neamati "HIV-I Integrase inhibitors: 2005-2006 update", *Med. Res. Rev.*, 2008, v.28, N1, P.118-154.

## АНТИОПУХОЛЕВЫЕ НУКЛЕОТИД-АКТИНОМИЦИНОВЫЕ ФАРМАКОСОМЫ

Векшин Н.Л.

Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

E-mail: nvekshin@rambler.ru

Тел.: (4967) 73-94-32

В работе [Vekshin N.L., Kovalev A.E. // *J. Biochem.* 2006. V.140. P.185] было показано перемещение 7-амино-актиномицина D (флуоресцентного аналога актиномицина D) от синтетической олигонуклеотидной шпильки HP1 к ДНК в растворе. Так как флуоресценция 7AAMD в ДНК многократно ниже, чем в HP1 [Савинцев И.В., Векшин Н.Л. // *Мол. биол.* 2002. Т.36. С.725], то это позволяет непосредственно наблюдать перераспределение антибиотика от HP1 к ДНК. Перераспределение состоит из быстрой стадии - 4,5 сек и медленной - 100 сек. Две компоненты соответствуют двум типам участков ДНК. Первый тип - петли и раскрученные области, а второй - двойная спираль. С помощью оптической микроскопии показано [Векшин Н.Л., Савинцев И.В. // *Биофизика*, 2009. Т.54, в печати], что проникновение AMD или 7AAMD в комплексе с HP1 внутрь раковых клеток карциномы мышей происходит более эффективно, чем антибиотика отдельно, и приводит к более заметному уничтожению этих клеток. Свободный 7AAMD и AMD накапливаются в плазматической клеточной мембране, плохо проникая внутрь клетки. В случае применения комплексов 7AAMD/HP1 или AMD/HP1 наблюдается также окрашивание ядер. Это означает, что такой комплекс легко проникает и через клеточную, и через ядерную мембраны. При инкубации в присутствии комплекса AMD/HP1 гибель раковых клеток возрастает в несколько раз. Можно предложить использовать олигонуклеотидные шпильки, подобные HP1, в качестве переносчиков, облегчающих доставку гетероциклических антибиотиков к раковым клеткам. После применения комплекса AMD/HP1 к мышам с саркомой продолжительность жизни животных увеличилась с 10-12 дней до 20-25 дней, в то время как применение антибиотика отдельно увеличивало срок их жизни только на 1-2 дня. Таким образом, при обработке клеток саркомы комплекс более эффективен, чем AMD отдельно. Другими переносчиками актиномицинов могут служить кластеры кофеина и аденина, спонтанно возникающие в воде при миллимолярных концентрациях. Размер кофеиновых кластеров очень мал, и они особенно устойчивы. Было показано быстрое перераспределение антибиотика с поверхности кофеиновых кластеров к ДНК в растворе [Битехтина М.А., Векшин Н.Л. // *Биоорг.хим.* 2008. Т.34. №2. С.256. Векшин Н.Л. *Биофизика ДНК-актиномициновых наноконплексов // Фотон-век*, 2009]. На основе AMD, HP1, кофеина и аденина были приготовлены анти-раковые фармакосомы - сферические частицы 10-нм размера [Векшин Н.Л. *Роспатент*, № 2008107667].

## ANTI-CANCER NUCLEOTIDE-ACTINOMYCIN PHARMACOSOMES

Vekshin N.L.

Institute of Cell Biophysics of RAS, Pushchino, Russia

E-mail: nvekshin@rambler.ru

Tel.: (4967) 73-94-32

In work [Vekshin N.L., Kovalev A.E. // *J. Biochem.* 2006. V.140. P.185], it was revealed a transfer of 7-amino-actinomycin D (fluorescent analog of actinomycin D) from synthetic hairpin oligonucleotide HP1 to DNA in solution. Since fluorescence of 7AAMD at linkage with DNA is much low, than with HP1 [Savintsev I.V., Vekshin N.L. // *Mol. Biol (Russ.)*, 2002. V.36. P.725], it allows observe directly the redistribution of the antibiotic from HP1 to DNA. The redistribution consists of fast phase - 4.5 s and slow phase - 100 s. Two components correspond to two types of sites in DNA. The first kind of sites are loops and untwisted regions, and the second one is double helix. Using luminescent microscopy, it is shown [Vekshin N.L., Savintsev I.V. // *Biofizika (Russ.)*, 2009. V.54, in press] that penetration of actinomycin D (AMD) or 7AAMD in complex with HP1 to carcinoma cells (cancer of mice) occurs more effectively, than of antibiotic separately, and leads to more strong killing of these cells. Free 7AAMD and AMD are accumulated in plasmatic cellular membrane. They badly penetrate inside cells. In the case of application of the 7AAMD/HP1 or AMD/HP1 complex, the staining of nucleuses is observed also. It means that complex easily penetrates both through cellular membrane, and through nuclear membrane. At incubation at the presence of the AMD/HP1 complex, the killing of cancer cells grows in many times. It can be suppose to use oligonucleotide hairpins, similar to HP1, as carriers, facilitating the delivery of heterocyclic antibiotics to cancer cells. After application of the AMD/HP1 complex to sarcoma mouse, the expectancy of life of animals was increased from 10-12 days till 20-25 days, while application of the antibiotic separately increased the term of life only by 1-2 days. Thus, at treatment of sarcoma, the complex is more effective, than AMD separately. Clusters of coffeine and adenine can serve as other suitable carriers of actinomycins (and generally of many heterocyclic antibiotics). Such clusters spontaneously arise in water at millimolar concentrations. The size of coffeine clusters is very small and they are especially steady. Fast redistribution of the antibiotic from a surface of coffeine clusters to DNA in solution was revealed in [Bitekhtina M.A., Vekshin N.L. // *Bioorg. Chem. (Russ.)* 2008. V.34. N2. P.256. Vekshin N.L. *Biophysics of DNA-Actinomycin Nano-Complexes (Russ.)*. Pushchino: *Photon-vek*, 2009]. On the basis of AMD, HP1, coffeine and adenine, the anti-cancer pharmacosomes - spherical particles of the 10-nm size - were prepared [Vekshin N.L. *Russ. patent № 2008107667*].

## СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ДОСТАВКА ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ К ОПУХОЛЕВЫМ КЛЕТКАМ ЧЕЛОВЕКА

**Верюгин Б.В.**\*\*\*, **Лукаш С.В.**\*, **Деев С.М.**\*

\*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

\*\*Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

E-mail: boris.veryugin@gmail.com

Наночастицы золота являются перспективными для диагностики и терапии опухолей по ряду причин, среди которых можно выделить их физические свойства. Благодаря большому значению сечения рассеяния света на частоте поверхностно-плазмонного резонанса, конъюгаты наночастиц золота с антителами, специфичными к опухолевым маркерам, могут быть эффективно использованы в качестве оптических меток. Кроме того, высокое значение сечения поглощения позволяет их применять для селективной фототермической терапии. Тирозинкиназный рецептор HER2/neu гиперэкспрессируется клетками карциномы молочной железы, карциномы простаты, рака эндометрия, первичного рака желудка, аденокарциномы яичника и многих других типов злокачественных опухолей и, следовательно, является удобным онкомаркером [1,2].

Целью настоящей работы являлась специфическая доставка золотых наночастиц к клеткам аденокарциномы яичника человека (SKOV-3) при помощи их конъюгации с миниантителами scFv 4D5 к рецептору HER2/neu [3]. В работе использовались сферические, стабилизированные цитратом коллоидные наночастицы золота диаметром 10-15 нм и золотые наностержни размером 50x15 нм. Частицы были предоставлены Н.Г. Хлебцовым и сотр. Получение конъюгатов проводилось методом электростатической адсорбции целевого белка на поверхность наночастиц. Качество комплексов оценивали по значениям экстинкций, определенных из спектров поглощения. Для изучения взаимодействия полученных конъюгатов с опухолевыми клетками проводилась инкубация клеток с ними при 0°C. В качестве контрольной культуры клеток использовались клетки HeLa, в качестве контрольных частиц – наночастицы золота обоих видов, не конъюгированные с белком, а также наночастицы золота, конъюгированные с неспецифическим белком – барназой. Визуализация клеток проводилась методом конфокальной микроскопии. Было установлено, что наночастицы золота, не конъюгированные с белком, неспецифически интернализируются клетками. Показано, что конъюгация наночастиц золота с белками уменьшает это неспецифическое взаимодействие. Продемонстрирована специфичность взаимодействия полученных конструкций с клетками SKOV-3. Таким образом, выбранные противораковые мини-антитела 4D5 scFv при конъюгации с наночастицами золота обеспечивают направленность доставки наночастиц золота к опухолевым клеткам, гиперэкспрессирующим раковый маркер HER2/neu, что позволяет использовать созданные иммуноконъюгаты как для визуализации раковых клеток, так и для адресного фототермического воздействия на них.

### *Литература*

1. Mullin A.E., Bertrand J.C. HER2/neu oncogene and sensitivity to the DNA-interactive drug doxorubicin. *MJM*. 1998. **4**. 9-15.
2. Deyev S.M., Lebedenko E.N. Multivalency: the hallmark of antibodies used for optimization of tumor targeting by design. *Bioessays*. 2008. **30**(9). 904-918.
3. Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., Schubiger A.P., Pluckthun A. Design of multivalent complexes using the barnase\*barstar module. *Nat. Biotechnol.* 2003. **21**(12). 1486-1492.

**БЕЛКИ КОРИЧНЕВОЙ МИЦЕЛИАЛЬНОЙ ПЛЕНКИ  
БАЗИДИОМИЦЕТА *LENTINUS EDODES* С  
ФЕНОЛОКСИДАЗНОЙ И ЛЕКТИНОВОЙ АКТИВНОСТЯМИ**

***Ветчинкина Е.П., Никитина В.Е.***

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,  
Саратов, Россия

E-mail: elenavetrus@yandex.ru

Факс: (8452) 97-03-83; тел.: (8452) 97-04-44

Базидиомицет *Lentinus edodes* (шиитаке) во всем мире ценится как высококачественный съедобный и лекарственный гриб. В силу повышенного спроса на этот продукт изучение физиолого-биохимических особенностей и увеличение производства шиитаке являются актуальной задачей. Коричневая мицелиальная пленка – характерная стадия морфогенеза данной культуры, которая образуется непосредственно перед началом плодоношения. Нами отмечено, что формирование полноценных плодовых тел без предварительного образования пленки не происходит. Для понимания механизмов регуляции формирования плодовых тел представляется важным обнаружение и анализ белков, характеризующих морфологические структуры, предшествующие плодоношению *L. edodes*.

Нами было установлено, что белковый состав коричневой пленки значительно отличается от такового на других стадиях развития гриба, что свидетельствует об определенном функциональном значении этих белков, синтез которых может быть сигналом к началу плодоношения. На стадии коричневой пленки нами были выявлены лектины с углеводной специфичностью к *L-D*-меллибиозе, характерные только для данной морфоструктуры. Активность лектинов была очень высока, с титрами гемагглютинации от 1:256 до 1:65536. Они имели в своем составе мажорные полипептиды Мм 24, 30 и 38 кДа. Мы установили, что при нанесении лектина коричневой пленки на растущий мицелий гриба происходит ускорение процесса образования примордиев. Таким образом, впервые выявлено положительное влияние лектина коричневой пленки на ускорение морфообразования. Возможно, что переход от одной стадии развития к другой регулируется присутствием и активностью в клеточных структурах маркерных молекул, роль которых выполняют лектины.

Кроме того, нами установлено, что коричневая пленка *L. edodes* F-249 имеет существенные отличия от других стадий развития гриба по составу и активности ферментов фенолоксидазного комплекса, в частности лакказ. Впервые показана способность внутриклеточных лектинов шиитаке оказывать влияние на активность собственных лакказ. Было установлено, что лектины коричневой пленки при инкубации с лакказами, выделенными из мицелия гриба, активировали ферменты, что дает основание говорить о регуляторной деятельности лектинов в работе ферментных систем и организма в целом.

**PROTEINS OF THE BROWN MYCELIAL FILM OF THE  
BASIDIOMYCETE *LENTINUS EDODES* WITH PHENOL OXIDASE  
AND LECTIN ACTIVITIES**

***Vetchinkina E.P., Nikitina V.E.***

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS,  
Saratov, Russia

E-mail: elenavetrus@yandex.ru

Fax: (8452) 97-03-83; tel.: (8452) 97-04-44

The basidiomycete *Lentinus edodes* (shiitake) is valued worldwide as a high-quality edible and medicinal fungus. The keen demand for this product in the food and pharmaceutical markets makes the study of the physiological-biochemical peculiarities of *L. edodes* and the increase in its production a topical problem. The brown mycelial film is a characteristic stage in the morphogenesis of this culture. The film is formed immediately before the onset of fruiting. Our observations suggest that fruiting bodies do not grow fully without the preliminary formation of the film. To understand the mechanisms regulating the formation of fruiting bodies, we believe it important to reveal and analyze proteins characterizing the morphological structures that come before *L. edodes* fruiting.

We found that the protein composition of the brown film differed considerably from the compositions observed at other stage in *L. edodes* development, attesting that these proteins are of some functional importance and that their synthesis may serve as a signal to start fruiting.

At the brown-film stage, we revealed lectins characteristic only of this morphostructure. The lectins had carbohydrate specificity for *L-D*-melibiose. These lectins were highly active, with hemagglutination titers ranging from 1:256 to 1:65536. They included, as part of their structure, major polypeptides with Mm of 24, 30, and 38 kDa. We found that when the brown-film lectin was applied on the growing fungal mycelium, primordium formation accelerated. That is to say, this is the first time that a positive effect of the brown-film lectin on the acceleration of morphoformation. Possibly, the transfer from one developmental stage to the next is regulated by the presence and activity of marker molecules in the cellular structures, whose role may be played by lectins.

In addition, we established that the brown-film stage in *L. edodes* F-249 differed substantially from other developmental stages in the composition and activity of enzymes of the phenol oxidase complex, specifically laccases. We showed, for the first time, that the intracellular lectins of shiitake could influence the activity of the fungus's own laccases. We found that when incubated with the laccases isolated from the fungal mycelium, brown-film lectins activated the enzymes, giving grounds to speak of a regulatory role of the lectins in the functioning of the enzyme systems and organism as a whole.

**РОЛЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ ДЕГРАДАЦИИ В СУПРЕССИИ PDCD4 В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ РАКА ЛЕГКИХ И МЕЛАНОМАХ**

***Вихрева П.Н., Коробко Е.В., Коробко И.В.***

Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

E-mail: polina266@gmail.com

Факс: (499) 135-41-05; тел.: (499) 135-99-70

Pdcd4 является супрессором опухолевого роста, уровень которого часто снижен в опухолях различного происхождения, что делает его привлекательной мишенью для генной терапии опухолей. Супрессия Pdcd4 в опухолях происходит из-за ингибирования транскрипции, микроРНК *miR21*-зависимой деградации транскрипции и ингибирования трансляции, а также в результате протеасомной убиквитин-зависимой деградации белка, вызываемой активацией PI3K/Akt/mTOR-сигнального пути. В этой работе мы исследовали роль PI3K/Akt/mTOR-зависимой деградации Pdcd4 в общей супрессии Pdcd4 в опухолевых клетках рака легких и меланомах, а также супрессию Pdcd4 в меланомах. В результате проведенного анализа было установлено, что уровень белка Pdcd4 часто снижен в клетках меланом по сравнению с нормальными меланоцитами (снижение >2 раза в 7 из 23 исследованных клеточных линий меланом). В 5 из 9 случаев ингибирование PI3K и mTOR вызывали значительное (>2.5 раз) увеличение уровня белка Pdcd4. В клеточных линиях рака легких при аналогичном ингибировании также часто наблюдалось увеличение уровня белка Pdcd4 (в 6 из 8 исследованных клеточных линий). Таким образом, как и в других исследованных ранее опухолевых клетках, Pdcd4 часто супрессирован в меланомах. При этом PI3K/Akt/mTOR-зависимая протеолитическая деградация вносит существенный вклад в супрессию Pdcd4 в опухолевых клетках рака легких и меланом, и этот факт должен быть учтен при разработке новых терапевтических подходов в лечении опухолей легких и меланом, основанных на восстановлении функций Pdcd4 в опухолевых клетках.

**ROLE OF PROTEOLYTIC DEGRADATION IN PDCD4 SUPPRESSION IN LUNG CANCER CELLS AND MELANOMAS**

***Vikhreva P.N., Korobko E.V., Korobko I.V.***

Institute of Gene Biology RAS, Moscow, Russia

E-mail: polina266@gmail.com

Fax: (499) 135-41-05; tel.: (499) 135-99-70

Pdcd4 is a tumor suppressor which is frequently down-regulated in various tumors thus making Pdcd4 an attractive target for anti-neoplastic therapy. Suppression of Pdcd4 occurs due to transcriptional silencing, *miR21* microRNA-dependent transcript degradation and inhibition of translation, and also because of proteasomal ubiquitin-dependent Pdcd4 protein degradation directed by PI3K/Akt/mTOR-signaling pathway. We investigated the role of PI3K/Akt/mTOR-dependent degradation of Pdcd4 in Pdcd4 suppression in lung cancer and melanoma cell lines and assayed if Pdcd4 is down-regulated in melanomas. We found that similarly to other tumor types, Pdcd4 is frequently suppressed in melanoma cells when compared to normal melanocytes (down-regulation >2-fold in 7 of 23 studied melanoma cell lines). In 5 out of 9 studied melanoma cell lines PI3K and mTOR inhibition resulted in significant (>2.5 times) increase in Pdcd4 protein level. Similarly to melanoma cell lines, in lung cancer cells PI3K and/or mTOR inhibition often (in 6 out of 8 assayed cell lines) up-regulated Pdcd4 protein. Summarizing, similarly to other studied types of tumors, Pdcd4 is often suppressed in melanomas. At the same time, PI3K/Akt/mTOR-dependent degradation can significantly contribute to Pdcd4 suppression in lung cancer and melanoma. This observation should be taken into account when developing new therapeutic approaches to treat lung cancer and melanoma which are based on the restoring of Pdcd4 activity in tumor cells.



## ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРМЕАБИЛИЗАЦИИ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЛАТАРЦИНА Ltc2a

Воронцова О.В.\*\*\*, Арсеньев А.С.\*, Кирпичников М.П.\*\*\*,  
Феофанов А.В.\*\*\*

\*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

\*\*Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия  
E mail: layelleth@mail.ru

Антимикробный пептид латарцин Ltc2a из яда паука *Lachesana tarabaevi* вызывает гемолиз, гибель лимфоцитов человека и клеток рака крови *in vitro*. Способность Ltc2a вызывать вытекание красителя из липосом позволяет предположить, что гибель клеток связана с индуцированной пептидом пермеабиллизацией плазматической мембраны. В данной работе мы представляем результаты исследования пермеабиллизации плазматической мембраны эритроцитов человека и клеток эритролейкоза K562 под действием Ltc2a. Размер мембранных дефектов оценивали по проникновению в клетки флуоресцентно-меченных декстранов (FD) разного размера. Впервые с использованием лазерной сканирующей конфокальной микроскопии реализована методика изучения воздействия мембранотропного пептида на живые клетки в динамике при одновременном наблюдении за морфологией клетки, процессами мембранного связывания и интернализации флуоресцентно-меченного пептида, а также проницаемостью мембраны для FD и йодистого пропидия (PI).

Установлено, что небольшие мембранные дефекты, проницаемые для кальцеина и FD-4 кДа, но не проницаемые для FD-10 кДа (гидродинамические диаметры 1,6, 2,8 и 3,7 нм, соответственно), образуются после начала связывания Ltc2a на мембране клеток K562, на стадии интенсивного накопления пептида внутри клеток. Таким образом, размер дефектов на начальных этапах пермеабиллизации меньше 3,7 нм. При этом клетки остаются непроницаемыми для PI. FD-4 кДа проникает в цитоплазму в значительно меньшем количестве, чем кальцеин, что свидетельствует о коротком времени жизни самых крупных на данной стадии дефектов.

На более поздних стадиях размер дефектов в мембране увеличивается, и они становятся проницаемыми как для PI (классического маркера мертвых клеток), так и для FD с Мм до 70 кДа включительно. Отметим, что декстраны крупнее 10 кДа проникают не во все клетки, окрашенные PI, и доля проницаемых клеток уменьшается с увеличением размера декстрана. Так, FD-70 кДа (гидродинамический диаметр 13 нм) проникает только в 40% PI-положительных клеток, в 60% PI-положительных клеток размер мембранных дефектов меньше 13 нм, но больше 3,7 нм.

В мембранах эритроцитов при гемолизе должны образовываться дефекты размером не меньше 6,4 нм (гидродинамический диаметр гемоглобина). Однако, добавление 50 мМ ПЭГ-1000 (гидродинамический диаметр 2 нм) ингибирует гемолиз, вызываемый Ltc2a. Сахароза или

раффиноза в тех же концентрациях не влияют на эффективность гемолиза. Следовательно, на ранних стадиях взаимодействия Ltc2a с эритроцитами формируются мембранные дефекты размером менее 2 нм, проницаемые для сахарозы и раффинозы, но не проницаемые для ПЭГ-1000, который препятствует образованию более крупных дефектов за счет поддержания положительного осмотического давления, сжимающего эритроцит. Мембраны тений эритроцитов, несущие большое количество Ltc2a, пропускают декстраны с Мм до 40 кДа включительно. FD-70 кДа проникает в тени в значительно меньшем количестве, чем FD-40 кДа. Эффективность проникновения FD-70 кДа сильно варьирует от клетки к клетке. Таким образом, в случае эритроцитов, как и в случае клеток K562, диаметр дефектов на конечных стадиях взаимодействия Ltc2a с клеткой увеличивается и составляет около 13 нм.

Мы предполагаем, что дефекты, индуцируемые в плазматической мембране эукариотической клетки латарцином Ltc2a, – это динамические образования, размер которых изменяется в процессе воздействия пептида на клетку.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 07-04-01166.

## STUDY ON PERMEABILIZATION OF AN EUKARYOTIC CELLS' PLASMA MEMBRANE BY LATARCIN Ltc2a

Vorontsova O.V.\*\*\*, Arseniev A.S.\*, Kirpichnikov M.P.\*\*\*, Feofanov A.V.\*\*\*

\*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

\*\*Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

E mail: layelleth@mail.ru

Latarcin Ltc2a, an antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lachesana tarabaevi*, induce hemolysis, kill human leukocytes and cancer cells of several types *in vitro*. The ability of Ltc2a to disrupt liposomes allows us to associate cell death with plasma membrane damage by the peptide. This report concerns permeabilization of plasma membrane of erythrocytes and erythroleukemic K562 cells upon influence of Ltc2a. The size of permeable membrane defects was estimated by influx of fluorescently labeled dextrans (FDs) into the cells. For the first time membranotropic action of a peptide was examined on living cells in dynamics using laser scanning confocal microscopy with simultaneous viewing of cell morphology, binding and internalization of a fluorescently labeled peptide together with permeability of the plasma membrane to FDs and propidium iodide (PI).

Membrane defects that transmit calcein and FD-4 kDa but hold FD-10 kDa out (hydrodynamic diameters 1.6, 2.8 and 3.7 nm correspondingly) are detected after beginning of Ltc2a binding to the membrane of K562 cells during the peptide internalization. Therefore at early stages of permeabilization the defects are smaller than 3.7 nm. At the same time cells stay impermeant for PI. Significantly less amount of FD-4 kDa than of calcein penetrates into the cells, indicating short lifetime of the largest defects.

At the later stages membrane defects increase in size allowing passage of FDs up to 70 kDa as well as PI. But FDs heavier than 10 kDa enter into a part of cells and this part decreases with increase in FD's size. Thus FD-70 kDa (hydrodynamic diameter 13 nm) penetrates into 40% of PI-positive cells while 60% of PI-positive cells have membrane defects smaller than 13 nm in diameter but larger than 3.7 nm.

During hemolysis defects larger than 6.4 nm (hydrodynamic diameter of hemoglobin) must be formed in membranes of erythrocytes. However, 50 mM PEG-1000 (hydrodynamic diameter 2 nm) inhibits hemoglobin leakage, while sucrose or raffinose at the same concentrations doesn't affect the hemolysis. We conclude that early in the latarcin's action on erythrocytes' membrane defects smaller than 2 nm appear. Those defects are permeant for sucrose and raffinose but impermeant for PEG-1000, which prevent formation of larger defects through retention of membrane compression by osmotic pressure. Membranes of ghosts allow passage of FDs up to 40 kDa. Thus in erythrocytes as well as in K562 cells the diameter of defects increase up to about 13 nm at later stages of the latarcin's action. We suppose the defects induced by Ltc2a in plasma membrane of eukaryotic cells to be dynamic structures those sizes change with the development of the peptide action.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Researches (grant N 07-04-01166).

## АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГОССИПОЛА И ЕГО АСИММЕТРИЧНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

Гайбобов У.Г., Сонькина С.Н., Тилибаев К.З., Салахутдинов Б.А.

Институт биоорганической химии им. академика А.С. Садыкова, АН РУз, Ташкент, Узбекистан

E-mail: ibchem@uzsci.net

Госсипол, желтый полифенольный пигмент, получаемый из семян хлопчатника, обладает многими важными биологическими свойствами, такими как противовирусное, противоаллергенное, противораковое и многие другие. Известно, что госсипол и его производные, в частности, асимметричные монозамещенные производные (моноаминогоссипол (МАГ), моноанилиногоссипол (МАНГ), полурагосин (ПР), полубатриден (ПБ)), в которых соответствующие радикалы замещены на одну альдегидную группу, обладают также антиоксидантным и антирадикальным свойствами.

Антирадикальную активность госсипола и его производных определяли стандартным методом, измеряя изменение оптической плотности спиртового раствора свободного радикала ДФПГ (1,1-дифенил-2-пикрилгидразил) в течение 25 минут. Спиртовый раствор ДФПГ имеет темно-фиолетовый цвет, его оптическая плотность принимается за контроль. При добавлении исследуемого вещества в раствор, молекула ДФПГ восстанавливается, оптическая плотность раствора при этом понижается. Таким образом, можно судить о том, что добавленное в раствор вещество обладает антирадикальной активностью.

В ходе экспериментов было установлено, что госсипол и его производные в значительной мере обладают антирадикальными свойствами. Анализируя полученные кривые, нами был сделан вывод, что наиболее активным среди изученных веществ оказался сам госсипол, тогда как его монозамещенные производные показали меньшую антирадикальную активность.

Такое поведение исследуемых веществ может быть связано со структурными особенностями госсипола и его производных. Так, монопроизводные госсипола имеют в молекуле одну альдегидную группу, тогда как в молекуле госсипола - две такие группы. С уменьшением количества альдегидных групп в молекуле антирадикальная активность резко снижалась, что может свидетельствовать о потенциальной возможности альдегидных групп в молекулах госсипола и его монозамещенных производных выступать в роли доноров электронов.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что антирадикальная активность госсипола и его производных коррелируется непосредственно с количеством альдегидных групп в молекуле. Однако, молекулярный механизм данной антирадикальной активности не изучен окончательно и требует дальнейших исследований.

## ANTIRADICAL ACTIVITY OF GOSSYPOL AND ITS ASYMMETRICAL DERIVATIVES

*Gayibov U.G., Sonkina S.N., Tilyabaev K.Z., Salakhutdinov B.A.*

Sadykov Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan

E-mail: [ibchem@uzci.net](mailto:ibchem@uzci.net)

Gossypol is a yellow polyphenolic pigment extracted from seeds of cotton. Gossypol has various valuable biological effects such as antifertile, antiparasitic, anticancer and other activities. Also, gossypol and its asymmetric derivatives (monoaminogossypol (MAG), monoanilinogossypol (MANG), semiragosyn (SR), semibatrigenin (SB)) where certain radical is substituted for aldehyde group possess antiradical (ARA) and anti-oxidant activity.

Antiradical activity of above-mentioned compounds has been studied by measuring the change in optical density of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ethanol solution during 25 minutes after adding compounds. DPPH ethanol solution is dark violet liquid, its optical density was accepted as a basis. When studied compounds are added into solution DPPH molecule reduces and the optical density of the solution decreases. Thus one can conclude that the studied compound possesses antiradical activity.

By analyzing kinetic curves of DPPH reduction with gossypol and its asymmetric derivatives it has been found that all the compounds show antiradical activity and gossypol itself has the highest one. Such behaviour of gossypol and its derivatives is probably associated with their structural features. Thus, gossypol molecule has two aldehyde groups while its derivatives have in their molecules only one aldehyde group. So the more aldehyde groups are there in the molecule the higher ARA it reveals. We propose that the number of aldehyde groups correlates with antiradical activity of gossypol and its asymmetrical derivatives.

Therefore, aldehyde fragments are extremely responsible for exhibiting ARA by interacting with structures having unpaired electrons like DPPH. However detailed mechanism of this activity is still unclear and more researches are required.

## БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В МЕМБРАНЕ: ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ФРАГМЕНТОВ РЕЦЕПТОРНЫХ ТИРОЗИНКИНАЗ ДЛЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

*Гончарук М.В.<sup>1,2</sup>, Ермолюк Я.С.<sup>1,3</sup>, Шульга А.А.<sup>1,4</sup>, Гончарук С.А.<sup>1,2</sup>, Ткач Е.Н.<sup>1,4</sup>, Пустовалова Ю.Е.<sup>1</sup>, Арсеньев А.С.<sup>1</sup>, Кирпичников М.П.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>3</sup>Институт нейрологии Университетского Колледжа Лондона, Лондон, Великобритания

<sup>4</sup>Центр "Биоинженерия" РАН, Москва, Россия

E-mail: [ms.goncharuk@gmail.com](mailto:ms.goncharuk@gmail.com)

Факс: (495) 335-50-33; тел.: (495) 330-74-83 доб.127

Рецепторные тирозинкиназы занимают центральное место в ключевых процессах жизнедеятельности клетки. С дисфункцией этих белков связывают многие болезни человека (канцерогенез, гипертония, диабет и пр.). Значительная часть современных исследований лекарственных препаратов направлена на рецепторные протеинкиназные системы, тем не менее, детальные механизмы функционирования этих рецепторов еще до конца не изучены. В качестве объектов исследования нами были выбраны рецепторы, относящиеся к трем семействам тирозинкиназ: рецепторы эпидермального фактора роста (ErbB1-ErbB4), эфринные рецепторы (EphA1, EphA2) и рецептор фактора роста фибробластов в норме (FGFR3) и патологии (с точечными мутациями G380R и A391E). Трансмембранные (ТМ) домены этих рецепторов, участвуя в их гомо- и гетеродимеризации, играют важную роль в развитии онкогенных процессов, различных нарушений строения скелета человека и др. Нами разработана методика получения ТМ доменов рецепторных тирозинкиназ (ТМ пептидов), а также их изотопно-меченных (<sup>15</sup>N-, <sup>13</sup>C-) производных, в миллиграммовых количествах для структурно-функциональных исследований. Понимание аспектов, связанных с ролью ТМ доменов в активации и функционировании рецепторных тирозинкиназ, расшифровка их пространственной структуры помогут понять на молекулярном уровне природу жизненно-важных процессов, происходящих в живой клетке, и заложат основу современного подхода к рациональному дизайну лекарственных препаратов нового поколения.

Для высокоуровневой бактериальной экспрессии синтетические гены всех ТМ пептидов экспрессировали в составе гибрида с тиоредоксином *A. E. coli*. Нуклеотидную последовательность каждого пептида собирали из химически синтезированных олигонуклеотидов и подсоединяли к 3'-концу гена тиоредоксина А при помощи полимеразной цепной реакции. На стыке двух генов вводили нуклеотидные последовательности, кодирующие шесть гистидинов, сайт узнавания легкой цепи энтерокиназы человека, а также гибкие линкеры. На N- конце тиоредоксина А предусматривали H-tag,

устраняющий токсичность гибридного белка по отношению к клетке-хозяину. Итоговый синтетический ген каждого из гибридных белков клонировали в экспрессионный вектор pGEMEX-1 под транскрипционный контроль T7 промотора. Культивирование рекомбинантных штаммов *E. coli* проводили на минимальной солевой среде M9. При необходимости введения изотопных меток <sup>15</sup>N- или <sup>13</sup>C- использовали <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl или <sup>13</sup>C-глюкозу в качестве единственных источников азота или углерода, соответственно. Протокол выделения пептидов включал следующие последовательные стадии: металлохелатную аффинную хроматографию (МХАХ), гидролиз гибридного белка при помощи энтеропептидазы человека, повторную МХАХ и ионообменную хроматографию. Все этапы очистки проводились в присутствии 1% Тритона X-100. Для возможности проведения структурных исследований требовалось удаление детергента. Для этого пептиды вместе с Тритоном X-100 осаждали из раствора при помощи трихлоруксусной кислоты, а затем осадок трехкратно промывали ацетоном. Итоговый выход пептидов, а также их изотопно-меченных <sup>15</sup>N- и <sup>15</sup>N-/<sup>13</sup>C-производных составил, в среднем, около 7 мг/л культуры. Высокая степень очистки и идентичность всех полученных белков соответствующим целевым пептидам подтверждена при помощи гель-электрофореза и масс-спектрометрического анализа. Очищенные белковые препараты пригодны для получения структурно-динамической информации об их гомо- и гетеродимерных комплексах методом гетероядерной спектроскопии ЯМР высокого разрешения.

## PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS WITHIN THE MEMBRANE: PRODUCTION OF TRANSMEMBRANE FRAGMENTS OF RECEPTOR TYROSINE KINASES FOR STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STUDIES

*Goncharuk M.V.<sup>1,2</sup>, Ermolyuk Ya.S.<sup>1,3</sup>, Schulga A.A.<sup>1,4</sup>, Goncharuk S.A.<sup>1,2</sup>, Tkach E.N.<sup>1,4</sup>, Pustovalova Yu.E.<sup>1</sup>, Arseniev A.S.<sup>1</sup>, Kirpichnikov M.P.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Institute of Neurology, University College London, London, Great Britain

<sup>4</sup>Bioengineering Center RAS, Moscow, Russia

E-mail: ms.goncharuk@gmail.com

Fax: (495) 335-50-33; tel.: (495) 330-74-83#127

Receptor tyrosine kinases play a key role in vitally important biological processes occurring within the living cell. Malfunctions of these proteins lead to a wide variety of severe human diseases (oncogenesis, hypertension, diabetes and other). Considerable part of modern drugs is directed towards receptor protein kinase systems. However the detailed mechanism of action of these receptors has not been completely understood yet. We chose a set of protein tyrosine kinases from three families: epidermal growth factor receptors (ErbB1-ErbB4), Eph receptors (EphA1, EphA2) and fibroblast growth factor receptor in norma (FGFR3) and pathology (with G380R and A391E point mutations). Transmembrane (TM) domains of these proteins are involved into receptor homo- and heterodimers formation and development of different malignant types of human cancer, skeletal disorders, etc. We created a method for high-yield production of TM domains of receptor tyrosine kinases (TM peptides), including isotope labeled (<sup>15</sup>N-, <sup>13</sup>C-) derivatives, for their structural analysis by high resolution NMR spectroscopy and functional studies. An elucidation of the role of TM domains in activation and functioning of receptor tyrosine kinases, their spatial structure development would give a deep insight into the nature of important biological processes in the living cell, resulting in an effective and novel drug design.

For high-yield bacterial production, each TM peptide was fused to the C-terminus of thioredoxin A *E. coli*. Nucleotide sequences encoding TM peptide and appropriate fusion protein were obtained by polymerase chain reaction using chemically synthesized oligonucleotides. In order to facilitate purification, nucleotide sequences corresponding to a hexa-His tag, enterokinase cleavage site and flexible linkers were placed between synthetic genes encoding the thioredoxin A and TM peptide. An H-tag was introduced at the N-terminus of the fusion protein to reduce the toxicity against to the host cell. The nucleotide sequence encoding fusion protein was subcloned into expression vector pGEMEX-1 under the control of T7 promoter. Recombinant protein was expressed in *E. coli* BL21(DE3)pLysS cells in M9 minimal medium. For the production of uniformly <sup>15</sup>N- or <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C-labeled protein samples minimal medium containing <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl or <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl/[U-<sup>13</sup>C]glucose was taken. Hexa-His tagged fusion protein was purified by immobilized



metal-affinity chromatography (IMAC). Target TM peptide was released from thioredoxin A moiety by enterokinase cleavage. Hydrolyzate was purified by IMAC and pure target TM peptide was obtained employing ion exchange chromatography purification. All purification steps were carried out in the presence of 1% triton X-100. This detergent is inappropriate for subsequent NMR spectroscopy structural analysis. For this reason detergent removal step took place. Each purified peptide with Triton X-100 was precipitated by trichloroacetic acid followed by precipitate washing with acetone. The average yield of TM peptides and isotope-labeled  $^{15}\text{N}$ - и  $^{15}\text{N}$ -/ $^{13}\text{C}$ - derivatives was about 7 mg/l. Identity and purity of all target peptides were confirmed by gel electrophoreses, mass spectrometry. Purified protein samples were ready to undergo structure-dynamic characterization of their homo- and heterodimeric complexes employing the high-resolution NMR spectroscopy.

## БАКТЕРИАЛЬНЫЙ СИНТЕЗ И ОЧИСТКА МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА KCNE

*Гончарук С.А.<sup>1,2</sup>, Ермолюк Я.С.<sup>1,3</sup>, Шульга А.А.<sup>1,4</sup>, Тихонов Р.В.<sup>1</sup>, Арсеньев А.С.<sup>1</sup>, Кирпичников М.П.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>3</sup>Институт нейрологии Университетского Колледжа Лондона, Лондон, Великобритания

<sup>4</sup>Центр "Биоинженерия" РАН, Москва, Россия

E-mail: ms.goncharuk@gmail.com

Факс: (495) 335-50-33; тел.: (495) 330-74-83 доб.127

Белки семейства KCNE являются регуляторами потенциал-зависимых калиевых каналов, изменяя их проводимость, селективность, потенциалы активации, дезактивации и инактивации, чувствительность к лекарственным препаратам и др. Несмотря на то, что мутации в регуляторных субъединицах приводят к различным заболеваниям (аритмия, глухота, семейный периодический паралич), структурные особенности, лежащие в основе функционирования белков семейства KCNE, до сих пор еще не изучены. Главным образом, это связано с отсутствием достаточного количества белкового препарата для проведения структурных исследований. Основные проблемы, возникающие при биохимическом получении мембранных белков (МБ), обусловлены гидрофобностью их трансмембранных участков. До сих пор экспрессия и очистка каждого нового МБ для структурно-функциональных исследований остается сложной, а зачастую и вовсе неразрешимой задачей.

Нами были разработаны методики получения различных полноразмерных белков – представителей семейства KCNE (KCNE1; dKCNE1 – укороченный вариант KCNE1; KCNE3), а также их изотопно-меченных производных ( $^{15}\text{N}$ -,  $^{13}\text{C}$ -) в миллиграммовых количествах для проведения структурно-функциональных исследований. Для достижения высокого уровня экспрессии каждого из генов целевых белков созданы различные конструкции. В случае KCNE1 использована прямая система экспрессии. Для очистки белка на 3'-конце гена KCNE1 предусмотрена нуклеотидная последовательность, кодирующая шесть гистидинов (гистидиновый таг). В случае dKCNE1 и KCNE3 применена гибридная система экспрессии. В качестве белка партнера выбран тиоредоксин *E.coli*. Гибридные конструкции содержали нуклеотидные последовательности, кодирующие следующие элементы: тиоредоксин, гистидиновый таг, сайт расщепления высокоспецифичной протеиназы (энтерокиназы в случае dKCNE1 и тромбина в случае KCNE3) и гибкие линкеры. Собранные гены клонированы в экспрессионный вектор pGEMEX-1 под контроль T7 промотора. Процесс культивирования рекомбинантных штаммов (BL21(DE3)pLysS) оптимизирован для "богатой" и "бедной" сред (ТВ и М9,



соответственно). В процесс очистки dKCNE1 и KCNE3 включены следующие стадии: металлохелатная аффинная хроматография (МХАХ), гидролиз гибридного белка, повторная МХАХ и дополнительная хроматография (ионообменная – в случае dKCNE1; гидрофобная – в случае KCNE3). Очистка KCNE1 проведена с использованием МХАХ и гидрофобной хроматографии. Для получения чистого сухого образца фракции, содержащие очищенный белок, высушены под вакуумом. Высокая степень очистки и идентичность всех белков подтверждены при помощи гель-электрофореза и масс-спектрометрического анализа. Полученные белковые препараты dKCNE1, KCNE1 и KCNE3 пригодны для проведения структурно-динамических исследований методами гетероядерной спектроскопии ЯМР высокого разрешения.

## BACTERIAL SYNTHESIS AND PURIFICATION OF KCNE FAMILY OF MEMBRANE PROTEINS

*Goncharuk S.A.<sup>1,2</sup>, Ermolyuk Ya.S.<sup>1,3</sup>, Schulga A.A.<sup>1,4</sup>, Tikhonov R.V.<sup>1</sup>, Arseniev A.S.<sup>1</sup>, Kirpichnikov M.P.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Institute of Neurology, University College London, London, Great Britain

<sup>4</sup>Bioengineering Center RAS, Moscow, Russia

E-mail: ms.goncharuk@gmail.com

Fax: (495) 335-50-33; tel.: (495) 330-74-83#127

KCNE family of membrane proteins (MPs) are regulators of voltage-gated potassium channels. They contribute to function of the channels by influencing channel gating, ion selectivity, ion flux rate (single channel conductance); significantly affect the pharmacology of the channels. Mutations in regulatory subunits are associated with inherited and acquired diseases (arrhythmia, deafness, familial periodic paralysis). However structural basis of KCNE functioning is not known. This takes place mainly because of lack of substantial amounts of high quality MPs required for structural analysis. Key problems arise during biochemical obtaining of MPs. They are connected with the hydrophobic nature of transmembrane regions. Up to the moment expression and purification of new MP for structural and functional studies remains challenging task.

We developed efficient methods for production of milligram amounts of human full-length MPs, KCNE family members (KCNE1; dKCNE1 – truncated KCNE1; KCNE3), including isotope labeled (<sup>15</sup>N-, <sup>13</sup>C-) derivatives, for structural and functional analysis. To enhance the expression of target proteins genes, different constructs were created. For high-yield bacterial production of KCNE1, direct expression was utilized. In order to facilitate protein purification, nucleotide sequence encoding six histidines (His-tag) was introduced at the 3'- terminus of KCNE1 gene. For high-yield bacterial production of dKCNE1 and KCNE3, a thioredoxin *A. E. coli* fusion protein systems were used. In this case fusion protein genetic constructs contained following nucleotide sequences: thioredoxin, His-tag, protease cleavage site (dKCNE1: enterokinase; KCNE3: thrombin), flexible linkers. The constructed genes were cloned into expression vector pGEMEX-1 under control of T7 promoter. Parameters of cultivation of recombinant bacterial strains (BL21(DE3)pLysS) were optimized both for TB (Terrific Broth) and M9 (minimal salt) media. The dKCNE1 and KCNE3 were purified employing immobilized metal-affinity chromatography (IMAC), fusion protein hydrolysis, followed by IMAC and extra chromatography step (ion exchange chromatography for dKCNE1 and hydrophobic interaction chromatography for KCNE3). The KCNE1 protein was purified using IMAC and hydrophobic interaction chromatography. Pure target protein powders were obtained via vacuum drying. Identity and purity of all target proteins were confirmed by gel electrophoreses and mass spectrometry. Purified dKCNE1, KCNE1 and KCNE3 protein samples and their isotope-labeled (<sup>15</sup>N-, <sup>13</sup>C-) derivatives were ready to undergo structural and dynamical investigation of KCNE family members employing the high-resolution NMR spectroscopy.

## ВЛИЯНИЕ МУРАМИЛПЕПТИДА (ГМДП) НА НОРМАЛИЗАЦИЮ Th1/Th2 БАЛАНСА ПРИ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Гурьянова С.В., Мещерякова Е.А., Алексеева Л.Г., Андропова Т.М.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Очинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: svgur@mail.ru

Исходя из современных представлений о патогенезе атопической бронхиальной астмы (АБА), одним из ключевых моментов которого является гиперактивация Т-хелперов 2 типа (Th2) на фоне снижения активности Т-хелперов 1 типа (Th1), значительный практический интерес представляет поиск лекарственных препаратов, нормализующих Th1/Th2 баланс.

Целью данной работы была оценка влияния глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) на выработку основных цитокинов Th1 и Th2 стимулированными *in vitro* мононуклеарными клетками (МНК) периферической крови здоровых доноров и пациентов с АБА средней тяжести.

Для исследования использовали венозную кровь пациентов в возрасте от 22 до 42 лет с верифицированным диагнозом АБА средней тяжести, не получавших на протяжении последних 3-х месяцев системных и топических кортикостероидов или каких-либо других иммуотропных препаратов. Активность Th1 регистрировали по продукции ИФН- $\gamma$  стимулированными *in vitro* мононуклеарными клетками периферической крови здоровых доноров и пациентов с АБА средней тяжести; оценку активности Th2 производили в аналогичных условиях по количеству секретируемого ИЛ-4.

Показано, что ГМДП (*in vitro* в диапазоне концентраций 0,05-5 мкг/мл) модулирует пролиферацию ФГА- и анти-CD3-стимулированных мононуклеарных клеток здоровых доноров и больных АБА, а также дозозависимо увеличивает продукцию ими ИФН- $\gamma$  (в 3-8 раз). У больных АБА как нестимулированные, так и митоген-стимулированные мононуклеары существенно снижали секрецию ИЛ-4 в присутствии исследуемых концентраций ГМДП. Необходимо отметить, что активность ГМДП реализуется только в отношении активированных (аллергенами или митогенами) лимфоцитов и не проявляется на нестимулированных МНК.

Таким образом, обнаруженный в предыдущих клинических исследованиях положительный эффект иммуномодулятора Ликопада (действующее вещество ГМДП) на состояние больных АБА обусловлен его воздействием на патогенетический механизм аллергического воспаления и, в частности, на нормализацию Th1/Th2 баланса.

## EFFECT OF MURAMYL PEPTIDE GMDP ON NORMALIZATION OF Th1/Th2 BALANCE IN PATIENTS WITH ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA

Guryanova S.V., Meshcheryakova E.A., Andronova T.M.

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia  
E-mail: svgur@mail.ru

The key process leading to atopic bronchial asthma is hyper activation of T-helper 2 (Th2) accompanied with decreasing T-helper 1 (Th1) activity. Therefore a search for drugs normalizing Th1/Th2 balance is of considerable interest. In this study the effect of glucosaminylmuramyldipeptide (GMDP) on the production of main Th1 and Th2 cytokines was observed.

Th1 Activity was registered on IFN- $\gamma$  production by intact and stimulated with PHA (10 mkg/ml) and anti-CD3 (5 mkg/ml) *in vitro* mononuclear cells (MNC) from peripheral blood of healthy donors and patients with atopic bronchial asthma (ABA). Th2 Activity was evaluated on IL-4 secretion in the same conditions.

It was shown that GMDP (0,05-5  $\mu$ g/ml) *in vitro* modulates proliferation of PHA- and antiCD3-stimulated MNC from healthy donors and ABA patients and in dose dependent manner increases 3-8 fold production of IFN- $\gamma$ . It was also observed that muramyl peptide decreases secretion of IL-4 by MNC from ABA patients both non stimulated and mitogen-stimulated. This effect of muramyl peptide does not appear to be due to lack of co-stimulatory signals: MNC healthy donors do not react to GMDP in the absence of mitogens.

The above data suggests, that the positive clinical effect of immunostimulator Licopid (GMDP) on the patients with ABA, detected in previous investigations, results from normalization of the Th1/Th2 balance.

## ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ГИСТОНА H1.3

*Гусаров Д., Ласман В., Косарев С., Баирамашвили Д., Генкин Д. \*,  
Формичка-Цеппенцауер Г. \*\**

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

\*Lipoxen Plc, London Bioscience Innovation Centre, UK

\*\*SymbioTec GMBH, Germany

Гистоны участвуют в поддержании и изменении структуры хромосом на разных стадиях клеточного цикла, а также в регуляции активности генов. Гистоны – сильно основные белки, входящие в состав комплексов с ДНК. Линкерный гистон H1, который присутствует в клетке в меньшем количестве, чем остальные гистоны, играет роль агента, способствующего образованию поперечных связей в хроматине. Рекombинантные гистоны, в том числе H1, предложено использовать в противораковой терапии.

Целью данной работы была разработка простой и эффективной схемы получения активной фармацевтической субстанции рекombинантного гистона H1.3, синтезированного клетками *E. coli*.

Белок H1.3 был выделен из культуральной жидкости, полученной в результате культивирования штамма-продуцента *E. coli*, с помощью экстракции перхлорной кислотой. Надосадочная жидкость, содержащая кислото-растворимые белки, была отделена от осадка центрифугированием и хроматографически очищена. В качестве основного способа очистки использовалась обращенно-фазовая ВЭЖХ. На аналитическом уровне были подобраны оптимальные условия очистки, а именно: вид неподвижной фазы, состав подвижной фазы, тип градиентного изменения содержания подвижной фазы при элюировании. Продемонстрировано, что наилучшие результаты очистки достигаются при использовании макропористых силикагелевых сорбентов, модифицированных бутильным остатком. Показано, что хроматографическое поведение гистона H1.3 сильно зависит от pH подвижной фазы: с увеличением значения pH удержание белка сорбентом резко увеличивается. Наилучшие результаты были получены с использованием подвижных фаз, содержащих этиловый спирт в качестве органического модификатора, а также лимонной кислоты в качестве буферного агента. Разработан сложный градиент состава подвижной фазы, включающий одновременное изменение содержания этилового спирта и величины pH. Основная фракция, содержащая не менее 75% гистона H1.3 (от нанесенного количества), была затем осаждена этиловым спиртом. Осадок отделяли и перерастворяли в воде для инъекций. Затем полученный раствор очищали с помощью гель-фильтрации от низкомолекулярных примесей и высушивали под вакуумом. Активная фармацевтическая субстанция гистона H1.3 содержала менее 1% примесных родственных белков по данным ВЭЖХ анализа, менее 1% высокомолекулярных соединений по данным SEC анализа, менее 20 нг/мг белков клеток *E. coli* по данным ИФА. Разработанная схема была масштабирована до пилотного уровня. Субстанция гистона H1.3 была использована для получения готовых лекарственных форм препарата ONCOHIST, предназначенных для клинических испытаний.

## TECHNOLOGY OF THE PRODUCTION OF RECOMBINANT HISTONE H1.3

*Gusarov D., Lasman V., Kosarev S., Bairamashvili D., Genkin D. \*,  
Formicka-Zeppenauer G. \*\**

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow,  
Russia

\*Lipoxen Plc, London Bioscience Innovation Centre, UK

\*\*SymbioTec GMBH, Germany

Histones are involved in interactions with chromosomes during cell cycle. These proteins are highly basic due to enrichment of lysine residues. Linker histone H1 type in cells plays role of an agent which promotes transverse bonds in chromatin. Recombinant histone proteins, including H1 type, are suggested to be utilized in anticancer therapy.

The main goal of the present work was to develop an efficient technology of the production of active pharmaceutical ingredient (API) of recombinant histone H1.3, which primarily synthesized in *E. coli*.

The protein H1.3 was separated from culture broth obtained as a result of strain cultivation and fermentation by means of extraction with perchloric acid. Supernatant which contained target protein was separated by centrifugation. Further, proteins were captured from supernatant and purified by chromatographic methods. As a key step of purification we decided to choose reverse-phase chromatography, RPC. At analytical level the optimization of RPC process was performed, evaluating the influence of stationary phase type, mobile phase content and gradient elution mode. It was proved that the best results can be obtained utilizing silica sorbent with macropores and butyl lipophilicity. It was shown that histone retention on RPC media is strongly influenced with pH of mobile phase. The best separation results were obtained with mobile phase containing ethanol as an organic modifier and citric acid as an acidifier. The developed mode of elution contained negative gradient of pH and positive gradient of organic modifier. The main fraction of RPC yields approximately 75% and then was precipitated with ethanol. The pellet was solubilized and purified from low molecular weight components by means of size-exclusion chromatography. The product obtained was then dried in vacuum and analyzed. It was shown that API contains no more than 1% of histone-like impurities (HPLC test), up to 1% of high molecular mass admixtures (SE HPLC test), no more than 20 ng/mg of host derived proteins (ELISA test).

The developed technology was successfully scaled-up to pilot level. The API of histone named ONCOHIST was implemented to be used in clinical trials.

## ПОЛУЧЕНИЕ ПЕПТИДНЫХ ФРАКЦИЙ С ЗАДАННОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ

*Данилов И.М., Забодалова Л.А., Скворцова Н.Н.*

ГОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный университет  
низкотемпературных и пищевых технологий, Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: Danilov-ivan-86@mail.ru; Zabodalova@inbox.ru  
Тел.: (812) 764-47-88; (904) 612-99-02

Целью данной работы является исследование влияния условий ферментативного гидролиза на процесс накопления фракции низкомолекулярных пептидов (НМП, 500-6000 Да).

На начальном этапе эксперимента в качестве протеолитического агента использовался изолированный ферментный препарат "Панкреатин". Им оценивались методом эксклюзионной гель-хроматографии на Sephadex G-75. Изменению подвергались такие параметры, как фермент-субстратное соотношение, температура и продолжительность ферментации, уровень активной кислотности во время термостатирования. За контрольный принят образец, который подвергался ферментации в течение 48 ч при  $50 \pm 2^\circ\text{C}$ , фермент-субстратное соотношение 1:100, без использования рН-статирования в процессе ферментации.

Установлено, что проведение ферментативного гидролиза с целью получения НМП рациональнее вести при таких параметрах: фермент-субстратное соотношение 1:1000, температура и продолжительность ферментации  $50 \pm 2^\circ\text{C}$  и 4 ч, соответственно, без использования рН-статирования.

Кроме того, была изучена возможность получения НМП путем сквашивания молока заквасками смешанного брожения: кефирной, кумысной, курунговой. Молекулярные массы фракций на хроматограммах кумыса и курунги соответствуют 6 и 6,5 кДа, соответственно, причем фракция высокомолекулярных пептидов присутствует лишь в следовых количествах, что говорит о более полном гидролизе белков. На хроматограмме кефира обнаружены фракция не гидролизовавшихся белков и фракция пептидов с Мм 6,8 кДа. Кроме того, происходит накопление пептидов с промежуточными Мм 8-10 кДа, фронт выделения которых сильно перекрывается с пиком выделения фракции пептидов (8-10 кДа), которые могут помешать дальнейшему разделению и очистке необходимой фракции.

Таким образом, для дальнейшего изучения в качестве протеолитического агента были отобраны курунговая и кумысная закваски.

## RECEPTION PEPTIDE FRACTIONS IN THE SET MOLECULAR MASS

*Danilov I.M., Zabodalova L.A., Skvortsova N.N.*

St.-Petersburg State University of Low-Temperature and Food Technologies,  
St.-Petersburg, Russia  
E-mail: Danilov-ivan-86@mail.ru; Zabodalova@inbox.ru  
Tel.: (812) 764-47-88; (904) 612-99-02

The purpose of the given work is research of conditions influence of enzymatic hydrolysis on process of accumulation of fraction low-molecular peptides 500-6000 Da.

At the experiment initial stage in quality of proteolytic agent isolated enzymatic preparation "Pancreatin" was used. Molecular-mass distribution of the enzymatic hydrolyzate was estimated by a method exclusion gel-penetrating chromatography with Sephadex G-75. Such parameters as enzyme-substrate a parity, temperature and duration of fermentation, level of active acidity during time fermentation were exposed to change. For the control the sample fermented during 48 h is accepted, at  $50 \pm 2^\circ\text{C}$ , enzyme-substrate parity 1:100, without use pH-stating in the course of fermentation.

It is established, that carrying out enzymatic hydrolysis for the purpose of reception low-molecular peptides is more rational for conducting at such parameters: enzyme-substrate a parity 1:1000, temperature and duration of fermentation  $50 \pm 2^\circ\text{C}$  and 4 h accordingly, without use pH-stating.

Then possibility of reception low-molecular peptides by ripening milk has been studied by ferments of the mixed fermentation: kefirnaya, koumisnaya, kuryngovaya. Molecular masses of fractions on chromatogram koumiss and kurynga correspond 6 and 6,5 kDa, and the fraction high-molecular peptides is present only in track quantities that speaks about fuller hydrolysis of fibers. On chromatogram kefir there is a fraction of not hydrolyzed fibers, fraction of peptides with molecular mass 6,8 kDa. Besides, there is an accumulation of peptides to intermediate molecular masses (8-10 kDa) which front of allocation, is strongly blocked with peak of allocation of fraction peptides (8-10 kDa) which can prevent the further division and clearing of necessary fraction.

Thus, for the further studying in quality proteolytic the agent has been selected kuryngovaya and koumisnaya leaven.

## АКТИВАЦИЯ МЕМБРАННОЙ РЕЦЕПТОРНОЙ ТИРОЗИНКИНАЗЫ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО pH

*Деев И.Е., Серова О.В., Попова Н.В., Петренко А.Г.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: deyevie@ibch.ru

Классическим способом активации рецепторных тирозинкиназ является автофосфорилирование внутриклеточных частей этих рецепторов в результате взаимодействия внеклеточной части рецепторов с их лигандом. Для большинства рецепторных тирозинкиназ взаимодействие с лигандом приводит к димеризации мономеров рецептора, исключение составляют три члена семейства: инсулиновый рецептор IR (инсулиновый рецептор), IGF-IR (инсулино-подобный фактор роста рецептор) и IRR (инсулин рецептор-подобный рецептор). Эти рецепторы димеризованы при помощи цистеиновых мостиков между мономерами. Лигандами для IR и IGF-IR являются, соответственно, инсулин и инсулино-подобный фактор роста. Рецептор IRR относится по гомологии и общему строению к семейству инсулинового рецептора, но его лиганд до сих пор не был найден, хотя IRR был открыт еще в 1989 году.

Нами выявлено уникальное свойство рецептора IRR активироваться под воздействием внеклеточной щелочной среды. Было показано, что данное свойство специфично для этого рецептора, активация IRR обратима и приводит к изменению его конформации. Рецептор IRR активируется в районе pH от 8.0 до 9.0 с величиной полуэффекта около 8.4. Показано, что ортологи IRR лягушки и мыши также активируются под действием щелочного pH. Фосфорилирование IRR приводит к активации внутриклеточных сигнальных белков (INS-1, АКТ-1) и изменению цитоскелета клеток.

Мы провели поиск других фосфобелков, способных фосфорилироваться при увеличении pH внешней среды. Используя иммуно-аффинную хроматографию на антителах против фосфотирозина с дальнейшей идентификацией белков при помощи масс-спектрометрии, мы обнаружили активацию рецепторной тирозинкиназы с-Met при обработке клеток средой с щелочным pH. Для данного рецептора известен лиганд, получивший название HGF (фактор роста гепатоцитов). Используя антитела против с-Met рецептора и его фосфорилированной формы, мы подтвердили его активацию при увеличении внеклеточного pH. Также нами показано, что щелочная активация с-Met не связана с выбросом HGF во внеклеточную среду, и уровень активации зависит от типа клеток, в которых экспрессируется с-Met.

Таким образом, мы обнаружили новый способ специфической активации тирозинкиназных рецепторов, отличный от ранее известных молекулярных механизмов.

## ACTIVATION OF RECEPTOR TYROSINE KINASES BY EXTRACELLULAR pH

*Deyev I.E., Serova O.V., Popova N.V., Petrenko A.G.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia  
E-mail: deyevie@ibch.ru

We identified the cell surface receptor that is activated by mildly alkaline media both *in vitro* and *in vivo* at pH>8.0 and thus may serve as an external pH sensor. Surprisingly, this protein is the insulin receptor-related receptor (IRR), an orphan receptor-like tyrosine kinase of the insulin receptor family. Unlike IRR, the insulin receptor and closely related insulin-like growth factor receptor have ligands of the peptide nature and do not respond to pH changes. The alkali-sensing property of IRR is conserved in frog, mouse and human. We postulate that the hydroxyl ion is a natural agonist of IRR because IRR activation by alkaline media is specific, dose-dependent, reversible, requires the receptor ectodomain and is accompanied by a conformational change in the entire receptor molecule. The alkaline stimulation of IRR triggers the intracellular signaling that involves insulin receptor substrate and AKT/PKB, and results in actin cytoskeleton remodeling.

Our identification of IRR as a pH sensor is quite intriguing taking into account the high similarity of the amino acid sequences (about 50% identity and 65% similarity for both IGF-IR and IR) and predicted structural domain organization of the ectodomains of IRR, IR and IGF-IR. Also, all of the receptor tyrosine kinase ligands that have been identified so far in both vertebrates and invertebrates are proteins. The generally accepted paradigm is that a multipoint macromolecular ligand-receptor interaction is required to trigger dimerization-induced activation of a receptor tyrosine kinase (in the case of the insulin receptor family the subunits are pre-dimerized by disulfide bonds). Whereas an alkali-sensing ion channel has been described previously, IRR is the first example of the metabotropic receptor that can be activated by alkaline media. Given that no peptide or protein ligand of IRR has been found yet, our data suggest that hydroxyl anion may be an endogenous agonist of IRR.



## ИЗУЧЕНИЕ ФОТОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЗАМЕЩЕННЫХ ИЗОКСАЗОЛОВ, СОДЕРЖАЩИХ ФОТОХРОМНЫЙ ФРАГМЕНТ

*Демина О.В.\**, *Лаптев А.В.\**, *Беликов Н.Е.\*\**, *Лукин А.Ю.\*\**,  
*Земцов Р.В.\*\**, *Ходонов А.А.\*\*\**, *Варфоломеев С.Д.\**

\*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

E-mail: [ibcp@sky.chph.ras.ru](mailto:ibcp@sky.chph.ras.ru)

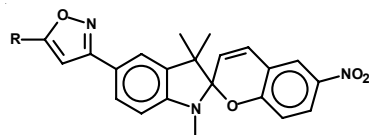
Факс/тел.: (495) 939-71-48

\*\*Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Постгеномные исследования возможных механизмов функционирования рецепторно-ферментативных систем в клетках являются наиболее важными в настоящее время. Детальное изучение каждой стадии в таких сложных системах требует применения многих методик, используемых в молекулярной биологии, биоорганической и органической химии, и аккуратной интерпретации результатов.

Использование органических молекул для нефлуоресцентного мечения в ультрафиолетовой и видимой областях является одним из подходов при исследовании взаимодействия лиганд – рецептор. Этот подход требует применения небольших органических соединений, обладающих фотохромными свойствами в строго ограниченном диапазоне длин волн, который определяется параметрами прибора и свойствами клетки.

Одной из важных проблем фундаментальной и прикладной наук является направленная (селективная) регуляция системы гемостаза человека, поскольку смертность от сердечно-сосудистых заболеваний занимает в настоящее время первое место в мире. Ранее мы показали, что некоторые соединения класса 3,5-замещенных изоксазолов являются возможными антиагрегантами. Мы синтезировали два аналога 3,5-замещенных изоксазолов, содержащих спиропирановый фрагмент в положении 3 изоксазольного кольца для определения фармакофорного фрагмента молекулы и установления механизма действия этого класса веществ в дальнейшем. Фотохимия этих соединений была изучена при помощи нескольких фотохимических методов.



(1) R = CH<sub>2</sub>OH

(2) R = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

Работа была частично поддержана грантами РФФИ (проекты № 09-03-00565 и № 09-04-01003).

## STUDY OF PHOTOCHEMICAL PROPERTIES OF SUBSTITUTED ISOXAZOLES CONTAINED PHOTOCROMIC MOIETY

*Demina O.V.\**, *Laptev A.V.\**, *Belikov N.E.\*\**, *Lukin A.Yu.\*\**, *Zemtsov R.V.\*\**,  
*Khodonov A.A.\*\*\**, *Varfolomeev S.D.\**

\*Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, Russia

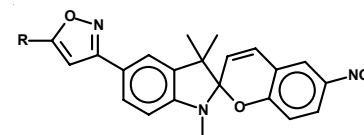
E-mail: [ibcp@sky.chph.ras.ru](mailto:ibcp@sky.chph.ras.ru)

Fax/tel.: (495) 939-71-48

\*\*Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow, Russia

Postgenomic studies of possible action mechanisms of receptor-enzymatic systems in cells are the most important now. The detail investigation of each stage in such complex systems requires of the application of many techniques used in molecular biology, bioorganic and organic chemistry and careful interpretation of results. The usage of organic molecules for non-fluorescent labeling in the ultraviolet and visible regions is one of approaches for the investigation of ligand – receptor interaction. This approach requires to use small organic compounds possessed photochromic properties at strongly limited range of waves-lengths, which is determined by device parameters and cell properties.

One of the important problems of fundamental and applied sciences is selective regulation of human hemostasis system, since the mortality from cardio-vascular diseases takes first place in the world. We shown earlier, that a number of compounds of 3,5-substituted isoxazoles class were potent anti-aggregatory agents. We synthesized two 3,5-substituted isoxazole analogs contained spiropyrane moiety at 3-position of isoxazole ring for the definition of molecule pharmacophore fragment and determination of action mechanism of this class compounds in future. The photochemistry of these compounds was studied with several photochemical methods.



(1) R = CH<sub>2</sub>OH

(2) R = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

This work was partly supported by RFBR grants (projects N 09-03-00565 and N 09-04-01003).

## БИОТЕХНОЛОГИЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ

*Каленик Т.К., Долгова Т.Г., Грищенко В.В., Гришин А.С.*

Тихоокеанский государственный экономический университет,  
Владивосток, Россия  
E-mail: ipttgr@rambler.ru  
Факс/тел.: (4232) 43-40-55

Белки в питании человека занимают особое место. Они выполняют ряд специфических функций, свойственных только живой материи. Белковые вещества наделяют организм пластическими свойствами и обеспечивают обмен между организмом и окружающей средой. Примерно треть источников полноценных белков в рационе питания россиян приходится на продукты из гидробионтов.

Нами были изучены многокомпонентные продукты, разработанные на основе двухстворчатых моллюсков (клем). По содержанию белка эти моллюски относятся к группе среднебелковых гидробионтов. В процессе проведения исследований было обнаружено, что в изучаемом продукте присутствовали аминокислоты в количествах, превышающих рекомендуемые ФАО/ВОЗ суточные нормы потребления на 100 г: триптофан на 3,0 г, валин на 1,4 г, изолейцин на 1,0 г, лейцин на 1,0 г, фенилаланин+тирозин на 1,0 г, лизин на 1,0 г. Одной из важнейших аминокислот, имеющих в разработанном нами продукте, является таурин. Продукты из мяса клем содержат большое количество таурина (24,91 мг/100 г), поэтому его можно рассматривать как перспективный источник данной аминокислоты. Таурин играет роль нейромедиаторной аминокислоты, оказывает кардиотропное действие, способствует нормализации функции клеточных мембран, улучшению обменных процессов и др.

Изучение степени усвояемости разработанного продукта (относительной биологической ценности (ОБЦ) и безопасности) проводили на тест-культуре *Tetrahymena pyriformis in vitro*. Показатель ОБЦ составил 82,4%, что обусловлено полноценностью и доступностью белков, присутствующих в гидробионтах, для расщепления пищеварительными ферментами. Также экспериментальным путем было доказано отсутствие токсичности консервов для живого организма.

При расчете рекомендаций по введению продукта в рацион нами учитывалось то, что в нем содержится 6,23% таурина. Для достижения функционального эффекта необходимо, чтобы данной аминокислоты с пищей поступало от 10 до 50% от рекомендуемой суточной нормы, что составляет 160 г готового продукта. Таким образом, полученные данные позволяют отнести продукты из двухстворчатых моллюсков к продуктам функциональной направленности.

## BIOTECHNOLOGY OF SPECIALIZED PRODUCTS FROM MARINE HYDROBIONTS

*Kalenik T.K., Dolgova T.G., Grischenko V.V., Grishin A.S.*

Pacific State University of Economics, Vladivostok, Russia  
E-mail: ipttgr@rambler.ru  
Fax/tel.: (4232) 43-40-55

Proteins in human nutrition have a special place. They perform a number of specific functions that are specific to living matter. Protein substances give the body basic properties for movement and provide for the exchange between the organism and the environment. Approximately one-third of the complete proteins in a Russian's diet are obtained from marine hydrobionts.

We studied multi-component products developed on the basis of bivalve clams (Clem). The protein content of these mollusks are related to the group of mid-protein marine hydrobionts.

During our research we determined that the investigational product's amino acids were present in quantities exceeding the recommended WHO / FAO daily intakes of 100 g at: 3,0 g of tryptophan; 1,4 g of valine; 1,0 g of isoleucine; 1,0 g of leucine; 1,0 g of phenylalanine + tyrosine; and 1,0 g of lysine. One of the essential amino acids available in the product we developed is taurine. Clem meat contains large amounts of taurine (24.91 mg/100 g); therefore, our product can be regarded as a promising source of this amino acid. Taurine has several important roles, such as: a neuromediator amino acid, cardiotropic effects, helps to normalize the function of cell membranes, improves metabolism, etc.

Studying the degree of assimilation in the developed products (relative biological value (OBTS) and security) was performed on the test-culture of *Tetrahymena pyriformis in vitro*. The OBTS rate was 82,4% due to the availability and completeness of proteins present in the hydrobionts' digestive enzymes. Also, the toxicity of the canned food was proven to be non-existent through experimental means.

In calculating the recommendations for introducing the product into the diet, we took into account the fact that it contains 6,23% taurine. To achieve the functional effect, it is necessary that the amino acids received from food are 10% to 50% of the recommended daily requirement, which is 160 g of the finished product. Thus, the data obtained allows the relation of products of bivalves to those of functional orientation.

## ВЛИЯНИЕ 3-ГИДРОКСИЛИПИНОВ НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ И ЖИЗНЕННО ВАЖНЫЕ ФУНКЦИИ АСКОМИЦЕТОВ

Дородникова Е.А., Мягкова Г.И., Белозерская Т.А., Гесслер Н.Н., Гроза Н.В.

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия  
E-mail: miagkova@mail.ru  
Факс: (495) 936-89-01; тел.: (495) 936-89-03

Продукты окисления природных полиненасыщенных жирных кислот играют важную биологическую роль в процессах роста и размножения грибов и являются сигнальными соединениями в отношениях хозяин-патоген. Поэтому изучение механизма действия оксипинов в жизненно важных процессах развития грибов, в частности процессах адаптации и внешнего стресса, является актуальным. Ранее были опубликованы исследования, показавшие важную роль 3-гидроксиарахидоновой кислоты (3-НЕТЕ) в сигнальных ответах грибов. В связи с этим, целью данной работы было изучение действия 3-НЕТЕ, добавленной к культуре в разных концентрациях, на рост, дифференцировку и жизненные характеристики аскомицета *Neurospora crassa*, выбранного в качестве наиболее изученной грибной модели.

Для проведения биохимических исследований была наработана в препаративных количествах 3(R)-гидрокси-(5Z,8Z,11Z,14Z)-эйкозатетраеновая кислота с использованием разработанного нами ранее метода синтеза гидроксилипинов, основанного на реакции кросс-сочетания терминальных ацетиленовых фрагментов и пропаргильных синтонов. Были проведены исследования индикативных характеристик стресса у грибов под воздействием разных концентраций 3-гидроксиэйкозатетраеновой кислоты. Эти характеристики - содержание каротиноидов в мицелии гриба при световом инкубировании и определение содержания карбонильных групп в белках с использованием реакции динитрофенилгидразина с определенными аминокислотами. Применяемые биохимические методики позволяют рассчитать количественные характеристики на основе спектрофотометрических данных.

Было показано, что микромолярные концентрации 3-НЕТЕ влияют на содержание каротиноидов у *N. crassa* дозозависимым образом, оптимальными для выработки каротиноидов оказались концентрации 5-10 мкМ. Было установлено повышение содержания карбонильных групп в белках под влиянием 3-НЕТЕ в микромолярных концентрациях (1 мкМ, 5 мкМ), что косвенным образом указывает на развитие окислительного стресса у грибов под влиянием этого соединения.

Исследование мицелия гриба под микроскопом на разных стадиях роста позволило установить, что добавление 3-НЕТЕ в питательную среду снижает скорость роста гиф, усиливая при этом их агрегацию, а также ингибирует спорообразование *N. crassa*.

## INFLUENCE OF 3-HYDROXYLIPINS ON DIFFERENTIATION AND VITAL FUNCTIONS OF ASCOMYCETES

Dorodnikova E.A., Miagkova G.I., Belozerskaya T.A., Gessler N.N., Groza N.V.

Lomonosov Academy of Fine Chemical Technology, Moscow, Russia  
E-mail: miagkova@mail.ru  
Fax: (495) 936-89-01; tel.: (495) 936-89-03

Oxygenated natural polyunsaturated fatty acids play an important biological role in growth, reproduction and signaling of fungi. Elucidation of mechanisms of oxylipins action in vital processes of fungi (adaptation and environmental stress) is actual problem. Recent publications have shown main role of 3-hydroxyarachidonic acid (3-HETE) in signaling system of fungi. In this connection the goal of our elucidation was investigation of 3-HETE (in different concentrations) action on growth, differentiation and vital functions of ascomycete *Neurospora crassa* as a fungal model.

We have obtained 3(R)-hydroxy-(5Z,8Z,11Z,14Z)-eicosatetraenoic acid by our synthesis of hydroxylipins based on cross-coupling reaction of acetylenic compounds. Elucidations of stress-indicative characteristics of fungi under action of 3-hydroxyeicosatetraenoic acid were carried out. The characteristics are content of carotenoids in fungal mycelium and content of protein's carbonyl groups formed by diphenylhydrazine and the amino acids reaction. The biochemical procedures allow count quantitative characteristics using spectrophotometer data.

It was shown the micromolar concentrations of 3-HETE influence on carotenoid content of *N. crassa* in dose dependent manner, optimal concentrations were 5-10  $\mu\text{M}$ . Increasing of protein's carbonyls under 3-HETE (1  $\mu\text{M}$  and 5  $\mu\text{M}$ ) was shown, that indirectly points on oxidative stress of fungi.

Elucidation by microscope of fungal mycelium on different growth stages allowed establish the addition of 3-HETE into medium reduces growth of hyphae and increases their aggregation and inhibits sporulating of *N. crassa*.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ ПОЛИМЕРИЗУЕМЫХ ЛИПИДОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ МЕТОДОМ ЯМР

*Болдырев И.А., Чупин В.В., Дубовский П.В.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: peter@nmr.ru

Полимеры получают всё большее распространение для исследования мембранных белков методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. С их помощью формируют стабильные бислойные мембраны, обеспечивающие долговременное функционирование белков, например, на биочипах [1], или модельные, мицелло-подобные, мембранные среды для исследования пространственной структуры белков [2].

Мы синтезировали два полимеризуемых короткоцепочечных (6 C-атомов) липида на основе сорбиновой (DiSorbPC) и 5-гексеновой (DiHexPC) кислот [3]. Для полученных липидов были определены критические константы мицеллообразования и числа агрегации.

Фазовое поведение синтезированных фосфолипидов в водном растворе было исследовано методами светорассеяния, конфокальной микроскопии, <sup>31</sup>P-, <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии и диффузионными измерениями с импульсными градиентами магнитного поля. Нами показано, что в индивидуальном состоянии DiSorbPC формирует крупные (с диаметром в микрометровом диапазоне) частицы, а DiHexPC – небольшие мицеллы (диаметром около 30 нм). Смешивая эти фосфолипиды в различных пропорциях, можно сформировать частицы заданного размера (диапазон 10 нм – 5 мкм). Используя УФ-, или РЕДОКС-полимеризацию, удаётся получить их стабильные варианты, не изменяющие своих размеров при последующем разбавлении.

В данной работе мы иллюстрируем применение полученных полимеров для солюбилизации мембранных белков с последующим использованием ЯМР-спектроскопии высокого разрешения для изучения их пространственной структуры.

Работа поддержана грантом РФФИ № 07-04-00910а.

### Литература

1. Pocanschi C.L., Dahmane T., Gohon Y., Pappaport F., Apell H.-J., Kleinschmidt J.H., Popot J.-L. (2006) *Biochemistry* **45**(47), 13954-13961.
2. Zoonens M., Catoire L.J., Giusti F., Popot J.L. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**(25), 8893-8898.
3. Брагина Н.А., Федуллова И.Н., Ушакова И.П., Дубовский П.В., Чупин В.В. (2008) *Вестн. МИТХТ*, **3**(2), 71-75.

## POLYMERIZABLE SHORT-CHAIN PHOSPHOLIPIDS FOR THE INVESTIGATION OF MEMBRANE PROTEINS BY NMR SPECTROSCOPY

*Boldyrev I.A., Chupin V.V., Dubovskii P.V.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia  
E-mail: peter@nmr.ru

The polymers are being increasingly used in the studies of membrane proteins [1,2]. For these purposes the polymerized phospholipids [1], capable of forming up stable bilayers, or specially constructed polymers, e.g. based on modification of a short-chain poly(acrylic acid) [2], are used.

We advocate to use also the micelle-forming phospholipids, or their mixtures for these purposes. The utility of this approach we demonstrate here.

The two phospholipids with identical fatty acids (6 C-atoms-long) have been synthesized [3]. The polymerizable groups were positioned in the termini of the fatty acids, one of which was either sorbic (the resulting phospholipid is disorbitoylphosphatidylcholine, DiSorbPC), or 5-hexenic (di-5-hexenoylphosphatidylcholine, DiHexPC). For the both lipids the critical micelle concentration and aggregation number were evaluated. The phase behavior of these lipids in aqueous solution was studied by dynamic light scattering, confocal microscopy, <sup>31</sup>P- and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy, as well as translational diffusion measurements. It was shown that DiSorbPC forms up large (up to 5 μm in diameter) particles, whereas DiHexPC forms up small (~5 nm) micelles. The mixing these lipids in different proportions results in the formation of the particles, whose diameter can be controlled and varied at will in the range of 10 nm – 5 μm. Subsequent REDOX or UV polymerization of these particles produces their stabilized variants, exhibiting no significant change in their shape, nor size upon dilution, variation of pH, or temperature.

In this work we illustrate the application of the polymers formed for solubilization of membrane proteins and study of their spatial structure using high-resolution NMR techniques.

This work was financially supported by RFBR, grant N 07-04-00910a.

### References

1. Pocanschi C.L., Dahmane T., Gohon Y., Pappaport F., Apell H.-J., Kleinschmidt J.H., Popot J.-L. (2006) *Biochemistry* **45**(47), 13954-13961.
2. Zoonens M., Catoire L.J., Giusti F., Popot J.L. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**(25), 8893-8898.
3. Брагина Н.А., Федуллова И.Н., Ушакова И.П., Дубовский П.В., Чупин В.В. (2008) *Вестн. МИТХТ*, **3**(2), 71-75.



## ЗАЩИТНЫЕ ПЕПТИДЫ РАСТЕНИЙ

Егорова Ц.А., Одинцова Т.И.\*

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

E-mail: ego@mx.ibch.ru

\*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

Растения выработали множество механизмов защиты от патогенов и стрессовых факторов абиотической природы, среди которых важную роль играют PR-белки и защитные пептиды (ЗП). К ЗП растений относят короткие (30-80 а.о.) Cys-богатые пептиды, которые ингибируют рост фитопатогенов *in vitro*, либо являются ингибиторами протеиназ. Объектами наших исследований были как культурные, так и дикорастущие растения, которые отличаются повышенной устойчивостью к патогенам. Была разработана методология выделения и структурно-функционального анализа ЗП растений. Из семян 6 видов растений (*Cucumis melo*, *Cucurbita pepo*, *Echinochloa crusgalli*, *Fagopyrum esculentum*, *Stellaria media*, *Triticum kiharae*), относящихся к 4 ботаническим семействам, выделено 8 новых ЗП, содержащих по 4 остатка полуцистина и получивших общее название 4-Cys пептидов. Определены полные аминокислотные последовательности (30-40 а.о.) этих пептидов и установлено расположение S-S-связей. Показано, что 4-Cys пептиды гомологичны и имеют общий цистеиновый мотив:  $C^1X_3C^2X_nC^3X_3C_4$ , где X – остаток любой аминокислоты; 4 остатка цистеина образуют две внутримолекулярные S-S-связи между  $C^1-C^4$  и  $C^2-C^3$ . Пространственная структура 4-Cys пептида представлена  $\alpha$ -спиральной шпилькой, стабилизированной двумя S-S-мостиками,  $\alpha$ -спирали располагаются антипараллельно и соединены подвижной петлей. Данный структурный мотив является главным признаком нового семейства ЗП. Также получено два синтетических аналога и изучена биологическая активность этой группы пептидов. Один из пептидов является ингибитором сериновых протеиназ, три других обладают высокой антифунгальной активностью, еще один представитель семейства проявил противовирусную активность. Из семян пшеницы выделен новый уникальный 10-Cys пептид WAMP-1a, который гомологичен хитин-связывающему домену хитиназ класса I злаков, осуществлена его гетерологическая экспрессия в *E. coli* с высоким выходом рекомбинантного пептида и изучены его антимикробные свойства. Определение 3D структуры WAMP-1a находится в стадии завершения. Выделенные пептиды могут найти применение в биотехнологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты №08-04-00783 и №09-04-00250).

## ЛОКАЛИЗАЦИЯ ОБЛАСТЕЙ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ LIM-ДОМЕННОГО БЕЛКА ЗИКСИНА И ТРАНСМЕМБРАННОГО РЕЦЕПТОРА PATCHED2

Ермолина Л.В., Мартынова Н.Ю., Зарайский А.Г.

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

E-mail: lutiklutik@gmail.com

Выяснение молекулярных механизмов, лежащих в основе формирования тканей и органов, является одной из основных задач молекулярной биологии развития. Ранее мы показали, что LIM-доменный белок зиксин, локализованный преимущественно в клеточных контактах, способен координировать морфогенетические движения клеток с экспрессией генов в раннем развитии центральной нервной системы шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. С целью более детального изучения роли зиксина в эмбриогенезе *X. laevis* нами был проведен поиск его белковых партнеров с помощью дрожжевой двугибридной системы. Было обнаружено несколько белков, среди которых для дальнейших исследований мы выделили трансмембранный белок patched2 (ptc2), рецептор секретлируемого белка hedgehog, регулирующего дифференцировку клеток в эмбриогенезе. Поскольку в двугибридной системе был обнаружен C-концевой цитоплазматический участок ptc2 (с 1159 по 1413 а.о.), было подробно изучено взаимодействие именно этого фрагмента с зиксином. Для локализации областей взаимодействия были созданы делеционные мутанты зиксина и найденного участка ptc2 и проанализировано их связывание в дрожжевой двугибридной системе. Было обнаружено, что за связывание указанных белков отвечают второй LIM-домен зиксина и фрагмент цитоплазматического C-концевого участка ptc2 (1220-1312 а.о.). Полученные данные были подтверждены соосаждением на глутатион-сефарозе комплекса фрагмента ptc2 с 1220 по 1312 а.о., сшитого с тус-эпитопом, с гибридом второго LIM-домена зиксина с GST, а также коиммунопреципитацией из лизата зародышей *X. laevis* комплекса данного фрагмента ptc2 с меченой FLAG-эпитопом частью зиксина, содержащей три LIM-домена. Дальнейшая работа направлена на выяснение эволюционной значимости найденного взаимодействия.



**LOCALIZATION OF THE INTERACTING AREAS OF THE LIM-DOMAIN PROTEIN ZYXIN AND THE HEDGEHOG TRANSMEMBRANE RECEPTOR PATCHED2**

*Ermolina L.V., Martynova N.Yu., Zaisky A.G.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: lutiklutik@gmail.com

Understanding the molecular mechanisms underlying tissues and organs formation is one of the fundamental problems of developmental biology. We have recently shown that LIM-domain protein zyxin, which is primarily localized at sites of cell adhesion, can coordinate cell morphogenetic movements and gene expression during the early development of the African clawed frog *Xenopus laevis* central nervous system. For the more detailed analysis of zyxin role in the *X. laevis* embryogenesis, we performed yeast two-hybrid screening of proteins capable to interact with zyxin. Among several proteins identified, patched2 (*ptc2*), the transmembrane receptor of secreted regulator of cell differentiation hedgehog, was chosen for further investigation. By means of the standard deletion analysis in the yeast two-hybrid system, we established, that C-terminal cytoplasmic fragment of *ptc2* (from 1220 to 1312 a.a.) and the second LIM-domain of zyxin are responsible for the interaction of these two proteins. This result was confirmed by co-precipitation on glutathione-Sepharose of 1220-1312 aa fragment of *ptc2*, tagged by myc-epitope, with the GST-fused second LIM-domain of zyxin. In addition, co-immunoprecipitation of the complex of the aforementioned *ptc2* fragment with three LIM-domains-containing part of zyxin, tagged by FLAG-epitope, was observed from the crude lysate of *X. laevis* embryos microinjected with mRNA encoding for corresponding protein fragments. Further experiments will be done to clarify the evolutionary significance of the discovered interaction between zyxin and *ptc2*.

**ДИЗАЙН ГЕНОВ МУЛЬТИДОМЕННЫХ БЕЛКОВ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ В РАСТЕНИЯХ НОВЫХ ВАКЦИННЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ТАНДЕМНЫЕ ПОВТОРЫ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ ЭПИТОПОВ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ПТИЧЬЕГО ГРИППА**

*Ерохина Т.Н., Ракитина Д.В. \*, Лещинер А.Д. \*, Соловьев А.Г. \*, Морозов С.Ю. \**

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

\*НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: erokhina@yahoo.com; tne@mx.ibch.ru

Факс: (495) 335-71-03; тел.: (495) 336-45-11

Эпитопная вакцинация – одна из новых стратегий достижения высокого уровня иммунного ответа против вируса гриппа. Наши исследования направлены на продукцию в растениях вакцинных белков нового типа, состоящих из слитых главных нейтрализующих эпитопов гемагглютинина (Н5) вируса птичьего гриппа, кодируемых химерной генетической конструкцией. С помощью агробактериальной трансформации и растительного вирусного вектора мы экспрессировали в растениях синтетические гены, кодирующие полипептиды, содержащие три иммунопротективных эпитопа Н5, соединенных специально отобранными пептидными линкерами. Экспрессия этих генов в агроинокулированных растениях детектировалась с помощью Вестерн и Нозерн блотов. В результате экспрессии полипептидов, кодируемых химерными генами, в растениях накапливались иммуногенные белки. Это было подтверждено с помощью иммунизации мышей и последующего иммуноферментного анализа (ИФА) полученной антисыворотки на вирус птичьего гриппа H5N1. Таким образом, синтетические гены транскрибируются, транслируются и экспрессируются в растениях в виде рекомбинантных мультиэпитопных полипептидов, что позволяет продолжить разработку способов создания потенциальной вакцины в растениях.

**DESIGN OF MULTIDOMEN PROTEINS GENES FOR  
EXPRESSION IN PLANTA NEW VACCINE POLYPEPTIDES  
CONTAINING TANDEM REPEATS OF NEUTRALIZING EPITOPES  
OF AVIAN INFLUENZA VIRUS HEMAGGLUTININ**

*Erokhina T.N., Rakitina D.V.\**, *Leschiner A.D.\**, *Solovyev A.G.\**,  
*Morozov S.Yu.\**

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow,  
Russia

\*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State  
University, Moscow, Russia

E-mail: erokhina@yahoo.com; tne@mx.ibch.ru

Fax: (495) 335-71-03; tel.: (495) 336-45-11

Epitope vaccination may be a novel strategy for inducing high levels of antibodies against influenza virus. We are attempting to develop multicomponent vaccine in plants, based on the fusion of protective main neutralizing hemagglutinin (H5) epitopes encoded by chimeric genes. By means of Agrobacterium mediated transformation and plant virus vector we demonstrated expression of synthetic genes encoding novel polypeptides containing three immunoprotective H5 epitopes joined by specially selected peptide linkers. In agroinoculated plants, expression of the synthetic genes was detected by Western and Northern blots. Expression of the putative polypeptide encoded by the chimeric H5 multiepitope genes resulted in accumulation of immunogenic polypeptides confirmed by immunization of mice and immunoassays of obtained antibodies with avian influenza virus H5N1. The synthetic genes are therefore transcribed and translated as the expected recombinant multiepitope polypeptide in plants that constitute a potential edible vaccine.

**ВЛИЯНИЕ МИЕЛОПЕПТИДА-4 НА МАР-КИНАЗНЫЕ И Ca<sup>2+</sup>-  
ПУТИ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ В КЛЕТКАХ HL-60 В  
ПРОЦЕССЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ**

*Кирилина Е.А., Белевская Р.Г., Ефремов М.А., Михайлова А.А.*

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

E-mail: stas@ibch.ru

Большинство эндогенных регуляторов имеют белковую или пептидную природу и основной принцип их действия заключается в лиганд-рецепторном взаимодействии.

Миелопептиды (МП) – эндогенные иммунорегуляторы, являются элементами системы поддержания постоянства иммунного статуса организма. Определена структура шести МП, их иммунорегуляторные активности и механизм действия. Каждый из МП обладает собственной иммунокорригирующей активностью в отношении определенной клетки-мишени, направленно связываясь с ней через лиганд-рецепторное взаимодействие.

Миелопептид-4 (МП-4) Phe-Arg-Pro-Arg-Ile-Met-Thr-Pro – новый дифференцировочный фактор, был выделен из супернатанта культуры клеток костного мозга свиньи, идентифицирован и синтезирован. Ранее было показано, что МП-4 и МП-6 (Val-Asp-Pro-Pro) обладают способностью индуцировать терминальную дифференцировку лейкозных клеточных линий человека HL-60 и К-562, что подтверждено экспрессией дифференцировочных антигенов CD14 и CD38, изменениями метаболической активности, такими как угнетение пролиферации, синтез гемоглобина и морфологическими изменениями.

Включение в процесс дифференцировки МАР-киназ является одним из доказательств реализации активности МП-4. Происходит активация или ингибирование различных путей МАР-киназ: ERK, JNK и p38 в клетках HL-60, инкубированных с МП-4 в течение 72 часов. Кроме того, МП-4 увеличивает проникновение ионов Ca<sup>2+</sup> в клетки линии HL-60, вызванное fMLP. При этом сам МП-4 не влияет на базальный уровень кальция в клетках. В этом заключается преимущество МП-4 по сравнению с другими дифференцировочными агентами. Изучение связывания МП-4 с клетками HL-60 и проникновение МП-4 внутрь этих клеток показано с помощью ФИТЦ-меченного МП-4. Константа связывания ФИТЦ-МП-4 с клетками HL-60 составляет  $K_d = 1,3 \times 10^{-9}$  М.

МП-4 является перспективной основой для создания лекарственных препаратов нового поколения, которые могут быть использованы в комплексной терапии онкологических заболеваний. Основное действие таких препаратов направлено на коррекцию поврежденного звена иммунной системы.

## MAP KINASE AND Ca<sup>2+</sup>-SIGNALING IN HL-60 CELLS DURING DIFFERENTIATION BY MYELOPEPTIDE-4

*Kirilina E.A., Belevskaya R.G., Efremov M.A., Mikhailova A.A.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia

E-mail: stas@ibch.ru

Most endogenous regulators are proteins or peptides by nature and the basic principle of their action is ligand-receptor interaction.

Myeloepitides (MPs) are endogenous immunoregulators that serve as elements of the system that maintain a constant immune status of the body. We have determined structure of six myeloepitides, some of their immunomodulating activities and mechanism of action. Each MP has an immune activity against a particular target cell and specifically binds with this cell by means of ligand-receptor interaction.

Myeloepitide-4 (MP-4) Phe-Arg-Pro-Arg-Ile-Met-Thr-Pro is a new differentiation factor. It was isolated from the supernatant of the pig bone marrow cell culture, identified and synthesized. Earlier it was shown, that MP-4 and MP-6 (Val-Asp-Pro-Pro) have ability to induce terminal differentiation of human leucosis cell lines HL-60 and K-562. It is confirmed by expression of differentiation antigens CD14 and CD38, changes in metabolic activity such as inhibition of proliferation, hemoglobin synthesis, and changes of morphology.

There is strong evidence that MP-4 realizes its action through involvement of MAP-kinases in the process of differentiation. We can see activation or inhibition of different components of MAPK pathway - ERK, JNK and p38 in HL-60 cells incubated with MP-4 during 72 h. MP-4 has significantly increased Ca<sup>2+</sup>-influx in cell line HL-60 during differentiation induced by fMLP. On the other hand MP-4 itself has not affected the level of free Ca<sup>2+</sup> in the cells. This gives MP-4 advantages among other agents of differentiation.

The study of MP-4 binding with HL-60 cells and penetration of MP-4 inside of HL-60 cells is carried out by using FITC-labeled MP-4. Quantity analysis of FITC-MP-4 binding with HL-60 cells gives  $K_d = 1,3 \times 10^{-9}$  M.

MP-4 can be used as a perspective basis for the development of new drugs, which may have direct action on impaired chains of immune system, including complex therapy of cancer.

## MOLECULAR LIPOPHILICITY IN PROTEIN MODELING AND DRUG DESIGN

*Efremov R.G., Chugunov A.O., Pyrkov T.V.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: efremov@nmr.ru

Hydrophobic interactions play a key role in the folding and maintenance of the three-dimensional (3D) structure of proteins, as well as in the binding of ligands (e.g., drugs) to protein targets. Therefore, quantitative assessment of spatial hydrophobic (lipophilic) properties of these molecules is indispensable for the development of efficient computational methods in drug design. One possible solution to the problem lies in application of a concept of the 3D-molecular hydrophobicity potential (MHP). The formalism of MHP utilizes a set of atomic physicochemical parameters evaluated from octanol-water partition coefficients ( $\log P$ ) of numerous chemical compounds. It permits detailed assessment of the hydrophobic and/or hydrophilic properties of various parts of molecules and may be useful in analysis of protein-protein and protein-ligand interactions.

Here, we survey recent applications of MHP-based techniques to a number of biologically relevant tasks [1-4]. Among them are: (i) Detailed assessment of hydrophobic/hydrophilic organization of proteins; (ii) Application of this data to the modeling of structure, dynamics, and function of globular and membrane proteins, membrane-active peptides, etc. (iii) Employment of the MHP-based criteria in docking simulations for ligands binding to receptors.

It is demonstrated that the application of the MHP-based techniques in combination with other molecular modeling tools (e.g., Monte Carlo and molecular dynamics simulations, docking, etc.) permits significant improvement to the standard computational approaches, provides additional important insights into the intimate molecular mechanisms driving protein assembling in water and in biological membranes, and helps in the computer-aided drug discovery process.

### References

1. Efremov R.G., Chugunov A.O., Pyrkov T.V., Priestle J.P., Arseniev A.S., Jacoby E. (2007). *Curr. Med. Chem.* 14, 393-415.
2. Pyrkov T.V., Kosinsky Yu.A., Arseniev A.S., Priestle J.P., Jacoby E., Efremov R.G. (2007). *Proteins.* 66, 388-398.
3. Polyansky A.A., Volynsky P.E., Arseniev A.S., Efremov R.G. (2009). *J. Phys. Chem. B.* 113, 1120-1126.
4. Pyrkov T.V., Chugunov A.O., Krylov N.A., Nolde D.E., Efremov R.G. (2009). *Bioinformatics.* 25, 1201-1202.

## ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИЙ РЕГУЛЯТОР РОСТА РАСТЕНИЙ КАК АДАПТОГЕН К СТРЕССОВЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

*Жигачева И.В., Бурлакова Е.Б.*

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

E-mail: zhigacheva@mail.ru

Факс: (499) 137-41-01; тел.: (495) 939-74-09

Мелафен [меламиновая соль бис(оксиметил)фосфиновой кислоты] – регулятор роста растений, синтезированный в Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра. Препарат оказывает регуляторное действие на процессы жизнедеятельности растительной клетки, изменяя физико-химические свойства биологических мембран. Предпосевная обработка семян гороха 10<sup>-7</sup>% раствором мелафена почти не меняет жирнокислотный состав мембран у растений, произрастающих в комфортных условиях, и нормализует данный показатель у растений, находящихся в условиях недостаточного увлажнения. При этом соотношение ненасыщенных жирных кислот к насыщенным возрастает до контрольных величин с 1,86±0,20 до 2,61±0,11. Изменение физико-химических свойств мембран влечет за собой и изменение активности ферментов, ассоциированных с мембранами, и, прежде всего, активности ферментов дыхательной цепи митохондрий.

Недостаточное увлажнение приводит к 1,5 кратному снижению максимальных скоростей окисления NAD-зависимых субстратов митохондриями, выделенными из проростков гороха. Наряду с этим происходит и падение эффективности окислительного фосфорилирования: величина дыхательного контроля по Чансу снижается с 2,27±0,01 до 1,70±0,02. На 40% снижаются и скорости транспорта электронов на конечном участке дыхательной цепи. Предпосевная обработка семян мелафеном предотвращает изменения в энергетике митохондрий, обусловленные недостаточным увлажнением.

При этом всхожесть семян в условиях недостаточного увлажнения снижается на 46%, в то время как обработка этих семян мелафеном предупреждает снижение этого показателя. Более того, препарат в 1,5 раза стимулирует рост корней, что особенно важно в условиях водного дефицита.

## ORGANOPHOSPHOROUS PLANT GROWTH REGULATOR AS ADAPTOGEN TO STRESS ACTION

*Zhigacheva I.V., Burlakova E.B.*

Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, Russia

E-mail: zhigacheva@mail.ru

Fax: (499) 137-41-01; tel.: (495) 939-74-09

Melaphen, the melamine salt of bis(oxymethyl)phosphinic acid was synthesized in Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, Kazan Research Center, Russian Academy of Sciences. Its regulatory effect on activity of plant cells is determined by influence on the physicochemical properties of biological membranes. A preliminary treatment of pea seeds with a 10<sup>-7</sup>% solution of melaphen does not change the fatty acid composition membranes of plant, which grows in the comfortable conditions and normalizes that index at plants, which grows in conditions of low moisture. At that time the ratio of unsaturated to saturated fatty acid increased to control size in other words from 1,86±0,20 to 2,61±0,11. The changes of physicochemical properties of membranes effects on activities of membrane-linked enzymes, in the first place, of respiratory chain enzymes.

Low moisture leads to decreasing the maximum rates of oxidation of NAD-dependent substrates by pea sprouts mitochondria to 1.5 time. Besides takes place the reduction of the efficacy of the oxidative phosphorylation. Hence the respiration rate with reference to Chance decreases from 2.27±0.1 to 1.7±0.2. The electron transfer rate at the end of the respiratory chain of mitochondria isolated from drought-conditioned pea sprouts are less than the control values almost by 40%. The pretreatment with melaphen prevents from change in energetics of mitochondria, which makes conditional upon low moisture.

Under drought conditions, the germination of seeds in control decreases by 46%; that of melaphen-treated seeds remains almost unchanged. Moreover, melaphen at 1.5 times stimulates the growth of sprout roots under drought conditions, which is of great importance for adaptation.

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ IgA1-ПРОТЕИНАЗЫ ИЗ КУЛЬТУРЫ *N. MENINGITIDIS*

Ягудаева Е.Ю., Жигис Л.С., Разгуляева О.А., Зуева В.С., Козлов Л.В. \*, Бичучер А.М. \*, Котельникова О.В., Аллилуев А.П. \*\*, Аваков А.Э. \*\*\*, Румш Л.Д.

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

\*ФГУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия

\*\*ГОУ ВПО Российский университет дружбы народов (медицинский факультет), Москва, Россия

\*\*\*Филиал ФГУН (НПО "Микроген") предприятие по производству бактериальных препаратов им. Г.Н.Габричевского, Москва, Россия

E-mail: zhigis@mail.ibch.ru

Факс: (495) 335-10-11, тел.: (495) 330-67-65

Разработан метод получения очищенного препарата IgA1-протеиназы из культуры *N. meningitidis* серогруппы А из трех различных инактивированных промежуточных продуктов производства менингококковой вакцины: культуральной жидкости (КЖ), супернатанта и осадка, полученных при осаждении бактериальных клеток из КЖ цетавлоном. Чистоту полученного препарата анализировали методом электрофореза в ПААГ-ДСН. Разработан более эффективный иммуноферментный метод определения активности IgA1-протеиназы, который использовали для контроля активности в ходе выделения и очистки. Из 40 л культуральной жидкости (103 г цетавлоного осадка) получено около 600 мкг препарата с удельной ферментативной активностью от 0,5 до 4 млн. ед./мг. Препарат использовали для определения его антигенной и иммунологической активности. На модели мышей показана способность IgA1-протеиназы, выделенной из менингококка серогруппы А, защищать в условиях эксперимента животных от заражения менингококком серогруппы В.

Работа поддержана грантом ОФИ № 08-04-12126.

## ISOLATION AND DETERMINATION OF ACTIVITY MENINGOCOCCAL IgA1-PROTEASE

Yagudaeva E. Yu., Zhigis L.S., Razgulyaeva O.A., Zueva V.S., Kozlov L.V. \*, Bichucher A.M. \*, Kotelnikova O.V., Alliluev A.P. \*\*, Avakov A.E. \*\*\*, Rumsh L.D.

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

\*Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Russia, Moscow, Russia

\*\*Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

\*\*\*Microgen Federal State Scientific - Industrial Company for Immunological Medicines of the Ministry of Health of Russia (MICROGEN Federal State Company), Moscow, Russia

Fax: (495) 335-10-11; tel.: (495) 330-67-65

E-mail: zhigis@mail.ibch.ru

A simplified method for isolation and purification of meningococcal IgA1-protease from the culture *N. meningitidis*, serogroup A is described. As original materials were used three different intermediate products from vaccine production: cultural fluid, cetavlon supernatant and cetavlon precipitate. The purity of the enzyme was determined by SDS-PAGE analysis. The activity of IgA1-protease was evaluated by modified and more convenient ELISA assay, which was developed early. From 40 l of cultural fluid (103 g cetavlon precipitate) were obtained about 600 µg preparation with special activity from 0,5 to 4 mln units/mg. This preparation was used to evaluate their antigenicity and immunogenicity. It was shown, that isolated IgA1-protease from the meningococcus A., is able to protect mice, uninfected by meningococcus, serogroup B.

This work was supported by grant OFI N08-04-12126.



## РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ОСОБЕННОСТЕЙ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *BIOTA (THUJA) ORIENTALIS ENDL.*

Жумабеков Е.Ж., Шаденова Е.А.

Институт общей генетики и цитологии, Алматы, Казахстан

E-mail: e.zhumabekov@mail.ru

Факс: (727) 269-45-87, тел.: (701) 455-79-58 (моб.)

*Biota (Thuja) orientalis Endl.* – вечнозеленый кустарник или дерево из сем. кипарисовых – *Cupressaceae* с мелкой чешуевидной хвоей, прижатой к стеблю и расположенной в одной плоскости. Биота восточная (Б.в.) – однодомное дерево, достигающее 15-18 м высоты, долговечно, живет до 1000 и более лет.

Мужские шишки – шаровидные мелкие (до 15 мм), женские – крупные (2-3 см). Родина Б.в. – Восточная Азия. Введенные в культуру формы культивируются повсеместно в Европе, СНГ. В диком виде встречается в Узбекистане и Таджикистане, где как редкий и исчезающий вид занесены в Красную книгу.

В листьях и древесине Б.в. содержатся: эфирное масло, содержащее пинен (55-60%), сесквитерпеноиды: видлен, кариофиллен, цедрол, аромандендрин. Кроме этого, в Б.в. содержатся пинипикрин, пиллен а также дубильные вещества, смола. В древесине Б.в. содержится токсифоллин (применяемый в производстве противоопухолевых препаратов); в семенах – жирное и эфирное масла. Лечебные препараты из Б.в. применяются в китайской медицине, разрешены к использованию в некоторых странах Западной Европы.

Исходя из лесохозяйственных и лекарственных характеристик, мы исследовали особенности морфогенеза Б.в. в культуре изолированных тканей проростков в условиях *in vitro* и изучили возможности оптимизации способа её клонального микроразмножения с оценкой регенерационной способности. В качестве исходного материала для выделения эксплантов использованы проростки, выращенные из семян Б.в. Первый этап микроклонального размножения включает подготовку растительного материала к введению в культуру *in vitro* и получение стерильной культуры. Для этого необходимо подобрать химические средства, позволяющие обеспечить необходимый уровень асептики.

Разработан модифицированный и усовершенствованный способ мягкой стерилизации эксплантов, который, стерилизуя растительную ткань, не повреждает ее. Для культивирования различных частей проростков использовали среду МС с добавлением 3% сахарозы и различных регуляторов роста. Варианты питательных сред: 1) МС – 0,05мг/л 2,4 Д + 2мг/л БАП; 2) МС – 1мг/л БАП + 4мг/л ИУК; 3) МС – 5мг/л ИУК; 4) МС – безгормональная среда (контроль). Отделенные от вегетирующих проростков экспланты культивировали при люминесцентном освещении, 16-часовом фотопериоде и температуре 22-24°C. Ежедневно проводили наблюдение за особенностями роста и развития эксплантов в условиях *in vitro*.

Показано, что в отличие от ели колючей и сосны крымской, биота

восточная является наиболее легко культивируемой в условиях *in vitro*. На седьмые сутки после помещения апикальной части проростков на среду МС с БАП + ИУК и с ИУК происходит образование боковых побегов.

Побеги Б.в. длиной 5-7 см через 1,5 месяца субкультивирования пригодны для повторного микрочеренкования. В среднем, с одного асептического побега можно получить от 5 до 10 микрочеренков, которые после доращивания в условиях *in vitro* могут быть использованы для дальнейшего размножения способом клонального микроразмножения. Общая продолжительность времени от введения эксплантов до получения укорененных микроклонов составляет один месяц.

Полученные микроклоны Б.в. с корешками длиной до 1,5-2 см легко адаптируются в условиях закрытого грунта и при последующей пересадке в условия открытого грунта.

Показано, что наряду с ростом пазушных побегов в условиях *in vitro*, идет активный процесс ризогенеза в основании побегов. Нами установлено, что ризогенез у регенерантов Б.в. может происходить и на безгормональной среде. Последнее позволяет значительно упростить схему клонального микроразмножения Б.в., что делает возможным исключить этап пассирования эксплантов на ризогенную среду.

Клональное микроразмножение Б.в. и последующее выращивание посадочного материала необходимы для создания плантационных посадок в Казахстане и позволяют значительно увеличить лесистость аридных регионов. Поскольку в листьях, семенах и древесине Б.в. имеются: эфирное масло, содержащее пинен (55-60%), сесквитерпеноиды: видлен, кариофиллен, цедрол, пинипикрин, пиллен и др., а также дубильные вещества, смола; в древесине – аромандендрин, токсифоллин; в семенах – жирное и эфирное масла, можно отметить селекционную привлекательность Б.в. с точки зрения создания клонов с улучшенными качественными характеристиками сырья, необходимыми для фармацевтической промышленности.

## МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ КОЛЛОИДНЫЕ СИСТЕМЫ

Зайцев С.Ю.

ФГОУ ВПО Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина, Москва, Россия  
E-mail: szaitsev@mail.ru

Создание и исследование многофункциональных биохимических коллоидных систем, прежде всего, на основе синтетических и природных полимеров, является многообещающей областью, имеющей как фундаментальное, так и прикладное значение. В последние годы проведены многочисленные исследования по различным супрамолекулярным и коллоидным системам, био- и наноматериалам, но многофункциональные биохимические коллоидные системы были упомянуты только в некоторых из них.

Для создания многофункциональных биохимических коллоидных систем необходимо достигнуть следующие основные показатели: высокую 2D- или 3D-организацию, интегрированность на молекулярном уровне, заданные свойства (реализуемые посредством специальных композиций синтетических и природных полимеров или синтезом многофункциональных органических молекул), многократность использования и достаточную стабильность. Для достижения этих показателей необходимо объединение подходов и методов полимерной и коллоидной химии, биохимии и биотехнологии, химии и технологии материалов.

По-видимому, наиболее перспективными подходами являются создание полимер-ферментных микро- и наночастиц, ультратонких полимер-белковых пленок на оптических, электро- или фотопроводящих субстратах с помощью модифицированных методов самоассоциации, послойного нанесения и ленгмюровской техники [1]. Эти системы могут служить как уникальные модели для исследования процессов молекулярного узнавания и взаимодействия на границе раздела фаз, а также для последующего применения как чувствительные компоненты для биосенсоров, новые наноматериалы для записи и хранения оптической информации, самоассоциированные наносферы с иммобилизованными ферментами и липосомы для доставки лекарств, специальные мембраны со встроенными белками, фотохромные и нанофотонные элементы, наноматериалы для "биороботов" и т.п. (некоторые примеры таких систем приведены в недавнем обзоре [1]).

Отдельные части данной работы поддержаны грантами Российского фонда фундаментальных исследований и Минобрнауки РФ.

### *Литература*

1. Зайцев С.Ю. *Российские нанотехнологии*. 2009. 4(7-8). С.6-18.

## MULTIFUNCTIONAL BIOCHEMICAL COLLOID SYSTEMS

Zaitsev S.Yu.

FGOY VPO Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Skryabin, Moscow, Russia  
E-mail: szaitsev@mail.ru

Design and investigation of multifunctional biochemical colloid systems, especially those based on the synthetic and natural polymers, is a very promising field of fundamental and applied importance. During the past years there were numerous studies on various supramolecular and colloids systems, bio- and nanomaterials, but multifunctional biochemical colloid systems were indirectly mentioned only in a few of them.

There are following main goals for design of multifunctional biochemical colloid systems that must be achieved: high 2D- or 3D-organization, integrity at the molecular level range, desirable properties (realized through the special compositions of synthetic and natural proteins or by synthesis of multifunctional organic molecules), multiple usage and reasonable stability. In order to achieve these goals it is important to combine the approaches and methods of polymer and colloid chemistry, biochemistry and biotechnology, material science and engineering. To our opinion, the most promising approaches can be connected with design of particular polymer-enzyme micro- and nanoparticles, ultrathin polymer-protein films at the optical, electro- or photo-conductive substrates by modified methods of self-assembly, layer-by-layer assembly and Langmuir techniques [1]. These systems can serve as unique models for the investigation of molecular recognition and interaction phenomena at the interfaces, as well as for future applications as sensitive components for biodetection; novel nanomaterials for recording and storage of optical information; self-assembled nanospheres with immobilized enzymes or liposomes for drug delivery, special membranes with incorporated proteins, photochromic and nanophotonic elements, nanomaterials for "biorobots" and so on (some examples are mentioned in the recent review [1]).

Some parts of this work were supported by grants from the Russian Foundation for Basic Research and Russian Ministry of Education and Science.

### *Reference*

1. Zaitsev S.Yu. *Russian nanotechnologies*. 2009. 4(7-8). P.6-18.

## QUORUM SENSING СИСТЕМЫ ДВУХ ТИПОВ У *SERRATIA PROTEAMACULANS*

Зайцева Ю.В., Липасова В.А., Хмель И.А.

Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

E-mail: khmel@img.ras.ru

Факс: (499) 196-02-21; тел.: (499) 196-00-16

Quorum Sensing (QS) регуляция - это особый тип регуляции экспрессии генов бактерий, зависящей от плотности их популяции. QS-Системы включают низкомолекулярные сигнальные молекулы, названные аутоиндукторами (АИ), легко диффундирующие через клеточную стенку, и регуляторные рецепторные белки, с которыми связываются аутоиндукторы. У грамотрицательных бактерий лучше всего изучены QS-системы, функционирующие с участием аутоиндукторов N-ацил-гомосеринлактонов (АГЛ). QS-Системы являются ключевыми факторами регуляции большого количества клеточных процессов, глобальными регуляторами экспрессии генов бактерий.

Настоящая работа посвящена изучению QS-систем двух типов у бактерии *Serratia proteamaculans*, регуляции функционирования этих систем и их роли в контроле клеточных процессов. Штамм *S. proteamaculans* 94 был выделен из испортившегося в холодильной камере Мясокомбината мяса. Штамм способен гидролизовать коллаген при низкой температуре, является продуцентом нескольких внеклеточных протеиназ.

С помощью АГЛ-биосенсоров и тонкослойной хроматографии было показано, что штамм *S. proteamaculans* 94 продуцирует два типа АГЛ-сигнальных молекул QS-систем первого типа (LuxR-LuxI системы). Идентифицированы, клонированы и секвенированы гены первой QS-системы: *sprI*, кодирующий синтазу АГЛ, и ген *sprR*, кодирующий рецепторный белок. Показано, что эти гены частично перекрываются и транскрибируются с противоположных цепей ДНК навстречу друг другу. Кроме того, у штамма *S. proteamaculans* 94 обнаружен синтез сигнальной молекулы QS-системы второго типа – аутоиндуктор АИ-2. Идентифицирован, клонирован и секвенирован ген синтазы АИ-2 *luxS*.

Получены мутанты с нокаутированными генами синтазы АГЛ, рецепторного белка и синтазы АИ-2 с целью выяснения регуляции функционирования этих QS-систем. Для определения роли QS-систем в регуляции метаболических процессов *S. proteamaculans* 94 сравнивали активности различных ферментов в клетках мутантных штаммов и штамма дикого типа. Было показано, что клетки *S. proteamaculans* 94 обнаруживали внеклеточную протеолитическую, липазную и хитиназную активности, такой же уровень активности этих ферментов наблюдался в случае мутанта с нокаутированным геном рецепторного белка (*sprR*<sup>-</sup>). Мутанты с нокаутированными генами синтазы АГЛ (*sprI*<sup>-</sup>) и синтазы АИ-2 (*luxS*<sup>-</sup>) обнаруживали резко сниженные уровни протеолитической и хитиназной ферментативных активностей.

## QUORUM SENSING SYSTEMS OF TWO TYPES IN *SERRATIA PROTEAMACULANS*

Zaitseva J.V., Lipasova V.A., Khmel I.A.

Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow, Russia

E-mail: zaitceva\_julia@rambler.ru

Fax: (499) 196-02-21; tel.: (499) 196-00-16

Quorum Sensing (QS) regulation is a specific type of the gene expression regulation depending on the density of bacterial populations. QS systems include low molecular weight signal molecules (autoinducers) that can easily diffuse across the cell wall, and receptor proteins that interact with autoinducers. The best studied QS systems are those where the role of signal molecules is played by N-acyl homoserine lactones (AHLs). QS systems play a key role in the regulation of many cell processes.

The present work is devoted to studying of two types of *Serratia proteamaculans* QS systems, these systems functioning regulation and their roles in cell processes control. The *S. proteamaculans* strain 94 was isolated from rotten meat kept in an industrial fridge. This strain is able to hydrolyze the collagen at low temperature and produce a number of extracellular proteases.

Using AHL-biosensors and TLC chromatography we have shown that *S. proteamaculans* produced two types of AHL signal molecules. We identified, cloned and sequenced genes of the first QS system: *sprI* gene coding an AHL-synthase and *sprR* gene coding a receptor protein. Furthermore, in *S. proteamaculans* strain 94 we revealed synthesis of the second type QS signal molecule which was autoinducer AI-2. We identified, cloned and sequenced *luxS* gene of AI-2 synthase.

We generated knockout mutants with defective genes of the AHL synthase, the receptor protein and the AI-2 synthase to find out regulation mechanisms of these QS systems. To define roles of the QS systems in regulation of *S. proteamaculans* 94 metabolism processes we compared activities of different enzymes from mutant and wild type cells. Cells *S. proteamaculans* 94 was shown to display extracellular proteolytic, lipase and chitinase activities which were the same in mutant cells with the knocked out receptor gene (*sprR*<sup>-</sup>). Mutants with the knocked out AHL synthase gene as well as that one with the knocked out AI-2 synthase gene were shown to drastically decrease extracellular proteolytic and chitinase activities.

**ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТОВ НИТРОФУРАНОВОГО РЯДА И  
ДОНОРОВ NO НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНОК У  
ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ И QUORUM SENSING-  
БИОСЕНСОРЫ**

***Зайцева Ю.В., Хмель И.А.***

Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

E-mail: zaitceva\_julia@rambler.ru

Факс: (499) 196-02-21; тел.: (499) 196-00-16

Более 90% бактерий существуют в природных экосистемах в виде специфически организованных, прикрепленных к твердым поверхностям биопленок; биопленки имеют характерную архитектуру и заключены в экзополимерный матрикс. Бактерии, находящиеся в составе биопленок, значительно более резистентны к действию различных антибактериальных препаратов.

В настоящей работе мы исследовали действие антибактериальных препаратов нитрофуранового ряда, антимикробных агентов широкого спектра действия, и доноров NO на способность бактерий *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 и *Burkholderia cenocepacia* 370 формировать биопленки. Мы впервые показали, что производные нитрофурана, фурациллин, нитрофурантоин, нифуроксазид и фурагин, а также доноры оксида азота, нитропруссид натрия и изосорбид мононитрат в субингибиторных концентрациях оказывают стимулирующее действие на формирование биопленок у *B. cenocepacia* 370 и *Ps. aeruginosa* PAO1. Увеличение формирования биопленок в этих условиях является, по-видимому, полезной стратегией для патогенных бактерий, способствующей их выживанию после антибактериальной терапии, когда низкие количества подобных препаратов остаются в организме.

У ряда грамотрицательных бактерий формирование биопленок находится под контролем Quorum Sensing (QS) системы регуляции. Поэтому мы предположили, что увеличение образования биопленок при действии нитрофуранов и доноров NO объясняется активацией генов, участвующих в функционировании QS систем. Чтобы проверить это предположение, мы определили влияние указанных соединений на QS-биосенсоры – изогенные штаммы *E. coli* JLD271, содержащие или не содержащие различные гены рецепторных белков типа LuxR. Эффект наблюдался в штаммах обоих типов. Эти данные показывают, что влияние изучаемых веществ не связано с их взаимодействием с QS системами и, скорее всего, определяется их влиянием на процесс биолуминесценции.

**EFFECT OF NITROFURANS AND NO GENERATORS ON  
BIOFILMS FORMATION BY GRAM-NEGATIVE BACTERIA AND  
ON QUORUM SENSING BIOSENSORS**

***Zaitseva J.V., Khmel I.A.***

Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow, Russia

E-mail: zaitceva\_julia@rambler.ru

Fax: (499) 196-02-21; tel.: (499) 196-00-16

More than 90% of bacteria exist in the natural environments as biofilms, multicellular communities attached to hard surfaces. Biofilms have a complex architecture – they are enclosed by exopolymer's matrix. Bacterial cells in biofilms are extremely resistant to treatment with different antibacterial preparations.

In this study we investigated the influence of antibacterial drugs of the nitrofurane series and nitric oxide generators on the capacity of pathogenic bacteria *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Burkholderia cenocepacia* 370 to form biofilms. We have shown that antibacterial drugs of nitrofurane series such as nitrofurazone, furazidin, nitrofurantoin and nifuroxazide, as well as nitric oxide generators sodium nitroprusside and isosorbide mononitrate in concentrations that do not suppress bacterial growth were shown to increase the capacity of pathogenic bacteria *Ps. aeruginosa* PAO1 and *B. cenocepacia* 370 to form biofilms. The enhancement of biofilm formation at concentrations of antibacterial drugs not inhibiting bacterial growth is probably a useful strategy for pathogenic bacteria, facilitating their survival after intensive antibiotic therapy when low quantities of drugs remain in the organism.

The formation of biofilms in some bacteria, including *B. cenocepacia* and *Ps. aeruginosa*, was shown to be Quorum Sensing (QS)-regulated. It could be therefore suggested that the enhancement of biofilm formation in the presence of nitrofurans and NO generators was due to their action on QS.

To study the effect of nitrofurans and NO donors on QS systems, we used QS-biosensors. These biosensors are a set of isogenic strains of *E. coli* JLD271 that do or do not contain genes encoding different LuxR type receptor proteins. The bioluminescence activation of *lux*-reporter strains was observed irrespective of the presence or absence in the plasmids genes coding for receptor LuxR-type proteins. Thus, the substances tested did not specifically interact with QS systems; this effect is connected most probably with their influence on bioluminescence.



## ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ МИКРОКАПСУЛЫ ДЛЯ ВКЛЮЧЕНИЯ В НИХ БИОАКТИВНЫХ МАКРОМОЛЕКУЛ И ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК: ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ

*Зайцева-Зотова Д.С., Селина О.Е., Бовин В.Н., Марквичева Е.А.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: [dariaz.z@gmail.com](mailto:dariaz.z@gmail.com)  
Факс: (495) 335-71-03; тел.: (495) 336-06-00

Включение биоактивных макромолекул (белков, ДНК, олигонуклеотидов и др.) и животных клеток в биосовместимые полимерные микрокапсулы (МК) является перспективным направлением биомедицины. Варьируя полимерный состав МК, а также их физико-химические характеристики (размер, толщина, проницаемость оболочки и др.), можно предложить эти носители для решения различных биомедицинских задач. Альгинат-хитозановые МК получали в 3 стадии: диспергировали 2% раствор альгината натрия в 0,5-2 % раствор CaCl<sub>2</sub> для формирования Са-альгинатных микрочастиц, инкубировали их в 0,2-0,4% растворе олигохитозана (Мм 3,5 кДа, СД 87%) для формирования на поверхности частицы полиэлектролитной мембраны, а затем растворяли Са-альгинатное ядро 0,05 М раствором ЭДТА.

Целью работы было получение МК с диаметром в диапазоне 300-900 мкм путем оптимизации двух методов диспергирования альгината натрия. Для этого в работе использовали два прибора. Прибор с коаксиальной подачей сжатого воздуха позволил получить частицы размером 750-900 мкм. Такой размер МК был оптимальным для включения в них высокомолекулярных антиглюкозных антигенов (гликоконъюгатов) с целью разработки новых гемосовместимых иммуносорбентов для специфической сорбции антиглюкозных антител из цельной крови. Было показано, что полупроницаемая мембрана не позволяла инкапсулированным гликоконъюгатам (Мм 1500-2000 кДа) выходить из МК, в то время как антитела (IgG, IgM) легко проникали внутрь МК и специфически связывались с антигенами.

Электростатический генератор микрочастиц (напряжение 7,8 кВ) позволил снизить средний размер Са-альгинатных частиц до 270 мкм. МК, полученные на их основе, интересны для получения мультиклеточных опухолевых сфероидов (МОС), представляющих собой трехмерные *in vitro* модели раковой опухоли. Такие МК обеспечивали формирование сфероидов при культивировании в них клеток аденокарциномы молочной железы (MCF-7), при этом количество живых клеток было существенно выше в сравнении с таковым для МК со средним размером 750-900 мкм.

## POLYELECTROLYTE MICROCAPSULES FOR ENTRAPMENT OF BIOACTIVE MOLECULES AND ANIMAL CELLS: OPTIMIZATION OF PREPARATION TECHNIQUES

*Zaytseva-Zotova D.S., Selina O.E., Bovin V.N., Markvicheva E.A.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia  
E-mail: [dariaz.z@gmail.com](mailto:dariaz.z@gmail.com)  
Fax: (495) 335-71-03; tel.: (495) 336-06-00

Immobilization of bioactive molecules (peptides, DNA, oligonucleotides, etc.) and animal cells in biocompatible polymeric microcapsules (MC) is a promising approach widely used in biotechnology and biomedicine. The main advantage of this technique is the possibility to vary polymer composition of MC as well as their physico-chemical characteristics (MC size distribution, polyelectrolyte membrane thickness, its stability, permeability, etc). As a result, a spectrum of MC applications could be significantly extended.

In this work MC based on alginate and chitosan were obtained in three steps. In order to get Ca-alginate beads, Na-alginate solution (2% w/v) was dispersed into 0.5-2% (w/v) CaCl<sub>2</sub> solution. The beads then were incubated in 0.2-0.4% (w/v) oligochitosan (Mm 3.5 kDa, DD 87%) solution to form polyelectrolyte membrane on a bead surface. Finally, hollow MCs were obtained after dissolution of Ca-alginate core with 0.05 M EDTA solution.

The aim of our research was to prepare MC within the range size of 300-900 μm by optimizing MC preparation techniques. In this work two devices were used, in order to disperse Na-alginate solution.

An air flow device allowed to decrease Ca-alginate bead size down to 750-900 μm. MC with these sizes were found to be optimal for development of MC-based hemocompatible immunosorbent. The sorbent was based on encapsulated high molecular weight antigens (glycoconjugates) capable to eliminate anticarbohydrate antibodies (IgG, IgM Abs) directly from whole blood. It was shown that the high molecular weight glucoconjugates (Mm 1500-2000 kDa) could not release from MC while Abs easily penetrated through the semi-permeable MC membrane and specifically bound antigens.

An electrostatic bead generator of high voltage (7.8 kV) was used to produce beads of 270 μm in diameter. MC formed from these beads could be proposed to generate multicellular tumor spheroids (a 3-dimensional *in vitro* model of small size solid tumor). These MC were shown to provide a growth of encapsulated human breast adenocarcinoma cells (MCF-7) forming multicellular spheroids after long term cultivation. Furthermore, a viable cell number in spheroids was higher compared to that one for spheroids generated inside 750-900 μm MC.



## ДУОДЕНАЗА – ПРОТЕИНАЗА С ДОМИНИРУЮЩЕЙ ТРЕТИЧНОЙ (КОНФОРМАЦИОННОЙ) СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ

Замолодчикова Т.С.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: tatyana@enzyme.siohc.ras.ru

Дуоденаза – доминантная сериновая протеиназа слизистой двенадцатиперстной кишки жвачных животных, является продуктом секреции дуоденальных желез. Физиологическая роль дуоденазы связана с активацией каскада пищеварительных протеиназ. Дуоденаза также присутствует в тучных клетках тонкого кишечника и поражённых нематодами лёгких. Фермент активирует перитонеальные тучные клетки крысы (*in vitro*) и оказывает митогенное действие на фибробласты лёгочных артерий быка, реализуя свое действие через рецепторы, активируемые протеиназами (PAR). Т.о., дуоденаза, очевидно, является полифункциональной протеиназой – роль фермента не ограничивается регуляцией пищеварения, но может быть сопряжена с функционированием клеток, участвующих в воспалительных процессах, remodelировании тканей и некоторых других процессах.

Структурно дуоденаза наиболее близка к протеиназам иммунокомпетентных клеток (химазы, некоторые гранзимы, катеписин G), образующим особую группу внутри семейства химотрипсина – граназы. Относительно широкая первичная специфичность (трипсино- и химотрипсиноподобная) дуоденазы парадоксально сочетается с выраженной селективностью фермента в отношении белковых субстратов и ингибиторов. Используя кинетические данные, полученные для взаимодействия дуоденазы и других протеиназ с мутантными формами серпинов, удалось провести сравнение каталитической эффективности протеиназ в аспекте соотношения первичной и третичной (конформационной) специфичностей. Введены понятия индексов конформационной и первичной специфичности протеиназ (Ics и Ips, соответственно), соотношение которых (Ics/Ips) характеризует соотношение конформационной и первичной специфичности для определённого фермента. В случае дуоденазы и катеписина G значение Ics/Ips > 1, что свидетельствует о доминирующей роли конформационной специфичности у этих протеиназ. В случае трипсина и химотрипсина Ics/Ips < 1, что характеризует их как ферменты, более чувствительные к природе P1 остатка, чем к конформационным свойствам субстрата.

## DUODENASE – PROTEASE WITH DOMINANT TERTIARY (CONFORMATIONAL) SPECIFICITY

Zamolodchikova T.S.

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia  
E-mail: tatyana@enzyme.siohc.ras.ru

Duodenase – dominant serine protease of ruminant duodenal mucosa, is product of duodenal gland secretion. Physiological role of duodenase is related to proteolytic activation cascade of digestive proteases. Also, duodenase presents in mast cells withing the intestinal mucosa and lungworm-infected lung. The enzyme activates rat peritoneal mast cells (*in vitro*) and exerts mitogenic action toward pulmonary arterial fibroblasts, realizing its action through the receptors, activated by proteases (PAR). Obviously, duodenase has many functions – its role does not restricted by regulation of digestion, but may be connected with function of cells, participating in the inflammation, tissue remodeling and some others.

Duodenase structurally is the most related to proteases of immunocompetent cells (chymases, some granzymes, cathepsin G), which together form special protease group within chymotrypsin family – granases. Relatively broad primary specificity (trypsin- and chymotrypsin-like) of duodenase paradoxically combines with marked selectivity of the enzyme towards protein substrates and inhibitors. Using kinetic data obtained for interaction of duodenase and other proteases with mutant forms of serpins, it became possible to compare catalytic activity of the proteases in respect of correlation of primary and tertiary (conformational) specificities.

Notions of conformational and primary specificity indexes (Ics and Ips, correspondingly) were introduced, the ratio Ics/Ips defines ratio conformational and primary specificity for certain enzyme. In the case of duodenase and cathepsin G the indexes ratio value Ics/Ips > 1, meaning that conformational component is predominates in duodenase specificity. In the case of trypsin and chymotrypsin value Ics/Ips < 1, that characterizes it as enzymes which are more sensitive to P1-residue nature than to the conformational properties of the substrate.

## ПРИМЕНЕНИЕ АССОЦИАТИВНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ФИТОПАТОГЕНАМ И КСЕНОБИОТИКАМ

Захарченко Н.С., Пиголева С.В., Бурьянов Я.И.

Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, Россия  
E-mail: zachar@fibkh.serpukhov.su

Изучение микробно-растительного взаимодействия является важной задачей современной биотехнологии. Симбиотические и ассоциативные микроорганизмы способствуют эффективному потреблению растениями минеральных веществ, снабжают их витаминами и регуляторами роста, защищают от фитопатогенов и вредителей, участвуют в процессах биоремедиации. Понимание молекулярно-физиологических механизмов взаимодействия микроорганизмов с растениями важно для успешного применения экологически безопасных микробиологических методов защиты окружающей среды.

Объектом исследований были метилотрофные бактерии *Methylovorus mays* VKM B-2221 и ризосферный штамм псевдомонад *Pseudomonas aureofaciens* 1393. Аэробные метилотрофные бактерии используют в качестве источника углерода и энергии метанол, выделяемый растениями в процессе метаболизма. В свою очередь, растения получают от метилотрофов витамины, полисахариды, фитогормоны и другие биологически активные соединения. Колонизация капусты белокачанной, сахарной свеклы и табака штаммом *M. mays* приводила к повышению всхожести семян, корнеобразования проростков *in vitro*, стимуляции роста, повышенному содержанию пигментов и общего растворимого белка, оптимизации работы фотосинтетического аппарата. Колонизация способствовала интенсификации ростовых процессов надземной и корневой частей растений при адаптации в условиях *in vivo*, обеспечивала больший процент прижившихся регенерантов, в результате чего длина стеблей и показатель развития корневой системы "эффективность укоренения" были почти в 1,5-2 раза выше, чем у неколонизованных растений. Колонизация способствовала повышению устойчивости растений к фитопатогенным бактериям *Erwinia carotovora* B15.

Штаммы *Pseudomonas* способны стимулировать рост растений за счет синтеза фитогормонов, улучшения минерального питания растений и защиты от фитопатогенов, продуцируя антибиотики, сидерофоры, цианид водорода. Штамм *Ps. aureofaciens* BS1393 обладает антифунгальными свойствами за счет синтеза феназинкарбоновой кислоты. Проведена колонизация растений томатов и табака этим штаммом. При клональном микроразмножении ассоциативность микроорганизмов с растениями стабильно сохранялась. Микроскопическое исследование локализации микроорганизмов подтвердило присутствие их на поверхности растительных тканей. Растения, колонизированные *Ps. aureofaciens*, проявляли повышенную устойчивость к грибным и бактериальным патогенам *Sclerotinia sclerotiorum* и *E. carotovora* B15. Проведено изучение влияния плазмид биodeградации нафталина на свойства ризосферного штамма *Ps. aureofaciens* BS1393. Колонизация растений данным штаммом, содержащим плазмиды с генами биodeградации нафталина, приводила к повышению устойчивости растений к нафталину – ароматическому соединению, входящему в состав нефти. Колонизация растений полезными штаммами ассоциативных микроорганизмов – перспективный метод для создания экологически безопасных и низкокзатратных биотехнологий для защиты окружающей среды.

Работа выполнена при поддержке грантами РФФИ № 08-08-00406 и № 07-04-00235.

## APPLICATION OF ASSOCIATIVE MICROORGANISMS FOR ENHANCED RESISTANCE OF PLANTS TO PHYTOPATHOGENS AND XENOBIOTICS

Zakharchenko N.S., Pigoleva S.V., Buryanov Ya.I.

Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino, Russia  
E-mail: zachar@fibkh.serpukhov.su

The study of microbial-plant interactions is the important task of contemporary biotechnology. Symbiotic and associative microorganisms contribute to effective consumption by the plants of mineral substances, they supply plants with vitamins and growth regulators, they enhance resistance to phytopathogens and pests, participate in the processes of bioremediation. Understanding of the molecular and physiological mechanisms of interaction between microorganisms and plants is important for the successful application of ecologically safe microbiological methods of environmental protection.

The subject of investigations were the methylotrophic bacteria *Methylovorus mays* VKM B-2221 and the rhizospheric strain *Pseudomonas aureofaciens* 1393. Aerobic methylotrophic bacteria used methanol secreted by plants in the process of the metabolism as the source of carbon and energy. Plants may consume vitamins, polysaccharides, plant hormones and other biologically active compounds produced by methylotrophs. Colonization of cabbage, sugar beet and tobacco by strain *M. mays* led to an increase of seeds germination, rhizogenes of sprouts *in vitro*, growth stimulation, increase of content of pigments and total dissoluble protein, optimization of plant photosynthesis. Colonization leads to the intensification of growth processes of plant top and roots during the adaptation under conditions *in vivo*, ensured the larger percentage of the acclimatized regenerants, as a result of which the length of stems and the index of the development of root system "the effect of taking root" were almost 1,5 times higher than in the control plants. Colonization promoted increased resistance of plants to the phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* B15.

The *Pseudomonas* strains are capable to stimulation of plants growth due to the synthesis of plant hormones, improvement in the mineral nutrition of plants and their protection from phytopathogens producing antibiotics, siderophors, hydrogen cyanide. The strain of *Ps. aureofaciens* BS1393 possesses antifungal properties due to the synthesis of phenazinecarboxylic acid. The colonization of tomatoes and tobacco plants by the strain of *Ps. aureofaciens* is carried out. The association between of microorganisms and the plants stably remained after the microclonal multiplication. The microscopic investigation of microorganisms localization confirmed their presence on the surface of plant tissues. The plants colonized by *Ps. aureofaciens* manifested the enhanced resistance to the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* and bacterial pathogen *E. carotovora* B15. The study of the influence of the plasmids of naphthalene biodegradation on the properties of *Ps. aureofaciens* BS1393 rhizospheric strain of is carried out. The colonization of plants with this strain gave enhanced resistance of plants to naphthalene, aromatic constituent of oil. The colonization of plants by useful strains of associative microorganisms is promising method for creation of ecologically safe and low-expensive biotechnologies for environmental protection.

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (projects N 08-08-00406 and N 07-04-00235).

## ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ РАПСА МАСЛИЧНОГО И КАЛАНХОЭ ПЕРИСТОГО, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ АНТИМИКРОБНЫЙ ПЕПТИД ЦЕКРОПИН P1

Захарченко Н.С., Юхманова А.А., Бурьянов Я.И.

Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, Россия  
E-mail: zachar@fibkh.serpukhov.su

Рапс (*Brassica napus var. oleifera* D.C.) является ценной масличной культурой. По количеству производимого растительного масла рапсу принадлежит третье место в мире после сои и хлопчатника. Решение проблемы стабильного урожая рапса осложняется рядом неблагоприятных факторов, среди которых основное место занимают потери урожая от болезней, вызываемых фитопатогенами. Наиболее перспективным решением повышения устойчивости к фитопатогенам может быть получение трансгенных растений с направленно измененными свойствами за счет экспрессии генов антимикробных пептидов, а именно цекропина P1 (*cecP1*).

Каланхоэ перистое (*Kalanchoe pinnata*) – лекарственное растение с бактерицидными, бактериостатическими свойствами, оказывает противовоспалительное и ранозаживляющее действие. Экспрессия в каланхоэ антимикробного пептида цекропина P1 должна усилить его лекарственные свойства и повысить его ценность для фармакологии и медицины.

Целью нашей работы было получение и анализ трансгенных растений рапса и каланхоэ, экспрессирующих синтетический ген цекропина P1. В качестве источника гена была использована плаزمида pET21d-*cecP1*. Ген цекропина P1 был заново синтезирован при помощи ПЦР с целью фланкирования его концов удобными последовательностями для клонирования в векторы при трансформации растений. В работе использовались три вида конструкций: 1 – вектор pGA482::*cecP1* – ген цекропина P1 был встроен под конститутивный промотор 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV 35S); 2 – вектор pPCV91::*cecP1* – экспрессия клонированного гена *cecP1* осуществлялась под контролем конститутивного суперпромотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (CaMV 35S), содержащего 4 энхансерных последовательности CaMV 35S и нетранслируемую лидерную последовательность  $\Delta\Omega$  тРНК вируса табачной мозаики; 3 – вектор pBM::*cecP1* – ген цекропина P1 клонирован в бинарный вектор pBM, не содержащий селективных и маркерных генов под контролем промотора CaMV 35S. Полученные конструкции переносили в клетки агробактерий GV3101 (pMP90RK) и LBA4404 (PAL4404), которые использовали для трансформации растений. В качестве эксплантов для трансформации использовали листовые диски и гипокотили растений, культивируемых *in vitro*.

Проведены молекулярно-генетический и физиолого-биохимический анализы полученных растений. Присутствие гена цекропина P1 в геноме трансгенных растений было подтверждено методом ПЦР. Уровень экспрессии цекропина P1 определяли Вестерн- и Нозерн-блот анализами. Результаты биотестирования по устойчивости показали, что трансгенные растения картофеля, рапса и каланхоэ проявляли антибактериальную и антифунгальную активности против *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae*, *Sclerotium sclerotiorum* и *Phytophthora infestans*. У различных линий обнаружено значительное уменьшение симптомов заражения вплоть до их полной устойчивости.

Работа поддержана грантами РФФИ № 07-04-00235 и № 09-08-00687.

## OBTAINING AND ANALYSIS OF OILSEED RAPE AND KALANCHOE TRANSGENIC PLANTS EXPRESSING ANTIMICROBIC PEPTIDE CECROPINE P1

Zakharchenko N.S., Yuxhmanova A.A., Buryanov Ya.I.

Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,  
Pushchino, Russia  
E-mail: zachar@fibkh.serpukhov.su

The oilseed rape (*Brassica napus var. oleifera* D.C.) is one the valuable oil plants. In terms of the number produced vegetable oils oilseed rape has a third place in the world after soybeans and cotton. The solution of the problem the stable harvest of rape is complicated by the several negative factors, among which are the major crop losses from diseases caused by phytopathogens. By the most promising solution of increasing the stability to phytopathogens can be obtaining transgenic plants the changed properties due to the expression of the genes of antimicrobial peptide, namely cecropin P1 (*cecP1*).

Kalanchoe (*Kalanchoe pinnata*) is medicinal plant, it possesses bactericidal, bacteriostatic properties, renders the antipyretic and wound-healing action. Expression of the antimicrobial peptide cecropin P1 in kalanchoe will strengthen its medicinal properties and will increase its value for pharmacology and medicine.

The purpose of our work was obtaining and analysis of the transgenic plants of oilseed rape and kalanchoe expressing the synthetic *cecP1* gene. The plasmid pET21d-*cecP1* was used as the source of gene. The *cecP1* gene was anew synthesized by PCR for the purpose of the flanking of its ends by convenient sequences for the cloning into the vectors for the transformation of the plants. In the work three forms of the constructions were used: 1 – pGA482::*cecP1* vector, *cecP1* gene is cloned under the constitutive promoter of 35S RNA of cauliflower mosaic virus (CaMV 35S); 2 – pPCV91::*cecP1* vector, the expression of the cloned *cecP1* gene is achieved under the control of the constitutive super-promoter of 35S RNA of cauliflower mosaic virus (CaMV 35S) which contains 4 sequences of CaMV 35S and untranslated the leader sequence  $\Delta\Omega$  of tobacco mosaic virus RNA; 3 – pBM::*cecP1* vector, *cecP1* gene is cloned under the control of the promoter CaMV 35S into the binary pBM vector which does not contain selective and marker genes. The obtained genetic constructions transferred into the cells of agrobacteria GV3101 (pMP90RK) and LBA4404 (PAL4404) which were used for the transformation of plants. Leaf disks and hypocotyls of the plants which cultivated *in vitro* were used as explants for the transformation.

The genetic, physiological and biochemical analyses of the obtained plants are carried out. The presence of the *cecP1* gene in the genome of transgenic plants was confirmed by PCR. The expression level of cecropin P1 determined by Western and Northern analyses. The results of testing on the resistance to phytopathogens showed that the transgenic rape and kalanchoe plants manifested antibacterial and antifungal activity against *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae*, *Sclerotium sclerotiorum* and *Phytophthora infestans*. The significant decrease of symptoms of infection up to complete plant resistance is discovered in different lines.

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (projects N 07-04-00235 and N 09-08-00687).

**БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДИЛ-ПРОЛИЛ  
ИЗОМЕРАЗЫ SlyD ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ  
АКТИВНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ РЕЦЕПТОРНЫХ БЕЛКОВ  
БАКТЕРИОФАГОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

*Иванова М.А., Чупров-Неточин Р.Н., Семёнов А.М., Шнейдер М.М.,  
Мирошников К.А.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: kmi@ibch.ru

Ключевой момент инфицирования микроорганизмов бактериофагами семейства *Caudoviridae* – связывание с поверхностью клетки-хозяина хвостовых фибрилл или шипов фага. Они связываются с рецепторами на поверхности бактерии и инициируют необратимое присоединение частицы фага и инъекцию ДНК в клетку. В природных условиях сборка и олигомеризация белков фибрилл требуют участия дополнительных белковых факторов, шаперонов, что затрудняет получение рекомбинантных белков.

Для преодоления шаперонного фактора была применена одна из современных белково-инженерных стратегий – создание химерного белка, имеющего в своем составе "белок-носитель", направляющий правильную сборку целевого белка. В этом качестве был использован белок "теплового шока" *E. coli* – пептидил-пролил-изомераза SlyD. На основании КД-спектров и физиологических тестов было выяснено, что полученные химерные белки "SlyD – рецепторный фибриллярный белок фага" обладают нативной конформацией и биологической активностью.

Работа поддержана грантом РФФИ №09-04-00335-а.

**PROTEIN ENGINEERING BASED ON SlyD PEPTIDYL-PROLYL  
ISOMERASE DRIVES THE FOLDING OF RECOMBINANT  
RECEPTOR PROTEINS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*  
BACTERIOPHAGES**

*Ivanova M.A., Chuprov-Netochin R.N., Semenov A.M., Shneider M.M.,  
Miroshnikov K.A.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow,  
Russia  
E-mail: kmi@ibch.ru

The key point of bacteriophage infection is the recognition of specific receptors on the surface of the host cell. In the case of widespread *Caudoviridae* bacteriophages this process is driven by tail fibers and spikes. Their binding mediates irreversible phage attachment and injection of phage DNA into the cell. In natural state assembly and oligomerization of fiber/spike proteins often involves additional helper factors (chaperones). This complicated mechanism is hard to emulate in heterologous conditions, so very few recombinant receptor fiber proteins were obtained so far.

To overcome the chaperone factor we have applied a design of chimeric protein which bears a "protein carrier" domain guiding correct assembly of the target protein. For this purpose we employed *E. coli* peptidyl-prolyl-isomerase SlyD. Based on physico-chemical properties and activity tests of chimeric proteins "SlyD + phage receptor fibrous protein" we can conclude that they possess native conformation and physiologic activity.

The project is supported by RFBR grant N 09-04-00335-a.



**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ  
НАКОПЛЕНИЯ И ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ  
ЦИКЛОИМИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХЛОРИНА  $p_6$  В  
НОРМАЛЬНЫХ И РАКОВЫХ КЛЕТКАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

***Игнатова А.А.*\*\*\*, *Маслова А.С.*\*\*\*\*, *Феофанов А.В.*\*\*\***

\*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

\*\*Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*\*\*Московская государственная академия тонкой химической технологии  
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: aignatova\_83@mail.ru

Метод фотодинамической терапии (ФДТ) рака основан на селективном накоплении фотосенсибилизатора (ФС) в опухоли с последующим локальным облучением светом, которое инициирует генерацию активных форм кислорода, разрушающих опухолевые клетки. Эффективность ФДТ существенно зависит от свойств ФС и особенностей его взаимодействия с нормальными и раковыми клетками.

В данной работе проведено сравнительное исследование взаимодействий циклоимидных производных хлорина  $p_6$  (ЦИХЛ) с нормальными клетками крови человека и клетками миелоидного лейкоза человека K562 и HL60. Для исследований были выбраны три ЦИХЛ, отличающиеся структурой боковых заместителей, зарядом молекулы и внутриклеточной локализацией: 13,15-N-(3-гидроксипропил) циклоимид хлорина  $p_6$  (1), метиловый эфир 13,15-(N-метокси) циклоимида хлорина  $p_6$  (2) и метиловый эфир 13<sup>2</sup>-(N-метилизоникотиниламидо)-13,15-циклоимида мезохлорина  $p_6$  (3). Соединения 1-3 были синтезированы в лаборатории проф. А.Ф.Миронова (МИТХТ, Москва) и, как показано ранее, являются перспективными ФС для ФДТ рака [1-3].

Методом конфокальной микроскопии установлено, что соединения 1-3 эффективно проникают как в лейкозные клетки HL60 и K562, так и в нормальные лейкоциты. В цитоплазме лимфоцитов и гранулоцитов 1-3 характеризуются диффузным равномерным распределением. Для соединения 2 в гранулоцитах обнаружено избирательное накопление в гранулах размером 0,5-1 мкм. В клетках K562 и HL60 наряду с диффузным распределением в цитоплазме для производных 1 и 3 наблюдается концентрирование в околядерной области, а для 2 - избирательное накопление в гранулах. В случае эритроцитов соединения 1-3 связываются с плазматической мембраной и не проникают в цитоплазму. Количественный анализ показал, что исследованные ЦИХЛ накапливаются в гранулоцитах более интенсивно, чем в лимфоцитах. Для соединения 1 это различие - в 2 раза. Накопление 1-3 в лимфоцитах и в клетках лейкоза практически одинаково.

Было обнаружено, что *in vitro* ЦИХЛ проявляют фотоиндуцированную цитотоксичность при субмикромольных концентрациях в отношении как раковых, так и нормальных клеток крови. Без светового воздействия ЦИХЛ

для клеток не токсичны. Наибольшей фотодинамической активностью среди исследованных соединений обладает анионное производное 1. Обнаружено, что нормальные человеческие лейкоциты в 1,5-2 раза, а эритроциты в 2,5-3 раза менее чувствительны к фотодинамическому действию ЦИХЛ, чем клетки рака крови HL60 и K562.

*Литература*

1. Nazarova A., Ignatova A., et al. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2007, **6**, 1184-1196.
2. Karmakova T., Feofanov A., et al. *J. Photochem. Photobiol. B* 2006, **82**, 28-36.
3. Feofanov A., Sharonov G., et al. *Photochem. Photobiol.* 2004, **79**(2), 172-188.



## COMPARATIVE STUDY OF ACCUMULATION AND PHOTODYNAMIC ACTIVITY OF CYCLOIMIDE DERIVATIVES OF CHLORIN $p_6$ IN HUMAN NORMAL AND CANCER BLOOD CELLS

*Ignatova A.A.*\*\*\*, *Maslova A.S.*\*\*\*\*, *Feofanov A.V.*\*\*\*

\*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

\*\* Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

\*\*\*Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow, Russia

E-mail: aignatova\_83@mail.ru

The method of photodynamic therapy (PDT) of cancer is based on selective accumulation of a photosensitizer (PS) in a tumor with the subsequent local light irradiation, which initiates generation of reactive oxygen species destroying tumor cells. Efficiency of PDT essentially depends on properties of PS and features of its interaction with normal and cancer cells.

In this work comparative study of interactions of cycloimide derivatives of chlorin  $p_6$  (CICD) with human normal blood cells and human myeloid leukemia K562 and HL60 cells is carried out. For the investigation three CICD have been chosen differing by structure of substituents, molecule charge and intracellular localization: 13,15-N-(3-hydroxypropyl) cycloimide chlorin  $p_6$  (1), 13,15-(N-methoxy) cycloimide chlorin  $p_6$  methyl ether (2) and 13<sup>2</sup>-(N-methylisonicotinylamido)-13,15-cycloimide mesochlorin  $p_6$  methyl ether (3). The compounds 1-3 have been synthesized in the laboratory of prof. A.F. Mironov (MSAFCT, Moscow). The compounds 1-3 are promising PS for PDT of cancer [1-3].

By the confocal microscopy it is shown that the compounds 1-3 penetrate efficiently into both normal leukocytes and leukemia HL60 and K562 cells. Compounds 1-3 are characterized by diffuse distribution in cytoplasm of lymphocytes and granulocytes. Besides, in granulocytes the compound 2 possesses enhanced accumulation in small (0.5-1  $\mu$ m) vesicular structures. In K562 and HL60 cells diffuse distribution of 1 and 3 in cytoplasm is complemented with accumulation in a perinuclear region, whereas for 2, selective accumulation in small vesicular structures is observed. In the case of erythrocytes 1-3 bind to plasma membrane and do not penetrate into cytoplasm. The quantitative analysis has shown that investigated CICD accumulate in granulocytes more intensively than in lymphocytes. For the compound 1 this distinction reaches the factor 2. Accumulation of 1-3 in lymphocytes and leukemia cells is practically identical.

It was found that *in vitro* CICD show the photoinduced cytotoxicity at submicromolar concentrations for both cancer and normal blood cells. Without light irradiation CICD are not toxic for cells. Among the investigated compounds anionic derivative 1 possesses the greatest photodynamic activity. Normal human leukocytes and erythrocytes are shown to be 1.5-2 and 2.5-3 fold less sensitive to photodynamic action of CICD than leukemia HL60 and K562 cells.

### References

1. Nazarova A., Ignatova A., et al. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2007, **6**, 1184-1196.
2. Karmakova T., Feofanov A., et al. *J. Photochem. Photobiol. B* 2006, **82**, 28-36.
3. Feofanov A., Sharonov G., et al. *Photochem. Photobiol.* 2004, **79**(2), 172-188.

## ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОЛИ НЕСПАРЕННЫХ НУКЛЕОТИДОВ В СТРУКТУРАХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

*Ильинский Н.С.*, *Борисова О.Ф.*, *Калюжный Д.Н.*

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

E-mail: ilinsky\_nick@mail.ru

Факс: (499) 135-14-05; тел.: (499) 135-12-55

Неспаренные основания играют важную структурообразующую роль в различных нуклеиновых кислотах. В последнее время появляется все больше свидетельств о биологической важности неканонических G-квадруплексных структур ДНК. Структурный полиморфизм G-квадруплексов в настоящее время исследуется различными методами.

В данной работе предложен метод, позволяющий изучать структурные свойства НК в растворе. Использованный краситель акридиновый оранжевый (АО) образует два типа комплексов на нуклеиновых кислотах: интеркаляция между парами оснований и образование димеров на неспаренных нуклеотидах. Значительное различие таких оптических свойств мономеров и димеров АО, как положение максимумов поглощения, флуоресценции, времён затухания флуоресценции, даёт возможность оценить долю неспаренных нуклеотидов в различных нуклеиновых кислотах. В данной работе проведено сравнение конформационных особенностей различных квадруплексных структур в нативных условиях.

С использованием комплекса оптических методов определены условия димеризации АО на неспаренных основаниях денатурированной ДНК в растворе, содержащем 0.1 М NaCl, 10мМ фосфатный буфер, pH 8, при температуре 3°C.

По кривым затухания определены вклады в общую флуоресценцию разных форм красителя: свободных мономеров (время жизни 2,7 нс), интеркалированных мономеров (5 нс) и связанных димеров (20 нс). Вклад димерной компоненты использовался для оценки доли неспаренных оснований. Проведена градуировка метода для определения доли неспаренных нуклеотидов с использованием времени жизни флуоресценции на смесях нативной и денатурированной ДНК. В качестве образца с известной долей неспаренных оснований была выбрана дрожжевая тРНК<sup>Phe</sup> (22%). Определены доли неспаренных нуклеотидов в теломерном квадруплексе (TTAGGG)<sub>4</sub> (17%) и квадруплексной структуре из промотора с-Мус онкогена (28%). Полученные значения соответствуют определенным прямыми методами исследования долям неспаренных нуклеотидов в этих структурах.

## FLUORESCENCE METHOD FOR DETERMINATION OF UNPAIRED NUCLEOTIDES IN NUCLEIC ACIDS STRUCTURES

*Ilinsky N.S., Borisova O.F., Kaluzhny D.N.*

Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow, Russia

E-mail: [ilinsky\\_nick@mail.ru](mailto:ilinsky_nick@mail.ru)

Fax: (499) 135-14-05; tel.: (499) 135-12-55

Unpaired bases play the important structure-forming role in nucleic acids. Recently a lot of evidences for biological importance of non-canonical G-quadruplex DNA structures appeared. Structural polymorphism of G-quadruplexes is under extensive study by various methods.

In this work the method permitting to study structural properties of NA in solution was suggested. Acridine Orange (AO) forms two types of complexes on nucleic acids: intercalation between base pairs and formation of sandwich dimers on unpaired nucleotides. The significant difference between spectral characteristics of AO monomers and dimers: position of absorption, fluorescence maximum and times of fluorescence decay give possibility to evaluate a portion of unpaired nucleotides in various nucleic acids conformations. In this work we compared the conformational features of various quadruplexes under physiological condition.

With a set of optical methods the conditions of AO dimerization on unpaired bases of heat denatured DNA in solution containing 0.1 M NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 8, at temperature 3°C, were determined.

Contributions of free monomers (lifetime 2.7 nsec), intercalated monomers (5 nsec) and bound dimers (20 nsec) in the total fluorescence of AO:NA complexes were determined from fluorescence decay curves. The contribution of dimers component was used for assessment of unpaired bases percentage. Calibration of the method was made using the fluorescence lifetimes of mixes of native and denatured DNA. tRNA<sup>Phe</sup> was selected as the reference structure with known percentage (22%) of unpaired nucleotides. Percentage of unpaired bases was defined for the telomeric quadruplex (TTAGGG)<sub>n</sub> (17%) and for the quadruplex structure from c-Myc oncogene promoter (28%). The obtained values correspond to those defined by direct structural methods.

## ПОИСК ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПАРТНЕРОВ НУКЛЕОЗИДДИФОСФАТКИНАЗЫ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА БЫКА

*Какуев Д.Л., Поздеев В.И., Пагаев Р.М., Карацук Г.Н., Костянян И.А., Липкин В.М.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: [kakuev@mx.ibch.ru](mailto:kakuev@mx.ibch.ru);

Факс: (495) 336-61-66; тел.: (495) 336-63-47

Нуклеозиддифосфаткиназа (NDP-киназа, АТФ:NDP фосфотрансфераза КФ 2.7.4.6.) катализирует реакцию переноса концевой фосфата с нуклеозид-5'-трифосфатов на 5'-конец нуклеозид-5'-дифосфатов. NDP-киназа играет ключевую роль в клеточном биосинтезе всех рибо- и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. В сетчатке глаза быка NDP-киназа является основным ферментом, катализирующим синтез внутриклеточного ГТР, субстрата трансдуцина и гуанилатциклазы. NDP-киназы – гексамеры, состоящие из субъединиц с молекулярной массой около 17 кДа. В отличие от ферментов низших организмов гексамеры NDP-киназ млекопитающих состоят из 2-х типов спонтанно ассоциированных субъединиц – NDP-киназы-α и NDP-киназы-β. Субъединицы кодируются двумя независимыми генами и характеризуются высокой степенью гомологии (90%).

Целью данного исследования был поиск функциональных партнеров взаимодействия NDP-киназы-α сетчатки глаза быка методом дрожжевой двухгибридной системы MATCHMAKER фирмы Clontech. Проведенный скрининг показал, что основным партнером взаимодействия NDP-киназы-α, как и ожидалось, является NDP-киназа-β. Кроме того, NDP-киназа-α взаимодействует с легкой цепью динеина 1 типа (dynein light chain roadblock-type 1). Данный белок принадлежит к древнему семейству регуляторов NTRаз и участвует во внутриклеточном транспорте. Подтверждение взаимодействия NDP-киназы α с легкой цепью динеина 1 типа проводили *in vitro* с помощью иммунопреципитации.

## TWO-HYBRID INTERACTION PARTNER SCREENING FOR BOVINE RETINA NDP-KINASE

Kakuev D.L., Pozdeev V.I., Pagaev R.M., Karaschuk G.N., Kostanyan I.A., Lipkin V.M.

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: kakuev@mx.ibch.ru

Fax: (495) 336-61-66; tel.: (495) 336-63-47

Nucleoside diphosphate kinase (ATP: nucleoside diphosphate phosphotransferase, EC 2.7.4.6; NDP kinase) catalyses the phosphorylation of nucleoside diphosphates into triphosphates. Nucleoside diphosphate kinase plays a key role in cell biosynthesis of ribo- and deoxyribonucleoside triphosphates. In retina NDP kinase is the main enzyme which catalyses biosynthesis of intracellular GTP that is a substrate for transducin and guanylate cyclase. In photoreceptor cells GTP plays an important role in mechanisms of photoexcitation and dark adaptation. NDP kinase are typically hexamers of small subunits with molecular mass of about 17 kDa. In contrast to the enzymes of lower organisms, the NDP kinase of mammals contains two sorts of randomly associated high homological (90%) subunits of 152 residues each – NDP-kinase- $\alpha$  and NDP-kinase- $\beta$ .

The objective of this research was a search of functional interaction partners of bovine retina NDP-kinase- $\alpha$  with the method of yeast two-hybrid system MATCHMAKER ("Clontech", USA). The performed screening has shown that the principal partner of NDP-kinase- $\alpha$  interaction is most likely NDP-kinase- $\beta$ . Besides, NDP-kinase- $\alpha$  cooperates also with dynein light chain roadblock-type 1. This protein is a member of ancient family of NTPse regulators and participates in endocellular transport. *In vitro* the interactions revealed by the yeast two-hybrid screening was confirmed biochemically by coimmunoprecipitation of the recombinant proteins.

## ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТЕИНКИНАЗЫ МАК-V И УБИКВИТИН-ЛИГАЗЫ Nedd4

Калиниченко С.В., Вихрева П.Н., Коробко И.В.

Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

E-mail: skalin@rambler.ru

Факс: (499) 135-41-05; тел.: (499) 135-99-70

Протеинкиназа МАК-V относится к семейству АМПК-подобных протеинкиназ, являющихся регуляторами важнейших клеточных процессов. Предполагается, что МАК-V может принимать участие в процессах развития, контроле клеточной пролиферации и функционирования нервной системы, однако молекулярные механизмы действия МАК-V практически неизвестны.

Нами был проведен поиск белков, взаимодействующих с МАК-V в клетке, в качестве первого шага в изучении молекулярных механизмов ее действия и регуляции. При аффинной очистке МАК-V выделяется в комплексе с другими клеточными белками, которые были очищены и идентифицированы методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. В результате было установлено, что E3 убиквитин-лигаза Nedd4 является одним из основных белков, очищаемых совместно с МАК-V. Взаимодействие протеинкиназы МАК-V с Nedd4 было подтверждено с помощью коиммунопреципитационного анализа и в двугибридной системе в дрожжах. Анализ взаимодействия делеционных мутантов МАК-V и Nedd4 выявил, что их взаимодействие опосредуется каталитическим доменом протеинкиназы МАК-V и кооперативно C2- и WW-доменами убиквитин-лигазы Nedd4, но не каталитическим НЕСТ-доменом.

Было показано, что аффинно очищенный из клеток препарат МАК-V, содержащий Nedd4, обладает убиквитин-лигазной активностью. При этом убиквитинилирование происходило лишь в присутствии специфических для Nedd4 убиквитин-конъюгирующих ферментов E2. Также было установлено, что МАК-V убиквитинилируется *in vivo* и подвержена протеосома-зависимой деградации. Более того, снижение уровня белка Nedd4 в клетках с помощью РНК-интерференции вызывало увеличение уровня белка МАК-V, что указывает на участие Nedd4 в протеолитической деградации МАК-V.

Итак, нами впервые было выявлено взаимодействие протеинкиназы МАК-V и убиквитин-лигазы Nedd4 и установлены домены обоих белков, обеспечивающие это взаимодействие. Нами было обнаружено, что протеинкиназа МАК-V убиквитинилируется *in vivo*, и полученные результаты указывают на участие убиквитин-лигазы Nedd4 в посттрансляционной регуляции протеинкиназы МАК-V.

## STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN MAK-V PROTEIN KINASE AND Nedd4 UBIQUITIN LIGASE

*Kalinichenko S.V., Vikhreva P.N., Korobko I.V.*

Institute of Gene Biology RAS, Moscow, Russia

E-mail: skalin@rambler.ru

Fax:(499) 135-41-05; tel.:(499) 135-99-70

MAK-V is a member of the AMPK subfamily of serine/threonine protein kinases that are key regulators of many cellular processes. MAK-V is expected to be involved in development, control of cell proliferation and nervous system function but molecular mechanisms of MAK-V action remain unknown.

In order to investigate molecular mechanisms of MAK-V action and its regulation, we have searched for MAK-V binding proteins. Affinity isolated from cells MAK-V protein kinase is co-purified with other cellular proteins. These proteins were identified by MALDI-TOF mass spectrometry revealing that E3 ubiquitin ligase Nedd4 is the major protein co-purified with MAK-V. Interaction between MAK-V and Nedd4 was confirmed by co-immunoprecipitation and in yeast two-hybrid system. Analysis of interaction between MAK-V and Nedd4 deletion mutants revealed that their interaction is mediated by MAK-V catalytic domain and cooperatively by C2- and WW-domains of Nedd4 but not by its catalytic HECT-domain.

Purified from cells MAK-V preparation containing Nedd4 ubiquitin ligase possessed a E3 ubiquitin ligase activity which was detected only in the presence of E2 ubiquitin-conjugating proteins which are specific for Nedd4. Next, MAK-V was shown to be ubiquitinated *in vivo* and to be subjected to proteasome-dependent degradation. Moreover, depletion of Nedd4 by RNA interference resulted in increased MAK-V protein level thus indicating that Nedd4 participates in the proteasome-dependent degradation of MAK-V.

Summarizing, we first revealed interaction between MAK-V protein kinase and Nedd4 ubiquitin ligase and identified domains responsible for the interaction. We found that the MAK-V protein kinase is ubiquitinated *in vivo*, and our results suggest that Nedd4 ubiquitin ligase might be involved in post-translational regulation of the MAK-V protein kinase.

## КУЛЬТУРА ЛЬНА ЖЕЛТОГО КАК ИСТОЧНИК ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛИГНАНОВ

*Карягина Т.Б., Гукасова Е.А., Баирамшвили Д.И.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: tankar@kou.ibch.ru

Одним из противоопухолевых средств растительного происхождения, применяемых в химиотерапии онкологических заболеваний, является этопозид (Etoposide)-4-деметилэпиподофиллотоксин 9-[4,6-O-R-этилиден]-b-D-гликопиранозид. Применяют этопозид при мелкоклеточном раке легких, опухолях яичек, лимфомах, миелолейкозе, саркоме Капоши.

Этопозид является полусинтетическим производным подофиллотоксина (ПТ), который выделяют из корневищ *Podophyllum hexandrum (emodi)* и *P. peltatum* (Podophyllaceae), где его содержание достигает 4,9% и 0.25-1.0%, соответственно. Однако, эти растения растут очень медленно, а из-за интенсивного использования их ареал постепенно сокращается, что делает необходимым поиск альтернативных путей получения данного лигнана. Содержание ПТ в растениях других видов недостаточно для использования их в качестве промышленного источника. Химический синтез сегодня применяют для модификаций различных участков молекулы ПТ с целью повышения терапевтической активности или для устранения нежелательных побочных эффектов. В растениях рода *Linaceae* было найдено производное ПТ, обладающее высокой цитотоксической активностью – 5-метоксиподофиллотоксин (5МПТ). Однако, в интактных растениях его содержание не превышает 0.5% на сухой вес. В культурах клеток *Linaceae* содержание 5МПТ может превышать его содержание в растениях (около 1-4%).

В связи с поиском альтернативных источников получения противоопухолевых лигнанов в группе клеточных культур растений лаборатории биотехнологии ИБХ РАН была получена дифференцированная культура *L. flavum* стеблевого происхождения. В процессе культивирования в клетках льна накапливаются 5МПТ, гликозид 5МПТ, а в качестве минорных соединений синтезируются два оптических изомера 2 $\alpha$ ,4 $\beta$ - и 2 $\alpha$ ,4 $\alpha$ -5МПТ, ПТ,  $\alpha$ - и  $\beta$ -пелтатин, 5'-деметокси-5МПТ. Основным лигнаном, накапливающимся в этой культуре, является 5МПТ, на долю которого приходится 85-92% от общей суммы лигнанов и составляет 280-325.5 мг/л. Оптимизация условий культивирования позволяет увеличить продуктивность культуры в два раза. Отработанная лабораторная схема выделения дает возможность получать препарат 5МПТ 98% чистоты.

Результаты исследования могут быть использованы в биотехнологических разработках для промышленного получения экологически чистого лекарственного сырья, а также при поиске новых эффективных лекарственных препаратов на основе 5МПТ.



## YELLOW FLAX BREEDING AS A SOURCE OF ANTI-CANCER LIGNANS

*Karyagina T.B., Gukasova E.A., Bairamashvili D.I.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: tankar@kou.ibch.ru

One of the anti-cancer plant preparations, which are used in chemotherapy of oncological diseases, is etoposide-4-dimethyl epipodo-phyllotoxin 9-[4,6-O-R-ethylidene)-b-D-glucopyranoside. Etoposide is used for the treatment of small cell carcinoma of lung, orchioncus, lymphomas, myeloleukemia, Kaposi's sarcoma.

Etoposide is a semisynthetic derivative of podophyllotoxin (PT), which is extracted from the rhizomae of *Podophyllum hexandrum* (emodi) and *P. peltatum* (Podophyllaceae) where its concentration reaches 4,9% and 0,25-1,0%, respectively. However, these plants grow very slowly and due to the overdraft their habitat is shrinking which makes the search for alternative ways of obtaining of the given lignan necessary.

The concentration of podophyllotoxin (PT) in plants of other species is insufficient for their use as an industrial source. Nowadays chemical synthesis is used for the modification of different patterns of podophyllotoxin (PT) molecule in order to increase therapeutic activity or to eliminate adverse drug reactions. The derivative of podophyllotoxin with high cytotoxic activity – 5-methoxy podophyllotoxin (5 MPT) was found in plants which belong to species *Linaceae*. But its concentration in intact plants doesn't exceed 0,5% (dry basis).

In connection with the search for alternative sources of anti-cancer lignan extraction from cell culture groups of plants of the biotechnological laboratory IBCh RAS differentiated cell culture *L. flavum* of cauline origin was obtained. In the process of cultivation 5-methoxy podophyllotoxin (5 MPT), 5-methoxy podophyllotoxin (5 MPT) glycoside accumulates in flux cells, two enantiomers 2 $\alpha$ ,4 $\beta$ - and 2 $\alpha$ ,4 $\alpha$ -5 MPT, PT,  $\alpha$ - and  $\beta$ -peltatin, 5'-dimethoxy 5 MPT are synthesized as minor compounds.

The main lignan which accumulates in this culture is 5 MPT, which accounts for 85-92% of the total amount of lignans. The accumulation of lignans takes place in the cells of the culture and amounts to 280-325.5 mg/l. Optimization of cultivation conditions allows twofold increase in cell culture capacity. Tried and tested laboratory-scale extraction system makes obtainment of the preparation 5 MPT of 98% purity possible.

Research results can be used in biotechnological developments for commercial production of ecologically sound drug raw materials, as well as in search for new effective pharmaceuticals based on 5 MPT.

## ОЦЕНКА ПРОЦЕССА СПИРТОВОГО БРОЖЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОДНОГО БИОСЕНСОРА, ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО К ГЛЮКОЗЕ И ЭТАНОЛУ

*Китова А.Е., Каманин С.А.\*, Решетилов А.Н.*

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино, Россия

\*Тулский государственный университет, Тула, Россия

E-mail: kitova\_a@rambler.ru

Тел.: (4967) 73-16-66

Оценка эффективности процесса сбраживания глюкозы в этиловый спирт является актуальной прикладной задачей. Для технолога важны такие параметры процесса, как количество исходной глюкозы, находящейся в ферментере, скорость ее трансформации в этанол, количество получаемого этилового спирта. Как правило, у технолога имеются данные характеристики от производителя, которые отражают только средние значения параметра активности и данные по ферментационной процедуре, что может оказаться недостаточным для оптимального проведения процесса. В данной работе исследуется возможность построения характеристической кривой ферментационного процесса сбраживания, полученной с использованием биосенсорного подхода. Очевидным вариантом контроля данного процесса является использование двух биосенсоров при непрерывном измерении - глюкозного на основе глюкозооксидазы и алкогольного на основе алкогольоксидазы. Цель исследования состояла в снижении количества сенсоров и измерении проб одним биосенсором, чувствительным к двум субстратам (глюкозе и этанолу). Для решения были намечены два подхода: первый основан на измерении характеристической кривой с помощью ферментного биосенсора, содержащего совместно иммобилизованные глюкозооксидазу и алкогольоксидазу, во втором рассматривалась возможность замены ферментов бактериальными клетками *Gluconobacter*.

Проведен мониторинг модельного процесса брожения биферментным и микробным сенсорами. Получены характеристические кривые процесса. Биосенсорный сигнал как от биферментного, так и от микробного сенсоров был представлен монотонно растущей зависимостью сигнала от времени, для которого можно выделить характерные точки достижения уровня 50% ( $t_{1/2}$ ) – условно середина процесса брожения, максимальный наклон кривой ( $h$ , интенсивность брожения) и максимальное значение  $V_{\text{макс}}$  (завершающая стадия). Качественно кривые, полученные биферментным методом измерения и микробным биосенсором, были идентичны, что свидетельствует о возможности использования единственного микробного биосенсора для мониторинга.



## ASSESSMENT OF ALCOHOL FERMENTATION PROCESS WITH THE USE OF GLUCOSE- AND ETHANOL-SENSITIVE BIOSENSOR

*Kitova A.E., Kamanin S.A. \*, Reshetilov A.N.*

G.K. Skriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms  
RAS, Pushchino, Russia

\*Tula State University, Tula, Russia

E-mail: kitova\_a@rambler.ru

Tel.: (4967) 73-16-66

Evaluation of the process of glucose fermentation into ethyl alcohol is a topical applied task. The technologist needs to know the process parameters among them: the amount of glucose in the fermenter at the initial stage, the rate of its transformation into ethanol, the quantity of ethyl alcohol produced. In fact, the technologist receives this information from the manufacturer, but it represents only mean values of activity parameter and data on fermentation procedure. It may be insufficient for optimum process performance. In this work the possibility of constructing a characteristic curve of fermentation process plotted with the use of a biosensor-based approach is investigated. An obvious alternate control of this process is the employ of two biosensors (glucose-sensitive glucose oxidase biosensor and alcohol-sensitive alcohol oxidase biosensor) at continuous measurement. The objective of the study was to reduce a number of sensors and measure samples using one biosensor which is sensitive to both substrates (glucose and ethanol). To implement this task two approaches have been elaborated: the first one suggests the measurement of characteristic curve with the use of an bienzyme biosensor which contains immobilized glucose oxidase and alcohol oxidase, the second technique considers the possibility of replacing enzymes with bacterial cells of *Glucobacter*.

Monitoring of a model fermentation process has been carried out with the use of bienzyme and microbial sensors. Characteristic curves of the process have been plotted. Biosensor signals from bienzyme and also microbial sensors have been picked up and signal-time curve has been plotted. It is a monotonically increasing graph where the following characteristic points can be pointed out: the achievement 50% level ( $t_{1/2}$ ) (conventionally the middle stage of the process), maximum slope of a curve ( $h$ , intensity of fermentation) and maximum value of the signal ( $V_{max}$ , completion stage). In a qualitative sense curves plotted based on bienzyme method of measurement and microbial biosensor were identical. This fact counts in favor of the possibility of using only the microbial biosensor for monitoring.

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ НАНОПРОВОЛОКИ НА ОСНОВЕ ДНК И ДНК-ПОДОБНЫХ СТРУКТУР

*Клинов Д.В.*

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

E-mail: klinov.dmitry@mail.ru

Фундаментальной задачей наноэлектроники является создание электронных устройств и проводников молекулярных размеров. Решение этой задачи позволило бы конструировать сверхбыстрые и сверхкомпактные компьютеры, использующие принципиально новые квантовые алгоритмы. Значительная активность в этой области связана с попытками использования для наноэлектроники фуллеренов и нанотрубок.

Несмотря на уникальные свойства углеродных нанотрубок, их применение в нанотехнологических целях существенно осложнено проблемами управляемого манипулирования ими, использованием в конкретной технологической цепочке, дороговизной и широким разбросом индивидуальных свойств (от диэлектриков до полупроводников и проводников).

Альтернативным кандидатом для использования в качестве молекулярных нанопроволок является молекула ДНК. Как оказалось, помимо важнейшей роли хранилища генетической информации живого организма, молекулы ДНК могут осуществлять транспорт электронов вдоль полимерной цепи и при этом проявлять хорошие проводящие свойства. Однако, воспроизводимость результатов работ по электронному транспорту ДНК, проводимых во многих лабораториях, является недостаточно высокой, что, в первую очередь, связано с тем, что при нанесении молекул ДНК из раствора на твердую подложку происходит существенное искажение нативной структуры, присущей этим молекулам в растворе.

Нами были разработаны подходы, позволяющие уменьшить влияние подложки на структуру адсорбированных молекул ДНК и при этом сохранить их "нативное" состояние. Разработанные методы плазмохимической модификации поверхности позволили добиться хорошей проводимости молекул ДНК [1,2]. В сотрудничестве с Институтом проблем микроэлектроники и особо чистых материалов РАН и Парижским университетом впервые была показана возможность перехода молекул ДНК в сверхпроводящее состояние [1].

Как известно, основной целью молекулярной наноэлектроники является создание молекулярного компьютера с очень высокой плотностью размещения устройств – порядка триллиона на квадратный сантиметр. Размещение с такой огромной плотностью требует сверхмалого рассеяния мощности на каждом работающем устройстве. Предполагается, что лишь сверхпроводящие устройства могут удовлетворять этим требованиям.

Для конструирования молекулярных электронных устройств необходимо научиться "управлять" молекулами, позиционировать их в заданном месте подложки с необходимой ориентацией. Нами были разработаны

методические основы управляемой адсорбции биополимеров, которая подразумевает нанесение или позиционирование молекул в нужном месте подложки с необходимой ориентацией [3].

*Литература*

- [1] A.Yu. Kasumov, M. Kociak, S. Guïron, B. Reulet, V.T. Volkov, D.V. Klinov, and H. Bouchiat, Proximity-Induced Superconductivity in DNA, *Science*, Jan. (2001), 280-282.
- [2] Kasumov A., Klinov D., Roche P.-E., Guïron S., and Bouchiat H., *Applied physics letters*, **84**(6), (2004) 1007-1009.
- [3] Dmitry Klinov, Kirill Atlasov, Alexander Kotlyar, Benjamin Dwir, Eli Kapon, DNA Nanopositioning and Alignment by Electron Beam-Induced Surface Chemical Patterning, *Nano Letters* (2007) **7**(12):3583-3587.

## MOLECULAR NANOWIRES BASED ON DNA AND DNA-LIKE STRUCTURES

***Klinov D.V.***

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: klinov.dmitry@mail.ru

Fundamental problem of nanoelectronics is building electronic systems and conductors of molecular dimensions. The decision of this problem would allow to design the superfast and supercompact computers using essentially new quantum algorithms. Huge activity in this range is associated with attempts of use the fullerenes and nanotubes for nanoelectronics.

In spite of unique properties of carbon nanotubes their application for nanotechnological purposes is essentially complicated due to problems of a controlled manipulation them, use in a certain technological scheme, wide range of individual properties (from dielectrics to semiconductors and conductors).

The alternative candidate for use as molecular nanowire is DNA molecule. As has appeared, besides the major role of storage of the genetical information of an organism, DNA molecule can carry out the transport of electrons along a polymeric chain and has good conductive properties. However, reproducibility of experiments on the electronic transport of DNA, made in many laboratories is insufficiently high, that first of all, is due to an essential distortion of native structure by transition DNA from solution on the substrate.

We have developed the approaches, allowing one to reduce influence of the substrate on DNA structure and to save "native" state of DNA molecules. The developed methods of plasma-chemical activation of a surface have allowed to achieve excellent conduction of DNA molecules [1,2] and in cooperation with Institute of Problems of Microelectronics and Pure materials of the Russian Academy of Sciences and the Paris University, for the first time, we have show the opportunity of transition of DNA molecules in a superconducting state [1].

As known, the basic purpose of molecular nanoelectronics is construction of a molecular computer with very high density of devices - about billion on square centimeter. uch huge density of elements demands a weak scattering of power on each working device. It is evident, that only superconducting systems can provide these requests.

For designing molecular electronic devices it is necessary to study "to operate" of individual molecules, to position them in the set place of the substrate with necessary orientation. We have developed methodical bases of controlled adsorption of biopolymers. Controlled adsorption means positioning of molecules in the necessary place of the substrate with necessary orientation [3].

*References*

- [1] A.Yu. Kasumov, M. Kociak, S. Guïron, B. Reulet, V.T. Volkov, D.V. Klinov, and H. Bouchiat, Proximity-Induced Superconductivity in DNA, *Science*, Jan. (2001), 280-282.
- [2] Kasumov A., Klinov D., Roche P.-E., Guïron S., and Bouchiat H., *Applied physics letters*, **84**(6), (2004) 1007-1009.
- [3] Dmitry Klinov, Kirill Atlasov, Alexander Kotlyar, Benjamin Dwir, Eli Kapon, DNA Nanopositioning and Alignment by Electron Beam-Induced Surface Chemical Patterning, *Nano Letters* (2007) **7**(12):3583-3587.

## АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА 70 кДа И ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В НЕЙТРОФИЛАХ ДОЛГОЖИТЕЛЕЙ

*Коваленко Е.И., Бойко А.А., Гречихина М.В., Каневский Л.М., Луценко Г.В., Семенов В.Ф.\*, Сапожников А.М.*

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

\*Российский геронтологический научно-клинический центр, Москва, Россия

Важная роль нейтрофилов в организме заключается в быстром ответе на бактериальную инвазию. С возрастом микробоцидная активность гранулоцитов уменьшается, что связывают с нарушением продукции активных форм кислорода (АФК) в ответ на инфекционное либо стрессирующее воздействие. В то же время, существует гипотеза, что пролонгированная продукция АФК нейтрофилами, оказывающая повреждающее действие на клетки, играет существенную роль в процессе старения. Внутриклеточные шапероны, белки теплового шока (БТШ), участвуют в защите клеток от таких повреждающих воздействий. Уровень индукции экспрессии БТШ в ответ на неблагоприятное воздействие может снижаться с возрастом, что свидетельствует о возможном взаимодействии процессов продукции АФК с протективной системой БТШ. Целью данной работы явилось изучение взаимосвязи продукции АФК и внутриклеточной экспрессии белков теплового шока 70 кДа (БТШ70) в нейтрофилах доноров возрастной группы 90 лет и старше в норме и при ответе на тепловой стресс.

Образцы периферической крови были получены от доноров, принадлежащих к возрастной категории 90 лет и старше. Регистрацию внутриклеточного уровня АФК и содержания БТШ70 в нейтрофилах проводили методом проточной цитофлуориметрии. Продукцию внеклеточных АФК нейтрофилами в процессе фагоцитоза зимозана определяли методом люминол-зависимой хемилюминесценции. Тепловой шок образцов клеток проводили при 43°C в течение 10 мин.

Полученные результаты обнаружили положительную корреляцию между концентрацией внутриклеточных АФК в нейтрофилах и уровнем зимозан-индуцированного выброса АФК этими клетками. Указанная корреляция сохранялась и для образцов нейтрофилов, обработанных кратковременной гипертермией. Однако, в результате теплового шока амплитуда зимозан-индуцированного "кислородного взрыва" нейтрофилов значительно снижалась. В наших экспериментах не наблюдалось взаимосвязи между базальным уровнем экспрессии БТШ70 и продукцией АФК нейтрофилами. Гипертермия, как и ожидалось, приводила к увеличению концентрации внутриклеточных БТШ70 в обработанных клетках. В этих экспериментах была выявлена достоверная отрицательная корреляция значений БТШ70, зарегистрированных сразу после теплового шока, и уровнями внутриклеточного содержания (как до, так и после гипертермии) и внеклеточной продукции нейтрофилами АФК.

Таким образом, была выявлена тесная взаимосвязь уровня экспрессии БТШ70 с продукцией АФК в гранулоцитах долгожителей. Продемонстрирована корреляция низких значений внутриклеточных и внеклеточных АФК с высоким уровнем ответа БТШ70 на тепловой стресс у нейтрофилов людей с большой продолжительностью жизни.

## ANALYSIS OF EXPRESSION OF HEAT SHOCK PROTEIN 70 kDa AND REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION IN HUMAN NEUTROPHILS IN ELDERLY AGE

*Kovalenko E.I., Boyko A.A., Grechikhina M.V., Kanevski L.M., Lutsenko G.V., Semenov V.F.\*, Sapozhnikov A.M.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

\*Russian Gerontological Scientific Clinical Center, Moscow, Russia

An important role of neutrophils consists in swift response to bacterial invasion. The microbicide activity of neutrophils decreases with the age, that is explained by defects in production of reactive oxygen species (ROS) in response to infectious or stressing external action. At the same time, in accordance with current hypothesis prolonged ROS production damaging different tissues of organism plays an essential role in ageing process. Intracellular chaperones, heat shock proteins (HSP), protect cells from such damaging factors. But level of HSP expression in cell response to unfavorable action might be decreased with the age, that suggest a possible relationship between ROS production, HSP synthesis and aging process. In this work, correlation analysis was applied to analyze relationship between ROS production and intracellular Hsp70 in neutrophils of elderly people.

Neutrophils were isolated from peripheral blood of donors of 90 years old and older. Intracellular ROS and Hsp70 levels were registered by flow cytofluorimetry. Extracellular ROS production from zymosan-activated neutrophils was detected by luminol-dependent chemiluminescence. For heat shock of the cell samples neutrophils were incubated at 43°C for 10 min.

A positive correlation was determined for intracellular ROS level and zymosan-induced extracellular ROS release in neutrophil samples. The correlation was unaffected by heat shock of neutrophils, although this treatment decreased significantly the level of "oxidative burst" during phagocytosis. There was no correlation between basal concentration of intracellular Hsp70 in the cells and ROS level, both intracellular and extracellular. As it was expected, heat shock resulted in essential rise of Hsp70 expression in treated cells. In these experiments significant negative correlation was registered between Hsp70 level detected immediately after hyperthermia and intracellular ROS concentration (both before and after heat shock) and zymosan-induced ROS release.

Thus, close relationship between level of intracellular Hsp70 and ROS production in neutrophils of long-livers was found. For this age group essential correlation of low ROS values (both intracellular and extracellular) with high Hsp70 response to thermal stress was demonstrated.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ ПРОМОТОРА ГЕНА *PTEN* ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЭНДОМЕТРИЯ И ЯИЧНИКОВ

*Коваленко Т.Ф., Патрушев Л.И.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
Тел.: (495) 429-86-10  
E-mail: tkov@mx.ibch.ru

В настоящее время известно, что aberrантное метилирование промоторов ряда генов играет существенную роль в развитии многих онкологических заболеваний. Следовательно, изучение подобных эпигенетических изменений является актуальной задачей биологии и медицины.

Ген *PTEN* является геном-супрессором опухолей, генетические и эпигенетические изменения в котором отмечаются при многих спорадических и наследственных онкологических заболеваниях. Ранее нами было обнаружено, что эффективность амплификации участка промотора гена *PTEN*, обозначенного как локус *PN-1*, на ДНК, выделенной из опухолевых тканей эндометрия и яичников, зависит от присутствия в реакционной смеси энхансеров ПЦР: 2-пирролидона или DMSO. Было выявлено три типа ДНК-матриц: матрицы, на которых происходит амплификация *PN-1* в присутствии 2-пирролидона или DMSO в реакционной смеси (P+D+); матрицы, на которых происходит амплификация только при наличии DMSO (P-D+), и матрицы, на которых продукт ПЦР не образуется при добавлении любого из упомянутых энхансеров ПЦР (P-D-). Мы предположили, что причиной затруднения амплификации локуса *PN-1* является метилирование ДНК на данном участке.

В настоящей работе доказательство влияния метилирования на эффективность ПЦР осуществляли сравнением эффективности амплификации локуса *PN-1* на искусственных метилированной и неметилированной матрицах в присутствии 2-пирролидона в реакционной смеси. Такими матрицами являлись продукты ПЦР, полученные при амплификации участка промотора гена *PTEN* длиной 620 п.о. в присутствии остатков цитозина (неметилированная матрица) или 5-метилцитозина (метилированная матрица) в реакционной смеси. Было показано, что при амплификации локуса *PN-1* на искусственной неметилированной матрице продукт ПЦР появляется на 15 цикле, тогда как на метилированной матрице образование продукта отмечается на 31 цикле ПЦР.

Также было проведено исследование статуса метилирования промотора гена *PTEN* в образцах ДНК из опухолевых тканей эндометрия и яичников методом метилчувствительного секвенирования. Контролем служила ДНК, выделенная из здоровой ткани (венозная кровь). Геномная ДНК подвергалась конверсии бисульфитом натрия и далее служила матрицей при амплификации участка промотора размером 618 п.о., включающем локус *PN-1* и прилегающие последовательности (от -1214 до -596). Образовавшиеся

продукты ПЦР были секвенированы. При анализе 5 образцов ДНК, относящихся к типу P-D+, было обнаружено, что метилировано от 51 до 79% CpG-динуклеотидов, расположенных в пределах исследуемого фрагмента. Кроме того, было выявлено метилирование остатков цитозина, входящих в состав последовательностей, отличных от CpG. При этом метилирование промотора гена *PTEN* полностью отсутствовало в контрольном образце ДНК. Анализ промотора гена *PTEN* в образце ДНК типа P-D- выявил метилирование 64,7% CpG- пар. Также наблюдалось метилирование остатков цитозина, входящих в состав CpA-, CpT- и CpC-динуклеотидов. При этом отмечалось неравномерное распределение метилированных остатков цитозина в пределах анализируемой области промотора гена *PTEN*: все метилированные основания были локализованы на участке от -1036 до -618.

Таким образом, нами было обнаружено aberrантное метилирование (эпимутации) промотора гена *PTEN* при опухолевых заболеваниях эндометрия и яичников, а также показано влияние метилирования на эффективность ПЦР-амплификации участка промотора.



## INVESTIGATION OF *PTEN* GENE PROMOTER METHYLATION PATTERNS IN PATIENTS WITH ENDOMETRIAL AND OVARIAN TUMORS

*Kovalenko T.F., Patrushev L.I.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: tkov@mx.ibch.ru

Tel.: (495) 429-86-10

It has been known that aberrant promoter methylation plays a key role in tumor development. Therefore the analysis of such epigenetic modification appears to be a very important task of biological and medical sciences.

Tumor suppressor gene *PTEN* is implicated in the pathogenesis of several familial and sporadic cancers. Our previous studies included findings that efficacy of PCR amplification of the region of *PTEN* promoter (called *PN-1* locus) in DNA samples isolated from endometrial and ovarian tumor tissues depended on the presence of PCR enhancers 2-pyrrolidone or DMSO in the reaction mixture. We revealed three types of tumor DNA templates. The first group (designated P+D+) included DNA templates in which the *PN-1* locus was amplifiable in the presence of 2-pyrrolidone or DMSO. The second group (P-D+) included templates in which this locus was not amplifiable in the presence of 2-pyrrolidone, but the product of PCR was generated in the presence of DMSO. Neither 2-pyrrolidone nor DMSO could stimulate PCR amplification of the *PN-1* locus on the DNA samples that belonged to the third group of DNA templates (P-D-). We supposed that *PTEN* promoter methylation might be the cause of lack of the *PN-1* locus amplification.

Here we used two strategies in order to prove our hypothesis that DNA methylation could affect the PCR amplification. First of all two types of artificial templates (unmethylated and methylated) were engineered. The 620 bp fragment of *PTEN* gene promoter was amplified in the presence of cytosine (unmethylated template) or 5-methylcytosine (methylated template) in the reaction mixture. These unmethylated and methylated fragments were used as templates in the *PN-1* locus PCR amplification in the presence of 2-pyrrolidone in the reaction mixture. We revealed that in case of unmethylated template the PCR product was visible on the 15th cycle of amplification, but in case of methylated template the PCR product was generated on the 31th cycle.

Then we examined *PTEN* promoter methylation status in endometrial and ovarian tumors by methylsensitive sequencing. The DNA samples isolated from venous blood were used as a control. Genomic DNA was treated with sodium bisulfite and then used as a template in the PCR amplification of the 618 bp fragment, included the *PN-1* locus and flanking sequences (from -1214 to -596). The PCR products were purified and sequenced. Five tumor DNA samples that belong to second group of DNA templates (P-D+) were examined. Our results indicated that from 51% to 79% of CpG dinucleotides localized in 618 bp fragment were methylated. Also non-CpG methylation was observed in *PTEN* promoter. Such methylation was not detected in the control DNA. We revealed methylation of *PTEN* promoter in DNA sample that belongs to third type of tumor DNA templates (P-D-). The fraction of CpG-methylation was 64,7%. Also methylation at CpA, CpC and CpT sites was observed. We noticed that in case of P-D- DNA sample all of methylated cytosine residues were localized in the region from - 1036 to - 618.

In summary, we revealed aberrant *PTEN* gene promoter methylation (epimutations) in endometrial and ovarian tumors and showed that methylation influenced on the PCR amplification of *PTEN* promoter region under study.

## СИНТЕТИЧЕСКИЙ ПЕПТИД ИММУНОРФИН – КАК ИНСТРУМЕНТ ИССЛЕДОВАНИЯ НЕОПИОИДНОГО РЕЦЕПТОРА $\beta$ -ЭНДОРФИНА

*Ковалицкая Ю.А., Садовников В.Б., Наволоцкая Е.В.*

Филиал Института биоорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия

E-mail: kovalitskaya@inbox.ru

Известно, что  $\beta$ -эндорфин взаимодействует с двумя типами рецепторов: с классическими опиоидными и неопиоидными, нечувствительными к блоктору опиоидных рецепторов налоксону. Нами установлено, что синтетический  $\beta$ -эндорфинподобный пептид иммунорфин (SLTCLVKGFY), соответствующий фрагменту 364-373 тяжелой цепи IgG человека, является селективным агонистом неопиоидного рецептора  $\beta$ -эндорфина.

С помощью иммунорфина, фрагмента иммунорфина 6-10 – пентарфина, и его циклического аналога – циклопентарфина, эти рецепторы были обнаружены нами на Т-лимфоцитах человека, на перитонеальных макрофагах мыши, на мембранных фракциях из надпочечников, селезенки, миокарда и головного мозга крысы, а также на клетках человеческой Т-лимфобластной линии Jurkat. Исследование биологической активности иммунорфина показало, что он значительно увеличивает индуцированную конканавалином А пролиферацию Т-лимфоцитов человека *in vitro*, стимулирует рост клеток человеческой Т-лимфобластной линии Jurkat и МТ-4, ингибирует активность аденилатциклазы мембран коры надпочечников крысы и подавляет секрецию глюкокортикоидов из надпочечников в кровь. Связывание иммунорфина, пентарфина и циклопентарфина с перитонеальными макрофагами мыши приводило к увеличению способности клеток к адгезии, расплыванию, миграции и перевариванию бактерий вирулентного штамма *Salmonella typhimurium* 415 *in vitro*. Иммунорфин, пентарфин и циклопентарфин стимулируют процессы клеточного деления ранних эмбрионов мыши, образование и выклевание зрелых бластоцист *in vitro*. Действие пептидов на зародыши не блокируется налоксоном.

$\beta$ -Эндорфинподобные пептиды имеют высокое (примерно одинаковое) сродство к неопиоидному рецептору  $\beta$ -эндорфина и любой из пептидов может быть использован в качестве маркера данного типа рецепторов.



## SYNTHETIC PEPTIDE IMMUNORPHIN LIKE INSTRUMENT OF NON-OPIOID $\beta$ -ENDORPHIN RECEPTOR STUDY

*Kovalitskaya Yu.A., Sadovnikov V.B., Navolotskaya E.V.*

Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino, Russia

E-mail: kovalitskaya@inbox.ru

It is known, that  $\beta$ -endorphin is interacting with two types of receptors, classic opioid and non-opioid, not sensitive to antagonist of opioid receptor naloxone. We were found that synthetic  $\beta$ -endorphinlike peptide immunorphin (SLTCLVKGFY), the 364-373 fragment of H-chain of human IgG, is a selective agonist of non-opioid receptor of  $\beta$ -endorphin.

By the help of immunorphin, fragment immunorphin 6-10 – pentarphin and its cyclic analogs cyclopentarphin non-opioid receptors of  $\beta$ -endorphin are situated on human T-lymphocyte, peritoneal mouse macrophages, membrane fractions from rat adrenal, spleen, myocardium and brain, and also on the human T-lymphoblastoid cell line Jurkat. We demonstrated, that immunorphin is significantly increased concanavallin A induced proliferation of human T-lymphocyte *in vitro*, it is stimulated the human T-lymphoblastoid cell lines Jurkat and MT-4 growth. It was found, that immunorphin was inhibited adenylate cyclase activity and release of corticosteroids from adrenal cortex into the blood, when it was injected at the rate intramuscular. The bound of the immunorphin, pentarphin and cyclopentarphin with peritoneal mouse macrophages resulted to the adhesion, spreading, journey enhance of macrophages. Pentarphin and cyclopentarphin are stimulated macrophage to the digestion bacteria of virulent strain *Salmonella typhimurium* 415 *in vitro*. Immunorphin, pentarphin and cyclopentarphin stimulate cell fission of early mouse embryo, formation and hatching of mature blastocyst *in vitro*. The effect of peptides did not block by naloxone.

$\beta$ -Endorphinlike peptides have high (about similar) affinity to non-opioid  $\beta$ -endorphin receptor and each of peptides could be used like a marker of this type of receptors in researches.

## ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ БЕЛКОВ-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ЛИНЕЙНЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ЯДА ПАУКОВ

*Козлов С.А., Василевский А.А., Андреев Я.А., Воронцова О.В., Панкеев Н.Н., Гришин Е.В.*

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

E-mail: serg@ibch.ru

Одной из важных частей системы врожденного иммунитета у животных и растений являются антимикробные пептиды (АМП). Известно большое количество АМП, и, несмотря на большое структурное разнообразие этих пептидов, большинство из них имеет характерные особенности строения, как то: сравнительно небольшой размер (обычно 10-50 аминокислотных остатков), суммарный положительный заряд и амфифильность. С функциональной точки зрения АМП обладают важным свойством, они подавляют рост патогенных микроорганизмов без выработки резистентности к их действию, что позволяет рассматривать АМП как потенциальные терапевтические средства для борьбы с инфекционными заболеваниями. Мишенью для АМП является клеточная мембрана, для разрушения которой необходимы концентрации пептидов порядка 1-20 мкМ. В яде некоторых видов пауков были обнаружены АМП, синтезируемые в виде белков-предшественников, где анионная пропоследовательность, по-видимому, нейтрализует активность АМП во время биосинтеза и хранения. Нами были разработаны методы получения рекомбинантных АМП в *Escherichia coli* в составе слитных белков. На примере одного рекомбинантного пептида – пролатарцина 2a – было проведено изучение влияния природной анионной пропоследовательности предшественника АМП на антимикробную активность.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №08-04-00454).

## STRUCTURAL PECULIARITY OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE PRECURSORS FROM SPIDER VENOM

*Kozlov S.A., Vassilevski A.A., Andreev Ya.A., Vorontsova O.V., Pankeev N.N., Grishin E.V.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: serg@ibch.ru

Antimicrobial peptides (AMPs) are an important part of host defense system (innate immunity) typical for both plants and animals. A great number of AMPs with various structure have been described to this moment, but most of them are characterized by specific features: relatively small size (usually 10-50 amino acid residues), overall positive charge and amphiphilicity. AMPs possess an important functional property to inhibit growth of pathogenic microorganisms without resistance development, which allows regarding them as potential therapeutics to combat infectious diseases. AMPs target the cell membrane that can be damaged at peptide concentrations of around 1-20  $\mu\text{M}$ . In some spider venoms, AMPs have been discovered that are synthesized as precursor proteins containing an anionic prosequence that may neutralize AMP activity during biosynthesis and storage. We developed methods of recombinant AMPs production in *Escherichia coli* as parts of fusion proteins. Using recombinant prolactin 2a as an example, we investigated the impact of the natural anionic prosequence of an AMP precursor on its antimicrobial activity.

## БАКТЕРИАЛЬНАЯ И БЕСКЛЕТОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ДОМЕНА НИКОТИНОВОГО АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА

*Копейна Г.С.\*\*, Люкманова Е.Н. \*, Шулепко М.А.\*\*, Шенкарев З.О. \*, Кашеверов И.Е. \*, Цетлин В.И. \*, Долгих Д.А.\*\*\*, Кирпичников М.П.\*\*\**

\*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

\*\*Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия  
E-mail: katya@nmr.ru

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР) являются лиганд-зависимыми ионными каналами, встроенными в постсинаптическую мембрану нейронов. Одним из широко распространенных в нервной системе млекопитающих является гомопентамер нАХР  $\alpha 7$  типа ( $\alpha 7\text{нАХР}$ ), с дисфункциями которого связано развитие ряда тяжелых заболеваний нервной и эндокринной систем. Исследования нАХР и разработка препаратов для лечения подобных заболеваний требуют наличия высокоэффективных систем продукции отдельных субъединиц и доменов рецептора, создание которых затруднено из-за склонности этих белков к агрегации.

Целью данной работы было создание эффективной системы продукции внеклеточного домена  $\alpha 7\text{нАХР}$  ( $\alpha 7\text{ВД}$ ) человека. Для этого на основе полноразмерного гена  $\alpha 7\text{нАХР}$  было получено два мутантных гена  $\alpha 7\text{ВД}$ , содержащих замены, приводящие к повышению растворимости домена ( $\alpha 7\text{ВД}/\text{DTES}$  и  $\alpha 7\text{ВД}/\text{DTES-6}$ ). На С-конец  $\alpha 7\text{ВД}$  был добавлен His6-tag для облегчения процедуры выделения.

В своей работе мы разработали две системы продукции белка – экспрессия в клетках *E. coli* и бесклеточный синтез. При синтезе обоих мутантных вариантов в этих системах практически весь белок накапливался в виде нерастворимых агрегатов. Причиной агрегации, возможно, служили неправильное формирование дисульфидных связей и стремление фрагмента рецептора к самопроизвольной пентамеризации.

В ходе экспериментов были подобраны условия для ренатурации обоих вариантов белка. Были использованы различные подходы для растворения осадка, включающие как добавление 8 М мочевины, 6 М гуанидинхлорида, так и 1% раствора детергента лаурилсаркозина натрия (LS). Наибольшая эффективность растворения  $\alpha 7\text{ВД}/\text{DTES}$  из осадка была достигнута при использовании смеси 4М мочевины и 1% LS в присутствии ДТТ. Ренатурацию  $\alpha 7\text{ВД}/\text{DTES}$  проводили на металлоафинной смоле в результате промывки смесью GSH/GSSG и в градиенте понижения концентрации мочевины, при этом LS постепенно заменяли на 0.1% додецилфосфохолин (DPC). Анализ белка  $\alpha 7\text{ВД}/\text{DTES}$  в DPC с помощью гель-фильтрации показал, что использование DPC позволило получить гомогенный (>90%) препарат  $\alpha 7\text{ВД}/\text{DTES}$  с диаметром частиц около 7 нм, что соответствует размеру мономера  $\alpha 7\text{ВД}$  (5 нм) в комплексе с мицеллой DPC (4 нм). Анализ вторичной структуры  $\alpha 7\text{ВД}/\text{DTES}$  в растворе DPC методом КД спектроскопии выявил

преобладание  $\beta$ -структуры. Способность  $\alpha 7$ ВД/DTES в растворе DPC взаимодействовать с антагонистами nAChR была исследована методом ЯМР-спектроскопии с использованием  $^{15}\text{N}$ -меченного аналога длинного нейротоксина NPII/NTI. Было показано, что каждая молекула  $\alpha 7$ ВД/DTES специфически связывает две молекулы токсина с эффективной константой около 2 мкМ и сравнительно большой кооперативностью (коэффициент Хилла 1.8).

Для варианта  $\alpha 7$ ВД/DTES-6 был разработан другой протокол ренатурации. Белковый преципитат растворяли в 8М мочевины с добавлением DTT, далее концентрацию мочевины постепенно снижали с помощью диализа против буфера, содержащего смесь GSH/GSSG. Анализ с помощью гель-фильтрации выявил, что полученный таким образом  $\alpha 7$ ВД/DTES-6 представлен преимущественно (>90%) в форме пентамера. Биологическая активность  $\alpha 7$ ВД/DTES-6 была исследована в экспериментах по связыванию с  $^{125}\text{I}$ -меченным бунгаротоксином, полученное значение  $\text{IC}_{50}$  (~10 нМ) свидетельствовало о нативной структуре белка.

Оба варианта гена  $\alpha 7$ ВД были экспрессированы в *E. coli* и в бесклеточной системе. При экспрессии в клетках конечный выход растворимого белка составил примерно 80 мг/л бактериальной культуры, а в случае бесклеточной продукции – 1 мг/мл трансляционной смеси.

## BACTERIAL AND CELL FREE PRODUCTION OF EXTRACELLULAR DOMAIN OF NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR

*Kopeina G.S.* \*\*, *Lyukmanova E.N.* \*, *Shulepko M.A.* \*\*, *Shenkarev Z.O.* \*, *Kasheverov I.E.* \*, *Tsetlin V.I.* \*, *Dolgikh D.A.* \*\*\*, *Kirpichnikov M.P.* \*\*\*

\*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

\*\*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

E-mail: katya@nmr.ru

Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) is ligand-gated ion channel incorporated into postsynaptic membrane of neurons. The several neurodegenerative and endocrinal diseases are related with its disfunctions. The effective systems for production of individual subunits and domains of nAChR are required for studies of receptor and for design of biomedical drugs for disease treatment.

The main goal of present work is the development of effective expression systems for production of human extracellular N-terminal domains of  $\alpha 7$  ( $\alpha 7$ ED). For this aim, on the basis of full-length gene of  $\alpha 7$ nAChR two mutant genes of  $\alpha 7$ ED with substitutions that should increase solubility were constructed ( $\alpha 7$ ED/DTES and  $\alpha 7$ ED/DTES-6). Additionally, the His6-tag was incorporated on the C-terminus of mutants.

Two systems of  $\alpha 7$ ED production were developed for *E. coli* expression and cell-free synthesis. The protein in both cases was synthesized in the insoluble form. The most probable origins of observed aggregation are incorrect disulfide bond formation and/or tendency of  $\alpha 7$ ED to spontaneous pentamerization in solution.

The conditions for refolding of  $\alpha 7$ ED/DTES and  $\alpha 7$ ED/DTES-6 from precipitate were found. The several approaches (8 M urea, 6 M guanidine hydrochloride and 1% sodium laurylsarcosine, LS) for precipitate solubilization were tried. The best efficiency was obtained for mixture of 4 M urea and 1% LS in the presence of DTT. The refolding of  $\alpha 7$ ED/DTES was carried out on metal-affinity resin by washing with GSH/GSSG in the descending gradient of urea and gradual replacement of 1% LS by 0.1% dodecylphosphocholine (DPC). The analysis of  $\alpha 7$ ED/DTES in DPC by size-exclusion chromatography showed, that  $\alpha 7$ ED/DTES in DPC represents homogeneous (>90%) sample with diameter of the particles about 7 nm, that probably corresponds to size of  $\alpha 7$ ED monomer (5 nm) associated with DPC micelle (4 nm). Analysis of secondary structure of  $\alpha 7$ ED/DTES by means of CD spectroscopy revealed prevalence of  $\beta$ -structure. The ability of  $\alpha 7$ ED/DTES in DPC to interact with nAChR antagonists was studied by means of NMR spectroscopy using  $^{15}\text{N}$ -labeled long-chain neurotoxin NPII/I. The analysis revealed that one molecule of domain binds two molecules of toxin with dissociation constant ~2 мкМ and large cooperativity (Hill coefficient ~1.8).

For  $\alpha 7$ ED/DTES-6 other protocol of renaturation was developed. The protein precipitate was solubilized in 8 M urea in the presence of DTT. The urea was removed gradually by dialysis against the mixture of GSH/GSSG. Analysis by size-exclusion chromatography revealed that  $\alpha 7$ ED/DTES-6 has preferable (>90%) pentameric organization. Biological activity of  $\alpha 7$ ED/DTES-6 was examined in binding experiments with  $^{125}\text{I}$ -labeled  $\alpha$ -bungarotoxin. Determined  $\text{IC}_{50}$  value (~10 нМ) proves proper folding of the protein.

The both variants of  $\alpha 7$ ED were expressed in *E. coli* and cell-free system. In the first case the final yield of refolded water-soluble protein was about 80 мг/л of bacterial culture, in the second case – 1 мг/мл of translation mix.

## РОЛЬ 5S рРНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ L5 И L25 В СБОРКЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РИБОСОМЫ *IN VIVO*

Корепанов А.П., Коробейникова А.В., Баженова М.В., Шестаков С.А., Бубуненко М.Г.\*, Гарбер М.Б., Гонгадзе Г.М.

Институт белка РАН, Пушкино, Россия

\*Национальный институт рака, Фредерик, США

E-mail: kav-20@gambler.ru

Факс: (495) 632-78-71; тел.: (4967) 73-27-70

В *Escherichia coli* специфический комплекс 5S рРНК с рибосомными белками L5, L18 и L25 формирует большую часть центрального протуберанца 50S рибосомной субчастицы. Известно, что центральный протуберанец участвует в ассоциации рибосомных субчастиц, а у его основания расположены пептидилтрансферазный центр и тРНК-связывающие сайты рибосомы. В экспериментах *in vitro* было показано, что в отсутствие 5S рРНК-белкового комплекса собирается функционально неактивная рибосомная субчастица. До сих пор, однако, нет прямых данных о функции 5S рРНК-белкового комплекса в рибосоме. Три года назад, используя современные методы молекулярной генетики, мы начали исследование роли 5S рРНК-связывающих рибосомных белков L5, L18 и L25 в формировании функционально активной рибосомы в клетках *E. coli*. Показано, что белки L5 и L18 строго необходимы для выживания бактериальной клетки, тогда как при нокауте гена белка L25 клетки *E. coli* выживают, но растут медленнее, чем клетки исходного штамма, а L25-дефицитные рибосомы отличаются сниженной эффективностью в синтезе природных полипептидов *in vivo* и *in vitro* (Корепанов *et al.*, 2007).

В настоящей работе указанные исследования были продолжены. Показано, что препараты L25-дефицитных рибосом содержат до 30-40% 50S рибосомных субчастиц, которые не способны ассоциировать с 30S субчастицами. Изменения, произошедшие в структуре этих рибосом, были исследованы методом химического пробинга РНК. В 50S субчастицах, находящихся в составе L25-дефицитных 70S рибосом, изменилась доступность модифицирующим агентам нуклеотидов спиралей 38, 39, 41, 42 и 89 23S рРНК и петли E 5S рРНК. В выделенных 50S субчастицах, не способных ассоциировать с 30S субчастицами, изменения в указанных областях оказались еще более выражены, а также появились изменения в спиралах 37, 80, 81, 86 и 88. Более того, в этих рибосомных субчастицах отсутствовал белок L16. Именно участки 23S рРНК, изменившие доступность модификантам в L25-дефицитных 50S рибосомных субчастицах, в рибосоме формируют межмолекулярные контакты с 5S рРНК-белковым комплексом и белком L16. Наши данные говорят о том, что белок L25 необходим для стабилизации структурно-функционального узла, состоящего из 5S рРНК-белкового комплекса, белка L16 и отмеченных выше участков 23S рРНК.

Был создан также штамм *E. coli* с делецией хромосомного гена жизненно-важного 5S рРНК-связывающего белка L5. Жизнедеятельность штамма поддерживалась за счет регулируемой экспрессии гена белка L5 *in*

*trans*. Большие рибосомные субчастицы этого штамма, собирающиеся *in vivo* в отсутствие белка L5, имеют коэффициент седиментации 47S и не способны ассоциировать с 30S субчастицами *in vitro*. Полученные 47S субчастицы лишены белка L5, а также содержат только следовые количества 5S рРНК и белков L18, L25, L16 и L27. Таким образом, можно заключить, что одной из функций белка L5 является стабилизация взаимодействия 5S рРНК-белкового комплекса в составе большой рибосомной субчастицы. Кроме того, мы внесли ряд мутаций в участок белка L5, предположительно контактирующий с тРНК в Р-сайте рибосомы. Полученные результаты указывают на то, что такие изменения в рибосоме могут снижать точность трансляции *in vivo*.

Работа поддержана: грантами РФФИ № 08-04-00459-а и № 09-04-01747-а, Программами Президента РФ по поддержке Ведущих научных школ (НШ-751.2008.4) и "Молекулярная и клеточная биология" Российской академии наук. Работа М.Б. Гарбер поддерживалась грантом Медицинского института Говарда Хьюза (ННИ 55005609).

## ROLE OF 5S rRNA-BINDING PROTEINS L5 AND L25 IN THE BACTERIAL RIBOSOME ASSEMBLY *IN VIVO*

Korepanov A.P., Korobeinikova A.V., Bazhenova M.V., Shestakov S.A., Bubunenko M.G. \*, Garber M.B., Gongadze G.M.

Institute of Protein Research RAS, Pushchino, Russia

\*National Cancer Institute, Frederick, USA

E-mail: kav-20@rambler.ru

Fax: (495) 632-78-71; tel.: (4967) 73-27-70

In *Escherichia coli* a specific complex of 5S rRNA with ribosomal proteins L5, L18, and L25 forms majority of the central protuberance of the 50S ribosomal subunit. It is known that the central protuberance participates in association of ribosomal subunits and the peptidyl transferase center and tRNA-binding sites are located at the protuberance base. It was shown by *in vitro* experiments that in the absence of 5S rRNA-protein complex an inactive large ribosomal subunit assembled. However, there is no direct evidence about the function of 5S rRNA-protein complex in the ribosome so far. Three years ago, using modern molecular genetics methods we have started studying the role of the 5S rRNA-binding proteins L5, L18, and L25 in formation of functional ribosome in *E. coli* cells. It has been shown that L5 and L18 proteins are essential for bacterial cell viability, whereas *E. coli* cells with knockout of L25 protein gene are viable but grow slower than the parental strain. L25-defective ribosomes demonstrate decreased efficiency in the synthesis of natural polypeptides *in vivo* and *in vitro* (Korepanov et al., 2007).

In this work above mentioned studies have been continued. It has been shown that the preparations of L25-defective ribosomes contain about 30-40% of 50S ribosomal subunits which are unable to associate with 30S ones. The changes occurred in the structure of these ribosomes have been investigated by the chemical probing of RNA method. It was shown that in the 50S subunits of L25-defective 70S ribosomes the accessibility of nucleotides for modification reagents was changed in helices 38, 39, 41, 42, and 89 of 23S rRNA and E loop of 5S rRNA. In the isolated 50S subunits that are unable to associate with 30S ones the alterations in the indicated regions were much stronger and the changes in helices 37, 80, 81, 86, and 88 of 23S rRNA arised. Furthermore, these 50S subunits have lost the protein L16. The regions of 23S rRNA changing the accessibility for modification reagents in the L25-defective 50S subunits form in the ribosome intermolecular contacts with 5S rRNA-protein complex and L16 protein. Thus, our data indicate that L25 protein is essential for stabilization of the structural-functional unit comprising of 5S rRNA-protein complex, L16 protein, and the indicated above regions of 23S rRNA.

We have also created *E. coli* strain with deletion of chromosomal gene of vital 5S rRNA-binding protein L5. The viability of the strain is provided by the regulated expression of L5 protein gene *in trans*. The large ribosome subunits from this strain, which assemble in the absence of L5 protein *in vivo* have sedimentation coefficient of 47S and are unable to associate with 30S subunits *in vitro*. The 47S subunits are lost the L5 protein and contain only trace amounts of 5S rRNA and L18, L25, L16, and L27 proteins. Thus, we conclude that one of

the L5 protein functions is to stabilize interactions of 5S rRNA-protein complex within the large ribosomal subunit. Moreover, we introduced a number of mutations in the region of L5 protein probably contacting with tRNA at the P-site of the ribosome. The results obtained indicate that such changes in the ribosome can reduce the accuracy of translation *in vivo*.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grants N 08-04-00459-a and N 09-04-01747-a), the Program for support of Outstanding Scientific Schools (SSh-751.2008.4) and the Program for Molecular and Cellular Biology RAS. The research of M.B. Garber was supported by International Research Scholar's award from the Howard Hughes Medical Institute (HHMI 55005609).



**ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ S6, S11, S18 И S21 В БИОГЕНЕЗЕ РИБОСОМ *ESCHERICHIA COLI* И ТРАНСЛЯЦИИ**

**Корепанов А.П., Бубуненко М.Г.\*, Коробейникова А.В., Шпрингер М.\*\*,  
Гарбер М.Б.**

Институт белка РАН, Пушкино, Россия

\*Национальный Институт рака, Фредерик, США

\*\*Институт физико-химической биологии, Париж, Франция

E-mail: kav-20@gambler.ru

Факс: (495) 632-78-71; тел.: (4967) 73-27-70

Сборка рибосомных субчастиц из изолированных рРНК и рибосомных белков является ступенчатым кооперативным процессом, который достаточно подробно изучен в системе *in vitro*. На первом этапе с рРНК связывается определенный набор белков (так называемых "первично-связывающихся"). Связывание этих белков необходимо для встраивания в рибосому набора "вторично-связывающихся" белков и так далее.

Наши исследования направлены на изучение роли белков платформы малой рибосомной субчастицы *E. coli* в формировании и работе рибосомы. Согласно классической схеме, на первом этапе сборки платформы *in vitro* с изолированной 16S рРНК связывается рибосомный белок S15. Связывание белка S15 необходимо для присоединения пары белков, S6 и S18, которые также стимулируют встраивание друг друга в рибосому. Образовавшийся комплекс способен связывать белок S11, который нужен для встраивания белка S21. Ранее мы показали, что, несмотря на ключевую роль, которую играет белок S15 в сборке платформы 30S субчастицы *in vitro*, этот белок не является необходимым для выживания клеток и сборки рибосомы. В представленной работе мы осуществили нокаут генов рибосомных белков платформы S6, S11, S18 и S21.

Наши данные свидетельствуют о том, что только белок S6 не критичен для выживания *E. coli*, тогда как нокаут генов остальных белков летален для клеток. Рибосомы, собранные в клетке в отсутствие белка S6, имеют полный набор белков, включая белок S18. Понижение температуры культивации S6-дефицитного штамма до 25°C приводит к остановке роста, что сопровождается накоплением в клетках дефектных малых рибосомных субчастиц, неспособных ассоциировать с 50S рибосомными субчастицами. На основании этого мы считаем, что белок S6 может выполнять структурную функцию при сборке платформы 30S субчастицы.

Согласно последним данным о пространственной структуре рибосом и функциональных рибосомных комплексов, на первых этапах инициации белкового синтеза мРНК, имеющие протяженную структурированную 5'-нетранслируемую область (5'-НТО), связываются с платформой малой рибосомной субчастицы в районе E-сайта и взаимодействуют с несколькими рибосомными белками. В частности, считается, что мРНК взаимодействует с определенными участками белков S11 и S18. Таким образом, эти белки могут быть важными для инициации трансляции природных мРНК, имеющих

структурированную 5'-НТО. Нами созданы штаммы *E. coli*, которые имеют в хромосомном *lac* локусе "слитный" ген, состоящий из репортерного гена *lacZ* и 5'-НТО одной из нескольких модельных мРНК. Были получены плазмиды, несущие гены белков S11 и S18 дикого типа или с мутациями в интересующих нас районах. Мы планируем осуществить нокаут хромосомных генов белков S11 и S18 в условиях экспрессии *in trans* клонированных генов. Таким образом, по уровню экспрессии бета-галактозидазы мы сможем оценить влияние внесенных нами замен на трансляцию тех или иных мРНК и выявить функциональную роль белков S11 и S18.

Работа поддержана грантами РФФИ № 07-04-92172-НЦНИ\_а, Программами Президента РФ по поддержке Ведущих научных школ и "Молекулярная и клеточная биология" Российской академии наук. Работа М.Б. Гарбер поддерживалась грантом Медицинского института Говарда Хьюза (ННМИ 55005609).

**STUDYING THE ROLE OF THE RIBOSOMAL PROTEINS S6, S11, S18 AND S21 IN THE RIBOSOME BIOGENESIS AND TRANSLATION IN *ESCHERICHIA COLI***

**Korepanov A.P., Bubunenko M.G. \*, Korobeinikova A.V., Springer M. \*\*, Garber M.B.**

Institute of Protein Research RAS, Pushchino, Russia

\*National Cancer Institute, Frederick, USA

\*\*Institut de Biologie Physico-chimique, Paris, France

E-mail: kav-20@rambler.ru

Fax: (495) 632-78-71; tel.: (4967) 73-27-70

Assembly of ribosomal subunits from isolated rRNAs and ribosomal proteins is a stepwise cooperative process that has been studied thoroughly *in vitro*. At the first step, a certain set of proteins (the so-called "primary-binding") binds to RNA. Binding of these proteins is required for incorporation of a set of the "secondary-binding" proteins into the ribosome, and so on.

Our investigation is focused on studying the role of proteins of the platform of the small ribosomal subunit in the ribosome biogenesis and functioning. According to a conventional map (from *in vitro* experiments), ribosomal protein S15 binds to the 16S rRNA at the first step of the platform assembly. Binding of S15 is required for attaching of a couple of proteins, S6 and S18, which also stimulate incorporation of each other into the ribosome. Such a complex is able to bind S11 protein that is required for incorporation of S21 protein. As we have shown earlier, S15 protein is not essential for cell survival and the ribosome assembly *in vivo*, in spite of its pivotal role in the platform assembly *in vitro*. In the present work, we have performed a knockout of genes encoding ribosomal proteins of the platform: S6, S11, S18 and S21.

Our data suggest that only S6 protein is not essential for *E. coli* survival, but knockout of the genes of the rest of the studied proteins is lethal. Ribosomes assembled in the cells in the absence of S6 protein consist of all the proteins, including S18. Decrease in cultivation temperature of the S6-deficient strain to 25°C stops the cell growth. This is accompanied by accumulation of defective small ribosomal subunits, which are unable to associate with 50S ribosomal subunits. On these grounds we suggest that S6 may play a structural function during the 30S subunit platform assembly.

According to recent data regarding the spatial structure of the ribosome and functional ribosomal complexes, mRNAs possessing extensive and structured 5'-untranslated region (5'-UTR) bind to the platform of the small ribosomal subunit at the E-site region and interact with several ribosomal proteins during the first step of translation initiation. In particular, it is believed that mRNA interacts with certain regions of proteins S11 and S18. Thus, these proteins may be important for translation initiation of natural mRNAs possessing structured 5'-UTR. We have constructed *E. coli* strains that have translation fusions, comprising *lacZ* reporter gene and a 5'-UTR of one of the model mRNAs in the chromosomal *lac* locus. Plasmids, bearing genes for S11 and S18 proteins of the wild type or having mutations in the regions under study have been obtained. We plan to perform a

knockout of chromosomal genes for S11 and S18 proteins at the condition of in trans expression of the corresponding cloned genes. Thus, by looking at the beta-galactosidase expression we will be able to see influence of the mutations on translation of different mRNAs and to reveal functional role of S11 and S18.

The research was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant N 07-04-92172-CNRS a), the Program of RAS on Molecular and Cellular Biology and the Program of the RF President on support of outstanding scientific schools. The research of M.B.Garber was supported, in part, by an International Research Scholar's award from the Howard Hughes Medical Institute.

## ХЛОРИД РТУТИ ВЫЗЫВАЕТ АУТОИММУННЫЙ ПРОЦЕСС У АУТБРЕДНЫХ МЫШЕЙ

*Красильщикова М.С., Камаева А.Г., Зацепина О.В.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: msk@ibch.ru  
Факс/тел.: (495) 727-38-61

Системные аутоиммунные заболевания, такие как красная волчанка (СКВ), ревматоидный артрит, склеродермия, рассеянный склероз, поражают около 1.5% населения развитых стран. Этиология аутоиммунных болезней неизвестна, однако к факторам, индуцирующим их возникновение, относят генетическую предрасположенность и неблагоприятные воздействия окружающей среды. Известно, что образование антител к белку ядрышка фибрилларину у больных системной склеродермией ассоциировано с наличием определенных аллелей генотипа *HLA-DQB1*. Исследования, проведенные на инбредных, т.е. генетически однородных, линиях мышей показали, что животные разных линий обладают разной чувствительностью к действию ксенобиотиков, присутствующих в окружающей среде. Так, мыши с разными гаплотипами H-2 значительно отличаются друг от друга по чувствительности к хроническому воздействию сублетальных доз хлорида ртути. Наиболее выраженные признаки системных аутоиммунных заболеваний, сопровождающихся появлением аутоантител к фибрилларину, наблюдались у мышей с гаплотипами H-2s (линии SJL, A.SW, B10.S) и H-2q (линии DBA/1, FVB/N). Однако, влияние экзогенных факторов на популяцию в целом проще оценивать на аутбредных, т.е. нелинейных, животных. Аутбредные мыши гетерозиготны по неопределенному числу генов и, подобно людям, генетически и фенотипически неоднородны.

Цель настоящей работы – исследовать способность мышей двух аутбредных стоксов – CD-1 и CFW – вырабатывать антитела к фибрилларину после регулярных подкожных инъекций стандартных доз  $\text{HgCl}_2$  (1.6 мг/кг). Животные получены из Питомника лабораторных животных Пушино (ФИБХ РАН).

Результаты работы говорят о том, что после 4-х недель инъекций  $\text{HgCl}_2$  у всех мышей обоих аутбредных стоксов появляются аутоантитела к фибрилларину. Эти наблюдения позволяют предположить, что факторы окружающей среды (например, ксенобиотики) могут играть ключевую роль в развитии индуцированного аутоиммунного процесса у людей.

## $\text{HgCl}_2$ INDUCES AUTOIMMUNITY IN OUTBRED MICE

*Krasilshchikova M.S., Kamaeva A.G., Zatsepina O.V.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia  
E-mail: msk@ibch.ru  
Fax/tel.: (495) 727-38-61

System autoimmune diseases, such as lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis, scleroderma, multiple sclerosis, occur in up to 1.5% of the population. Aetiology of autoimmune diseases is unknown, but it has been proposed that genetic factors and environmental risk factors can contribute to their induction. In patients suffering from scleroderma the production of autoantibodies against the nucleolar protein fibrillarin is associated with the *HLA-DQB1* genotype. It is also known that inbred (i.e. genetically homogeneous) mice differ in their susceptibility to environmental xenobiotics. For example, mice with the various H-2 haplotypes significantly differ in susceptibility to regular administrations of sublethal doses of  $\text{HgCl}_2$ . Mice with the H-2s haplotype (strains SJL, A.SW, B10.S) and H-2q (strains DBA/1, FVB/N) are more sensitive than mice of other strains. However, the influence of exogenous factors is, in general, easier to assess by the use of outbred animals. Outbred mice are heterozygous and similar to humans genetically and phenotypically heterogeneous.

This work was aimed to study the ability of two outbred mouse stocks – CD-1 and CFW – to produce anti-fibrillarin autoantibodies after regular injections of the standard doses of  $\text{HgCl}_2$  (1.6 mg/kg). Mice were purchased from the Animal Breeding Stock in Pushchino.

Our results showed that all mice of the both stocks produced anti-fibrillarin autoantibodies after four weeks of  $\text{HgCl}_2$  administration. Our results argue in favour that environmental factors (for example, exposure to xenobiotics) may play a crucial role in induction of autoimmune pathological reactions in humans.

## ПОИСКИ РАЦИОНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАНОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО СЫРЬЯ ПРИ РАЗРАБОТКЕ НОВЫХ ПРОДУКТОВ

*Кричковская Л.В., Момот В.И. \*, Кравченко О.В. \*, МIRONENKO Л.С.*

Национальный технический университет "ХПИ", Харьков, Украина

\*\*НАУ, Институт проблем машиностроения им. А.Н. Подгорного,  
Харьков, Украина

E-mail: krichkovska@kpi.kharkov.ua; fox-phenek@ukr.net

Факс: (8057) 764-67-90; тел.: (8057) 707-64-95

Шунгиты являются не только хорошими сорбентами, но и обеспечивают выделение в воду фуллеренов в комплексе с органическими молекулами и микроэлементами, чем и обуславливаются их полезные свойства [1]. Бактерицидные свойства шунгита способствуют уничтожению бактериальных клеток (кишечной палочки, холерного вибриона), низкомолекулярных примесей, органики, соединений фосфора (ядохимикатов), патогенных сапрофитов, яиц глистов, простейших.

В исследованиях использовали препарат на основе гуминовых веществ, ПЭО 1500 и 400, янтарной кислоты и структурированной фуллереновой воды, приготовленный в определенном соотношении в лабораторных условиях. Проводилось сравнение бактерицидных свойств порошкообразного шунгита размером 40 мкм и 50-70 нм, полученных с использованием криоизмельчения (измерения проводились с использованием прибора HORIBA LA-910). Гуминовые препараты, приготовленные на основе структурированной фуллеренсодержащей воды, испытывали при разведении полученной на шунгитах воды. Биологическую активность препарата исследовали методом взвешивания 7-дневных проростков озимой пшеницы сортов, выращенных в чашках Петри на одинаковой смеси для выращивания. Контрольный образец смеси для выращивания готовили на водопроводной кипяченой воде.

Полученные данные достоверно подтверждают определенное ростстимулирующее влияние исследованных образцов. Семена обоих сортов пшеницы проявили практически одинаковую силу всхожести, которая превышала этот показатель в контроле. Более эффективным оказалось не просто выращивание, а замачивание семян сортов пшеницы в препаратах на основе структурированной воды. Полученные проростки были высеваны в грунт. Анализ урожая показал некоторое увеличение массы колоса чаще за счет увеличения количества зерен в нем. Несколько лучшие, но статистически не достоверные результаты, требующие дальнейших исследований, были получены при выращивании зерен пшеницы при использовании шунгитового порошка размером 50-70 нм.

### *Литература*

1. Далматов В.Ю. Ультрадисперсные алмазы детонационного синтеза. Получение, свойства, применение. - СПб.: СПбГПУ. 2003. 344 с.

## SEARCH OF RATIONAL WAYS IN USING OF NANOTECHNOLOGICAL RAW MATERIAL AT DEVELOPMENT OF NEW PRODUCTS

*Krichkovskaya L.V., Momot V.I. \*, Kravchenko O.V. \*, MIRONENKO L.S.*

National Technical University of "KPI", Kharkov, Ukraine

\*NAU, Podgorniy Institute of Problems of Mechanical Engineering, Kharkov,  
Ukraine

E-mail: krichkovska@kpi.kharkov.ua; fox-phenek@ukr.net

Fax: (8057) 764-67-90; tel.: (8057) 707-64-95

Schungites are not only good sorbent agents, but also provide outflow of fullerenes into water in a complex with organic molecules and microelements, what makes their useful properties. Bactericidal properties of schungite are instrumental in destruction of bacterial cells (collibacillus, comma bacillus), low-molecular admixtures, organics, compounds of phosphorus (pesticides), pathogenic saprophytes, eggs of helminths, protozoa.

In researches we used agent on the basis of humic substances, PEG 1500 and 400, succinic acid and structured fullerene-containing water, prepared in certain proportion in laboratory environment. A comparison of bactericidal properties of powder-like schungite sized 40  $\mu\text{m}$  and 50-70 nm was made. It was got with the use of cryoblending (measurements were made with the use of device HORIBA LA-910). Humic preparations, prepared on the basis of the structured fullerene-containing water, were tested when a procedure of attenuation of schungite-containing water was made. Biological activity of preparation was tested by means of weighting of 7-daily seedlings of winter sorts of wheat, handled in Petri dishes on identical mixture for growing. The control sample of mixture for growing was prepared on the boiled tap water.

Our findings positively confirm certain growthstimulating influence of analysed samples. Seeds of both sorts of wheat showed practically identical force of germination capacity, which surpassed this index in comparison with control sample. More effectively appeared not simply cultivation, but also steeping of seeds of various sorts of wheat in preparations on the basis of the structured water. Harvested seedlings were planted in soil. The analysis of results of the derived harvest detected some increase of mass of ear probably due to increase of amount of grains in it. Rather better, but statistically not reliable results, requiring further researches, were obtained at growing of grains of wheat by the use of schungite powder sized 50-70 nm.

## ТОПОЛОГИЯ ЧЕХОЛЬНЫХ БЕЛКОВ БАКТЕРИОФАГОВ $\phi$ KZ И T4

*Курочкина Л.П., Аксюк А.А. \*, Россмани М.Г. \*, Месянжинов В.В.*

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

E-mail: lpk@ibch.ru

Факс: (495) 336-60-22; тел.: (495) 335-55-88

\*Purdue University, 915 West State Street, West Lafayette, IN 47907-2054, USA

Бактериофаги  $\phi$ KZ *P. aeruginosa* и T4 *E. coli* относятся к семейству *Myoviridae*, для представителей которого характерно наличие специальной органеллы – сократимого хвоста, обеспечивающего высокую инфекционность вирионов. В процессе инфицирования хвост фага подвергается структурной реорганизации, ведущей к необратимому сокращению чехла. При этом жесткий внутренний стержень проникает через клеточную стенку и обеспечивает введение геномной ДНК в клетку хозяина. Сократимые чехлы фагов, своего рода молекулярные "мышцы" вирусов, представляют собой простейшие двигательные системы, состоящие из молекул одного типа. Не исключено, что механизм сокращения чехлов у разных фагов при инфицировании один и тот же, несмотря на отсутствие гомологии в аминокислотной последовательности чехольных белков, вариативность длины хвоста и разных бактериальных хозяев.

Хвост фага  $\phi$ KZ организован подобно хвосту T4, но существенно длиннее: 2000 E против 1200 E. Чехол  $\phi$ KZ формируют 264 субъединицы продукта гена 29 (gp29, 695 а.о., 77 кДа), а чехол T4 – 138 копий gp18 (659 а.о., 73 кДа). Сравнительно недавно нами была определена кристаллическая структура трех четвертей молекулы gp18 методами рентгеноструктурного анализа. Целью настоящей работы явилось установление структуры gp29 фага  $\phi$ KZ и сравнение ее со структурой чехольного белка фага T4.

Подобно gp18 фага T4, рекомбинантный gp29, продуцируемый клетками *E. coli*, формирует поличехлы нерегулярной длины, что затрудняет его кристаллизацию. Поэтому был получен укороченный с C-конца молекулы мутант gp29, утративший способность к самосборке. Ограниченный трипсинолиз этого белка позволил получить стабильный фрагмент с Мм около 35 кДа, который удалось закристаллизовать. Кристаллическая структура протеиназостойчивого фрагмента gp29 определена с разрешением 2.2 E.

Сравнительный анализ пространственных структур фрагментов gp29  $\phi$ KZ и gp18 T4 выявил сходную топологию чехольных белков, что, по-видимому, обусловлено подобием выполняемых ими функций и указывает на общее эволюционное происхождение. Исследование структур чехольных белков двух разных фагов семейства *Myoviridae* выполнено впервые.

Работа поддержана грантом РФФИ № 08-04-01260.

## TOPOLOGY OF BACTERIOPHAGES $\phi$ KZ AND T4 SHEATH PROTEINS

*Kurochkina L.P., Aksyuk A.A. \*, Rossmann M.G. \*, Mesyanzhinov V.V.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: lpk@ibch.ru

Fax: (495) 336-60-22; tel.: (495) 335-55-88

\*Purdue University. 915 West State Street, West Lafayette, IN 47907-2054, USA

Bacteriophages  $\phi$ KZ *P. aeruginosa* and T4 *E. coli* belong to *Myoviridae* family; its representatives are characterized by specialized organelle called a contracted tail, providing high infection efficiency. During infection the phage tail is subjected to the conformational rearrangement resulting in irreversible sheath contraction. The rigid internal tube penetrates through a cellular wall and provides DNA injection into the host cell. Phage contracted sheath, molecular "muscle" of virus, is simple biological mechanical device consisting of one type molecules. Probably, different phages have the same mechanism of the tail sheath contraction despite no apparent sequence homology between the tail proteins, different tail lengths and hosts.

The  $\phi$ KZ tail organization is similar to that of phage T4, but its tail is much longer: 2000 E versus 1200 E. The  $\phi$ KZ sheath is composed of 264 subunits of gp29 (695 a.a., 77 kDa), while T4 sheath is composed of 138 copies of gp18 (659 a.a., 73 kDa). Recently we have solved a crystal structure of about three quarters of gp18 molecule by X-ray methods. The goal of present investigation is determination of  $\phi$ KZ gp29 structure and its comparison with T4 sheath protein structure.

Similarly T4 gp18, recombinant gp29, produced by *E. coli* cells, self-assembles into polysheaths of variable length, which complicates crystallization. Therefore, gp 29 C-truncated mutant that have lost the ability to polymerize was designed. Limited trypsinolysis of this mutant results in a stable fragment (about 35 kDa), which was crystallized. The crystal structure of gp29 protease resistant fragment was solved to 2.2 E resolution. The comparative analysis of spatial structure of  $\phi$ KZ gp29 and T4 gp18 fragments has revealed similar topology of sheath proteins that, apparently, is caused by similar functions and point to a common evolutionary origin.

Comparative studies of sheath protein structures from two different *Myoviridae* phages was carried out for the first time.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (N 08-04-01260).



**ПАРАМЕТРЫ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОГО И БИОЭЛЕМЕНТНОГО СТАТУСОВ ПРЕДСКАЗЫВАЮТ ПОЯВЛЕНИЕ СПОНТАННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПРЕДРАСПОЛОЖЕННЫХ К РАКУ МЫШЕЙ**

*Кучина М.Н., Семушина С.Г., Скальный А.В.\*, Боженко В.К.\*\*, Моисеева Е.В.*

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

\*Институт биоэлементологии, Оренбург, Россия

\*\*РНЦ рентгенорадиологии, Москва, Россия

Проведенный анализ литературных данных позволил выявить наличие вполне определенных изменений макро- и микроэлементного статусов (биоэлементного статуса, БЭС) пациентов с раком молочных желез (РМЖ). Мы считаем их суррогатными маркерами новообразований в молочной железе. Известно, что предопухольевые самки мышей оригинальных линий BLRB и BYRB являются адекватной моделью человеческой популяции предрасположенных к РМЖ индивидуумов. Целью исследования было (1) сравнить гематологические параметры (ГП) и факторы БЭС мышей до и после возникновения РМЖ, (2) выявить из них наиболее информативные, предсказывающие появление РМЖ в течение 2, 4 и 12 месяцев после взятия проб крови и шерсти, и (3) выяснить, адекватно ли использованная модель отражает изменения биоэлементного статуса у человека в связи с возникновением РМЖ.

От 15 самок с РМЖ и 130 самок оригинальных линий BLRB/BYRB в возрасте более 6 месяцев (рожавших и девственных) до обнаружения РМЖ (n=145) были получены образцы крови и шерсти. Измерили индивидуально и проанализировали 18 гематологических параметров крови (ГПК) на гематологическом анализаторе "Advia 60" и 25 микро- и макроэлементов шерсти и фракции форменных элементов крови (ФФЭК) методами атомной эмиссионной и масс-спектрометрии с индуктивно связанной аргоновой плазмой. В течение года раз в неделю всех мышей осматривали с целью обнаружения новых РМЖ. В итоге, у 81 мыши возник РМЖ, 28 мышей погибли без видимого РМЖ, 36 мышей были живы без признаков РМЖ. Для предсказания появления РМЖ у мышей в течение 2, 4 и 12 месяцев после взятия проб использовали дискриминантный анализ в программе Statistica 6.0.

В результате, у самок с РМЖ были выявлены достоверные отличия по уровню 5 элементов шерсти, 5 элементов ФФЭК и 8 ГПК по сравнению с соответствующими значениями у предраковых мышей. Путем проведения дискриминантного анализа были найдены комбинации 3-7 информативных параметров, позволяющие с высокой степенью точности и специфичности прогнозировать появление РМЖ через 2 и 4 (но не 12) месяца после забора образцов.

Таким образом, наличие суррогатных маркеров из числа БЭС параметров шерсти и ФФЭК у предраковых мышей линий BLRB/BYRB, высокая степень соответствия изменений элементного и гематологического статусов предраковых и раковых мышей аналогичным изменениям параметров при образовании РМЖ человека позволяют сделать заключение об адекватности использованной модели. Это открывает новые возможности по предсказанию появления РМЖ у предрасположенных к раку женщин при использовании параметров БЭС волос и крови.

**PARAMETERS OF HEMATOLOGY AND BIOELEMENT STATUSES PREDICT SPONTANEOUS MOUSE MAMMARY CANCER APPEARANCE IN CANCER PRONE MICE**

*Kuchina M.N., Skalny A.V.\*, Bojenko V.K.\*\*, Moiseeva E.V.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

\*Institute of Bioelementology, Orenburg, Russia

\*Russian Scientific Centre of Roentgenoradiology, Moscow, Russia

Analysis of published data permitted to reveal distinct changes in macro- and microelement statuses (bioelement statuses, BES) in breast cancer (BC) patients. These characteristics are considered as surrogate markers of neoplastic growth in mammary gland. Pretumor females of original close related BLRB and BYRB mouse strains with high incidence of spontaneous mammary cancer (sMC) were thoroughly characterized as a proper model of BC prone human population. Our aims were (1) to compare hematology and BES characteristics before and after sMC detection; (2) to disclose parameters that were predictive for sMC manifestation within 2, 4, and 12 months after blood and fur probe collection; (3) to recognize whether our model may properly reflect changes of similar factors in connection with BC appearance in human patients.

Blood and fur probes were collected individually and simultaneously from BLRB and BYRB bred and virgin females of various ages ( $\geq 6$  months) with sMC (n=15) and those before tumor detection (pretumor females, n=130) under ether narcosis. The hematology parameters (HP, n=18) were individually measured and analyzed by "Advia 60", USA. The BES parameters in probes of fur (n=25) and blood corpuscle fraction (BCF, n=25) were analyzed by inductively coupled (argon) plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) and mass spectrometry (ICP-MS). All the mice were observed once a week during 12 months to reveal newly arisen sMC. To the end, 81 sMC were detected, 28 females died without visible sMC, 36 were alive without tumor. Discriminant analysis (DA, Statistica 6.0.) was used to predict sMC appearance manifestation within 2, 4, and 12 months after blood and fur probe collection.

As a result, females with sMC demonstrated significant differences in 5 BES parameters of fur, 5 bioelement parameters of blood corpuscle fraction, and 8 hematology parameters comparing with pretumour females. Combinations of the 3-7 the most informative parameters were found to predict sMC appearance 2 and 4 (but not 12) months after probe collection accurately with high degree of specificity.

Existence of surrogate cancer markers among bioelement status parameters in fur and blood corpuscle fraction of pretumour mice and high degree of accordance in dynamics of those parameters in pretumour and tumour mouse females to similar changes in analogous parameters of BC patients permits a conclusion that mouse model used is adequate imitation of bioelement factor role in humans. Obtained data open new avenues to predict BC appearance in predisposed women by disclosed bioelement parameters in hair and blood.

## ПОИСК ПЕПТИДОМИМЕТИКОВ С ПОМОЩЬЮ КОМБИНАТОРНЫХ ПЕПТИДНЫХ БИБЛИОТЕК В ФОРМАТЕ ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ

*Ламан А.Г.<sup>1</sup>, Шепеляковская А.О.<sup>1</sup>, Бозиев Х.М.<sup>1</sup>, Савинов Г.В.<sup>1,3</sup>, Бровко Ф.А.<sup>1</sup>, Несмеянов В.А.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Филиал Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, Россия

<sup>2</sup>Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup>Филиал МГУ им. М.В. Ломоносова, Пушкино, Россия

E-mail: brovko@fibkh.serpukhov.su

Предложен метод получения пептидомиметиков, обладающих такими же свойствами, как и природные адьюванты, но не имеющих отрицательных побочных эффектов, присутствующих исходным соединениям. В работе использованы высокоспецифичные моноклональные антитела против ГМДП и пептидные комбинаторные библиотеки в формате фагового дисплея для поиска пептидов, обладающих адьювантной активностью ГМДП. С этой целью применяли различные методы иммуноаффинного обогащения библиотек. При элюции фаговых частиц с иммуносорбента 1 мкМ раствором природного лиганда был получен пептид со структурой Arg-Val-Pro-Pro-Arg-Tyr-His-Ala-Lis-Ile-Ser-Pro-Met-Val-Asn (RN). При использовании для элюции буфера с низким значением pH были выделены два пептида: Ser-Gly-Arg-Val-Ala-Val-Ser-Pro-Asp-Ser-Pro-Leu-Phe-Tyr-Pro (SP) и Arg-Tyr-Gly-Gly-Ser-Val-Leu-Asn-Ile-Glu-Cys-Gln-Phe-Tyr-Gly (AG). Константы аффинности для пептидов RN и SP составляли  $3.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  и  $3.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ , соответственно. Специфичность взаимодействия с моноклональными антителами проверяли с помощью конкурентного вытеснения пептидов из комплекса антиген-антитело с помощью природного лиганда (ГМДП). RN-Пептид был синтезирован и его биологическая активность была исследована. Подобно ГМДП, RN-пептид способен усиливать иммунный ответ на овальбумин и увеличивать экспрессию антигенов ГКГС II класса на поверхности перитонеальных макрофагов мышей Balb/c. С другой стороны, он не обладал присущей ГМДП пирогенностью и не был иммуногенен. N-Концевой остаток аргинина играет большую роль в появлении адьювантных свойств, в то время как C-концевой аспарагин может быть удален. Так как и углеводная, и пептидная части ГМДП необходимы для проявления биологической активности, можно предположить, что пептид имитирует пространственную структуру интактной молекулы ГМДП. Дальнейшие исследования RN-пептида показали, что последовательность PRYH играет ключевую роль во взаимодействии с антителами и проявлении биологической активности. Аналоги RN-пептида, укороченные с C-конца, сохраняют биологическую активность и минимальным адьювантным пептидом является RVPPRYH. Анализ адьювантной активности аналогов RN-пептида, укороченных одновременно с N- и C-концов, а также анализ с помощью Ala-scan, показали,

что ключевую роль в проявлении биологической активности играют последовательность PRYH и аминокислотные остатки K9, I10, S11 и M13. Данные по компьютерному моделированию биологически активных пептидов свидетельствуют об их пространственно подобной конформации. Были проанализированы адьювантные свойства пептида при его малых дозах. Выявлено, что он обладает высокой адьювантной активностью в дозах 2-3 нг/животное. Для адьювантной активности в этих дозах характерна колоколообразная зависимость в диапазоне 0,1-10 нг/животное, аналогичная дозам 0,1-100 мкг/мл. RN-Пептид обладает высокой адьювантной активностью в отношении T-зависимых антигенов в дозах 2-3 нг/животное и 1-10 мкг/животное. Было изучено влияние RN-пептида в концентрациях 2 нг/мл и 10 мкг/мл на индукцию синтеза лимфокинов периферическими лимфоцитами крови человека. Показано, что в ответ на обработку RN-пептидом происходит стимуляция синтеза гамма-интерферона, интерлейкина-1 (Ил-1), интерлейкина-4 (Ил-4) и, в меньшей степени, фактора некроза опухоли альфа (ФНО-альфа). Причем, в дозе 2 нг/животное индукция синтеза ФНО-альфа была минимальной и через 48 часов ФНО-альфа не обнаруживался. Для ГМДП была характерна значительная индукция ФНО-альфа, в меньшей степени ИЛ-1, а также выраженная индукция Ил-10. RN-Пептид Ил-10 не индуцировал. Таким образом, спектр индуцируемых RN-пептидом и ГМДП лимфокинов несколько отличается, как отличаются их адьювантные и пирогенные свойства. Описанный нами подход может быть использован для поиска миметиков биологически активных низкомолекулярных соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 08-04-00826а.

## DEVELOPING OF PEPTIDOMIMETICS BY USING COMBINATORIAL PHAGE PEPTIDE LIBRARIES

Laman A.G.<sup>1</sup>, Shepelyakovskaya A.O.<sup>1</sup>, Boziev Kh.M.<sup>1</sup>, Savinov G.V.<sup>1,3</sup>, Brovko F.A.<sup>1</sup>, Nesmeyanov V.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino, Russia

<sup>2</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Branch of Lomonosov Moscow State University, Pushchino, Russia

E-mail: brovko@fibkh.serpukhov.su

We describe the production of an adjuvant with related biological activities as N-acetylglucosaminyl-1-4-N-acetylmuramyl-alanyl-D-isoglutamine (GMDP), a commonly used enhancer of the immune response. In these approach high specific monoclonal antibody against GMDP and phage display combinatorial peptide libraries have been used for finding adjuvant active peptides. With these purpose different methods of immunoaffinity enrichment have been applied. The peptide with only structure Arg-Val-Pro-Arg-Tyr-His-Ala-Lis-Ile-Ser-Pro-Met-Val-Asn (RN-peptide) have been obtained using 1 mM GMDP solution as eluent. Two another peptides Ser-Gly-Arg-Val-Ala-Val-Ser-Pro-Asp-Ser-Pro-Leu-Phe-Tyr-Pro (SP-peptide) и Arg-Tyr-Gly-Gly-Ser-Val-Leu-Asn-Ile-Glu-Cys-Gln-Phe-Tyr-Gly (RG-peptide) have been obtained using buffer solution with low pH value for elution from immunosorbents. The affinity constant for RN and SP peptides consists  $3.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  and  $3.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  correspondently. The specificity of interaction between this peptides and monoclonal antibody was checked by competition with natural ligand (GMDP). RN-Peptide was synthesized, and its biological activity was studied. Like GMDP, RN-peptide was shown to augment the antibody response to ovalbumin in mice and to up-regulate MHC class II antigen expression by Balb/c mice peritoneal macrophages. On the other hand it was non-immunogenic and less pyrogenic than GMDP. N-Terminal arginine residue was of major importance for adjuvant activity of RN-peptide, whereas C-terminal asparagine could be deleted. Because both carbohydrate and peptide moieties of GMDP are known to be crucial for its biological activity evidently the peptide mimics the spatial structure of intact muramy peptide. We studied further the mechanism of action of RN-peptide. Its PRYH sequence mostly contributes to interaction with the antibodies. RN-Peptide analogues truncated C-terminally remained their adjuvant activity whilst the shortest active peptide was RVPPTYH. Adjuvant activity assays of N- and C-terminally truncated RN-peptides together with the Ala-scan showed that the key role in the biological activity belongs to K9, I10, S11 and M13 amino acid residues. These data with computer modeling studies indicate that biologically active peptides could form sterically similar configurations in solution. Adjuvant activity of the peptide in extremely small as little as 1-10 ng/animal has been analyzed. RN-Peptide is turned out have high adjuvant activity in doses about 2-3 ng/animal. Bell-like dependence of adjuvant activity in range 0,1-10 ng/animal analogous to the dependence in range 0,1-100 mkg/animal have been demonstrate. RN-Peptide have high adjuvant activity in the case of T-dependent antigens in doses 2-3 ng/animal and 1-10 ng/animal. The influence of RN-peptide on lymphokine production by peripheral lymphocytes has been examined. It have been shown that treatment of lymphocytes with RN-peptide in concentrations 2 ng/ml and 10 ng/ml stimulate synthesis of gamma-interferon (Inf), IL-4, IL-1 and less TNF-alpha. When the concentration 2 ng/ml was used TNF-alpha was not detected after 48 h incubation. GMDP highly stimulate synthesis of TNF and IL-10 and less IL-1, gamma-Inf. RN-Peptide do not stimulate IL-10 synthesis. Thus the spectrum of lymphokine induced differ for GMDP and RN-peptide and its adjuvant and pyrogenics is different. Described methods can be applied for finding of peptide mimetics of biological active low molecular weight compounds.

The work was supported by RFBI grant N 08-04-00826a.

## МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PINUS SYLVESTRIS* L.)

Лебедев В.Г., Шестибратов К.А.

Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, Россия

E-mail: vglebedev@mail.ru

Тел.: (4967) 33-09-66

Хвойные породы являются одним из наиболее сложных объектов для культивирования *in vitro*. Однако, использование методов культуры ткани необходимо как для быстрого размножения элитных генотипов хвойных, так и для улучшения растений методами генной инженерии. Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) занимает второе место среди основных лесобразующих пород в России. Мы разработали методику клонального размножения сосны обыкновенной из 2-х недельных проростков, включающую индукцию почек, размножение, элонгацию и укоренение побегов.

Для индукции почек использовали цитокинины 6-БАП, кинетин, зеатин, 2iP и ТДЗ в различных концентрациях. Кинетин и 2iP в незначительной степени стимулировали органогенез, тогда как 6-БАП и зеатин в высоких концентрациях способствовали индукции почек. Были определены оптимальные условия пульсовой обработки эксплантов 6-БАП. Из протестированных сред (MS, LP500, SH, WPM, TE и DCR) среды WPM и DCR вызвали витрификацию у большей части эксплантов (50-70%), а на среде TE наблюдался некроз эксплантов. Наилучшие результаты были получены на средах LP500 и SH. Также было изучено влияние на рост растений длины светового дня, интенсивности освещения и нитрата серебра. Добавление активированного угля снижало количество образующихся почек, но способствовало элонгации побегов. В результате комбинации вышеперечисленных факторов нам удалось добиться образования после 2-го пассажа до 7-8 побегов/эксплант, часть из которых могла быть отделена для самостоятельного культивирования. Укоренение побегов было достигнуто на среде 1/2 макро DCR с добавлением НУК. Укорененные растения сосны были успешно адаптированы в теплице. В настоящее время мы ведем работу по разработке технологии клонального микроразмножения сосны обыкновенной с использованием вегетативного материала от взрослых деревьев.

## CLONAL MICROPROPAGATION OF SCOTS PINE (*PINUS SYLVESTRIS* L.)

*Lebedev V.G., Schestibratov K.A.*

Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino, Russia

E-mail: vglebedev@mail.ru

Tel.: (4967) 33-09-66

Conifer clonal forestry as a form of plantation forestry has great potential advantages. However conifers are most recalcitrant objects for cultivation *in vitro*. Scots pine is one of the most widespread forest tree species in Russia. We developed clonal micropropagation protocol for Scots pine from young seedlings including bud induction, shoot multiplication, elongation and rooting. BA, kinetin, zeatin, thidiazuron and 2iP at various concentrations were tested for the induction of adventitious buds. Kinetin and 2iP had little bud-inducing effect compared to BA and zeatin. Optimal conditions for pulse treatment of explants with BA were defined. Basal media used in our study include MS, PM1, SH, WPM, TE, MCM and DCR media. WPM and MS media induced vitrification of most explants. The use of TE medium resulted in explant necrosis. SH and LP500 media gave the best results. Influence of light intensity, photoperiod length and silver nitrate on explants of Scots pine were investigated. Addition of activated charcoal inhibited bud production but promoted shoot elongation. Root initiation were obtained after exposition on NAA-containing 1/2 macro DCR medium. Rooted plantlets were successfully acclimatized in the greenhouse. We are now in the process of developing clonal micropropagation technology for Scots pine using vegetative tissue explants from mature trees.

## ГЕКСАПЕПТИД HLDF-6 – НОВЫЙ ПЕРСПЕКТИВНЫЙ НЕЙРОПРОТЕКТОР

*Липкин В.М., Сурина Е.А., Сторожева З.И.\*, Родионов И.Л.\*\*,  
Мурашев А.Н.\*\*, Богачук А.П., Костянян И.А.*

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

Факс/тел.: (495) 336-61-66

E-mail: vmlipkin@mx.ibch.ru

\*Институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН, Москва, Россия

\*\*Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, Россия

Мы установили, что шестичленный пептид HLDF-6 (биологически активный фрагмент фактора дифференцировки HLDF [1]) обладает широким спектром ноотропной и нейропротективной активностей. Исследования на различных видах животных показали, что у интактных животных в условиях центрального и системного введения HLDF-6 в дозах 3-30 мкг/кг наблюдается улучшение формирования и сохранения долговременной памяти. Получены прямые свидетельства нейропротекторного эффекта HLDF-6 в экспериментах на первичной культуре нейрональных клеток гиппокампа, мозжечка, а также иммунокомпетентных клеток. На экспериментальных моделях клинической патологии – болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, наркоманийной зависимости, ишемического инсульта – показано, что пептид в дозах 1-50 мкг/кг снимает выраженный когнитивный дефицит и способствует восстановлению нарушенной памяти.

Нейропротекторное действие пептида HLDF-6 на нейронах самцов связано с его способностью снижать экспрессию мРНК 5- $\alpha$ -редуктазы, что приводит к блокировке превращения тестостерона в дигидротестостерон и препятствует тем самым гиперактивации NMDA рецепторов нейронов CA1 области гиппокампа. Механизм же нейропротекторного действия пептида на нейронах самок связан с усилением экспрессии белка ABAD (17  $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы 10 типа), который является мишенью действия  $\beta$ -амилоидного пептида, и блокированием метаболизма прогестерона в 5- $\alpha$ -дигидропрогестерон за счет ингибирования экспрессии мРНК гена 5- $\alpha$ -редуктазы.

Нами начаты доклинические испытания пептида HLDF-6. Исследования проводятся на лабораторных животных SPF-статуса в лаборатории биоиспытаний ФИБХ РАН в соответствии с международными нормами GLP и требованиями Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (М. Медицина, 2005). Согласно результатам, полученным при исследовании острой токсичности, пептид HLDF-6 может быть отнесен к наименее токсичному 5-му классу веществ по системе GHS. На пептид HLDF-6 имеется Российский патент № 2213747.

Таким образом, полученные результаты позволяют рассматривать пептид HLDF-6 в качестве перспективного соединения для создания нового ноотропного и нейропротективного лекарственного препарата.

*Литература*

1. Kostanyan I.A., Astapova M.V., Starovoytova E.V., Dranitsyna S.M., Lipkin V.M. A new human leukemia cell 8.2 kDa differentiation factor: Isolation and primary structure. *FEBS Letters*, 1994, **356**: 327-329.



## HLDF-6 HEXAPEPTIDE – A NEW PROMISING NEUROPROTECTOR

*Lipkin V.M., Surina E.A., Storozheva Z.I.\*, Rodionov I.L.\*\*,  
Murashov A.N.\*\*, Bogachuk A.P., Kostanyan I.A.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: vmlipkin@mx.ibch.ru

\*Anokhin Institute of Normal Physiology RAMS, Moscow, Russia

\*\*Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino, Russia

We established that HLDF-6 hexapeptide, biologically active fragment of Human Leukemia Differentiation Factor (HLDF) [1], possesses nootropic and neuroprotective activities. Investigations on different animals have shown that in intact animals, under the conditions of central and system administration of HLDF-6 in the doses 3-30 mg/kg, improvement is observed of long-term memory formation and maintenance. The direct evidences have been obtained of neuroprotective effect of HLDF-6 on the primary culture of neuronal cells of hippocampus, cerebellum and immunocompetent cells.

On the experimental models of clinical pathology – Alzheimer's disease, Parkinson disease, drug abuse, and ischemic stroke – the peptide in the doses 1-50 mg/kg was shown to withdraw the pronounced cognitive deficit and to promote the recovery of disturbed memory.

Protective action of HLDF-6 peptide on rat-male neurons is connected with its ability to reduce 5-alpha reductase mRNA expression, blocking testosterone metabolism into dihydrotestosterone (DHT) and thus interfering hyperactivation of NMDA receptors in CA1 areas of hippocampus. The mechanism of protective action of peptide on rat-female is connected with ABAD (17 beta-hydroxysteroiddehydrogenase of the 10th type) mRNA expression enhancement which is a target of beta-amyloid peptide action and blocking of progesterone conversion into 5 alpha-dihydroprogesterone due to 5-alpha-reductase mRNA expression inhibition.

We have begun the pre-clinical trials of HLDF-6 peptide. The investigations are performed on laboratory SPF-animals in the biological testing department of BIBCh RAS in compliance with international GLP rules and the requirements of the Guide on experimental (pre-clinical) study of new pharmacological substances. (M., Medicine, 2005). According to the results obtained during acute toxicity study, the HLDF-6 peptide might be referred to the least toxic 5<sup>th</sup> class of substances in GHS system. For the HLDF-6 peptide we have a Russian patent № 2213747.

Thus, the results obtained permit to regard the HLDF-6 peptide as a perspective compound for creation a novel nootropic and neuroprotective remedy.

### Reference

1. Kostanyan I.A., Astapova M.V., Starovoytova E.V., Dranitsyna S.M., Lipkin V.M. A new human leukemia cell 8.2 kDa differentiation factor: Isolation and primary structure. *FEBS Letters*, 1994, **356**: 327-329.

## ОЧИСТКА КОНЦЕНТРИРОВАННЫХ СТОЧНЫХ ВОД КОММЕРЧЕСКИМИ МИКРОБНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ В СОЧЕТАНИИ С АНАЭРОБНЫМИ МИКРОБНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ

*Литты Ю.В., Некрасова В.К., Ножневникова А.Н.*

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва, Россия

E-mail: litty-yuriy@mail.ru

Факс: (499) 135-65-30; тел.: (499) 135-04-20

Для глубокой локальной очистки бытовых и промышленных сточных вод на современном рынке предлагается большое количество микробных препаратов, для которых анонсируется, что они пригодны для очистки в аэробных и анаэробных условиях. Проверка шести коммерческих препаратов с использованием модельного субстрата, имитирующего концентрированные бытовые сточные воды, показала, что все они активны в аэробных условиях. Однако, ни один из испытанных препаратов не оказался пригоден для анаэробной обработки концентрированных сточных вод и их осадков. При культивировании в анаэробных условиях наблюдалось образование значительных количеств летучих жирных кислот (ЛЖК), но не метана – конечного продукта анаэробной деградации органических веществ. Это свидетельствует об отсутствии метаногенного микробного сообщества в коммерческих препаратах. Исследовали анаэробное разложение модельного субстрата коммерческими препаратами в комбинации с выбранными метаногенными микробными сообществами при их одновременном и последовательном использовании. При одновременном использовании коммерческих препаратов и активных анаэробных илов кислотообразующие бактерии образовывали ЛЖК с более высокой скоростью, чем синтрофные бактерии, и метаногенные археи были способны разлагать их с образованием метана. Показана возможность двухступенчатой анаэробной обработки концентрированных стоков с образованием на первой ступени ЛЖК и последующей обработкой жидкой фракции метаногенным активным илом. Перспективной является иммобилизация анаэробного активного ила на твердом носителе.



**TREATMENT OF CONCENTRATED SEWAGES BY MEANS OF COMMERCIAL MICROBIAL CONSORTIUMS IN AGGREGATE WITH ANAEROBIC MICROBIAL CONSOCIETUMS EXPLOITING**

*Litty Y.V., Nekrasova V.K., Nozhevnikova A.N.*

Vinogradskiy Institute of Microbiology RAS, Moscow, Russia

E-mail: litty-yuriy@mail.ru

Fax: (499) 135-65-30; tel.: (499) 135-04-20

Today's market offers a great deal of commercial microbial consortiums for treating of domestic and industrial sewages with high purification efficiency. It is declared that the product is capable of treatment both in aerobic and anaerobic condition. Six above-mentioned consortiums were cultivated in media with dummy substrate, similar to concentrated domestic sewage. It was shown in the experiment that they were active in aerobic condition. Still, neither of tested consortiums were capable of degrading of concentrated sewage and its sludge in anaerobic condition. A great amount of volatile fatty acids was produced when cultivating in anaerobic condition. But methane, being a terminal product of organic matter degradation in anaerobic condition, was not discovered. The fact indicates of methanogenic microbial consocietum's absence in tested commercial products. Subsequently, the experiment of dummy substrate degrading by commercial microbial consortiums in combination with selected methanogenic microbial consocietums was carried out, the formers and latters being used simultaneously and in consecutive order. The simultaneous using of both commercial microbial consortium and activated anaerobic sludge exhibited the production of volatile fatty acids by acetogenic bacteria with rates higher, than those of syntrophic bacteria and methanogenic archaeobacteria's ability to degrade volatile fatty acids with production of methane. It was shown the possibility of anaerobic treatment of concentrated sewages via organic matter degrading up to volatile fatty acids at the first step, followed by the liquid fraction treatment with methanogenic activated sludge at the second. The anaerobic activated sludge immobilization on solid binder is considered to be highly perspective.

The aim of the work was to investigate an anaerobic degradation of dummy substrate, similar to concentrated domestic sewage, by means of commercial microbial consortiums in combination with anaerobic microbial consocietums exploiting in simultaneous and consecutive order.

**ОБРАТИМО ФОТОКОНВЕРТИРУЕМЫЙ МОНОМЕРНЫЙ КРАСНЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК**

*Лицзюань Чжэан, Гурская Н.Г., Копанцева Е.Е., Лукьянов К.А.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: weili54@gmail.com

Ранее в нашей лаборатории был получен обратимо фотоконвертируемый флуоресцентный белок, названный KFP (Kindling Fluorescent protein - "разгорающийся" флуоресцентный белок). Основным недостатком KFP является его тетрамерная природа, что затрудняет использование KFP для мечения целевых белков.

Нами был проведен направленный мутагенез мономерного красного флуоресцентного белка TagRFP и его вариантов с целью получения обратимо фотоконвертируемых белков. Показано, что аминокислотные остатки в позициях 69, 148, 165, 179 и 181 (нумерация согласно зеленому флуоресцентному белку GFP) играют определяющую роль в проявлении свойств фотоконвертируемости. Получен фотоконвертируемый белок KFP-НС, обладающий флуоресценцией в красной области спектра, с максимумами возбуждения и эмиссии при 585 и 615 нм, соответственно. Показано, что интенсивность флуоресценции KFP-НС падает в 5-10 раз (за счет уменьшения квантового выхода флуоресценции) под воздействием зеленого света (530-560 нм) и затем возвращается к исходному уровню при облучении синим светом (450-490 нм) или после инкубации в темноте (время полувосстановления 30 мин). KFP-НС может стать удобным инструментом для изучения динамики белков в живой клетке, а также для флуоресцентной микроскопии ультравысокого разрешения.

## REVERSIBLY PHOTOCONVERTIBLE MONOMERIC RED FLUORESCENT PROTEIN

*Lijuan Zhang, Gurskaya N.G., Kopanceva E.E., Lukyanov K.A.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: weili54@gmail.com

Earlier, a reversibly photoconvertible fluorescent protein called KFP (Kindling Fluorescent Protein) has been developed in our laboratory. The main disadvantage of KFP is a tetrameric state, which impedes its use for labeling of target proteins.

A site-directed mutagenesis of monomeric red fluorescent protein TagRFP and its variants aimed at generation of reversibly photoswitchable fluorescent proteins was performed. It was found that amino acids at positions 69, 148, 165, 179 and 181 (numbering according to GFP) play a key role in ability to the photoconversion. A photoswitchable red fluorescent protein KFP-NC with excitation and emission maxima at 585 and 615 nm, respectively, was generated. Under green light (530-560 nm) irradiation KFP-NC fluorescent intensity decreases 5-10 fold (due to fluorescence quantum yield decrease). Then, it restores by irradiation with blue light (450-490 nm) or after incubation in the dark (half-time of 30 min). KFP-NC can represent a useful tool for studies of protein dynamics in living cells, as well as for fluorescence microscopy of ultra-high resolution.

## БЕЛОК В23/НУКЛЕОФОЗМИН КАК ОПУХОЛЕВЫЙ МАРКЕР

*Лобанова Н.В., Потапенко Н.А., Вольпина О.М., Владимирова Н.М.*

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

E-mail: vla.ibch@mail.ru

Факс: (495) 335-71-03; тел.: (495) 330-66-47

В последнее время учеными разных стран проводятся исследования по выяснению роли ядрышковых белков в апоптозе и канцерогенезе, при этом особое внимание уделяется белку В23. Нуклеофозмин, экспрессирующийся в виде двух изоформ В23.1 и В23.2, является полифункциональным белком, включенным в широкий спектр процессов, контролирующих биогенез рибосом, трансформацию и пролиферацию клеток, стабильность генома и канцерогенез, регуляцию онкосупрессоров p53 и Arf. При раке простаты, кишечника, яичников, желудка, молочной железы, мочевого пузыря, где нуклеофозмин сверхэкспрессируется, он был предложен в качестве онкомаркера. Новые литературные данные свидетельствуют о том, что малигнизация клеток сопровождается не только сверхэкспрессией нуклеофозмина, но и появлением его новых структурных форм. При злокачественных заболеваниях крови детектированы мутантные и смешанные формы нуклеофозмина. У больных гепатоклеточной карциномой выявлена форма нуклеофозмина, не содержащаяся в нормальной и циррозной печени, имеющая укороченную N-концевую аминокислотную последовательность, образующая гексамеры, необычно устойчивые к обработке SDS. Анализ структурного состояния нуклеофозмина в опухолевых клетках человека: HeLa (каринома шейки матки), Hep G2 (гепатоклеточная карцинома), NGP (нейробластома), Jurkat (острая Т-клеточная лейкемия), K-562 (хроническая миелоидная лейкемия) и Ramos (лимфома Беркитта) позволил нам впервые обнаружить наличие аналогичных SDS-устойчивых олигомеров и показать, что их образование является общим признаком опухолей человека и может служить маркером канцерогенеза. Мы разработали метод для дифференциального детектирования мономеров и олигомеров белка В23. Для этой цели получены антитела к синтетическим пептидам, соответствующим N-концевой (олигомеризационный домен) и C-концевой областям (В23.1-специфичный домен) белка В23. Показано, что в различных опухолевых клетках (HeLa, Hep G2, K-562, Ramos) антитела к N-концевой области выявляют локализованные в нуклеоплазме и цитоплазме мономеры нуклеофозмина, а антитела к C-концевой области – локализованные в ядрышке опухолеспецифические олигомеры белка. Полученные антитела могут использоваться в диагностике и мониторинге лечения опухолевых заболеваний.

Работа выполнена при поддержке грантов Программы "Фундаментальные науки – медицине, 2009" и РФФИ (№ 09-04-00713).

## PROTEIN B23/NUCLEOPHOSMIN AS A TUMOR MARKER

*Lobanova N.V., Potapenko N.A., Volpina O.M., Vladimirova N.M.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: vla.ibch@mail.ru

Fax: (495) 335-71-03; tel.: (495) 330-66-47

During last years scientists from different laboratories have been studying the role of nucleolar proteins in carcinogenesis and apoptosis, paying special attention to nucleophosmin. Nucleophosmin, expressed in two isoforms (B23.1 and B23.2), plays multiple role in ribosome biogenesis, cell proliferation, centrosome duplication, molecular chaperoning, regulation of oncosuppressors p53 and Arf. Overexpression or downregulation of B23 alters the cellular status with respect to proliferation, differentiation and apoptosis. For prostate, colon, ovarian, gastric, breast, bladder cancer where nucleophosmin overexpressed, it was proposed as tumor marker. According to new data cell malignization is accompanied not only by nucleophosmin overexpression (more than 20 fold), but also its new structural forms appearance. In haematopoietic malignancies different mutated and fused B23 forms were detected. In hepatocellular carcinoma patients N-terminus truncated protein B23 forming unusually SDS-stable oligomers was found. We showed at first time the existence of SDS-stable B23 oligomers in different human tumor cells: HeLa (cervical carcinoma), Hep G2 (hepatocellular carcinoma), NGP (neuroblastoma), Jurkat (acute T-cell leukemia), K-562 (chronic myeloid leukemia), Ramos (Burkitt's lymphoma) by immunoblotting using monoclonal anti-B23 antibodies. So, we demonstrated that SDS-stable B23 oligomers can be common feature of human tumor cells and serve as a tumor marker. Differential detecting of B23 monomers and oligomers was next stage of our investigation. For this purpose antibodies to fragments from N-terminus (oligomerization domain) and C-terminus (specific B23.1 domain) were obtained using synthetic peptides. It was shown that in different tumor cells (HeLa, Hep G2, K-562, Ramos) antibodies to N-terminal region detected only localized in nucleoplasm and cytoplasm B23 monomers, antibodies to C-terminal region – localized in nucleolus tumor-specific oligomers. The obtained antibodies could be used for tumor diagnostics and therapy monitoring.

The work was supported by Program “the Basic Sciences to Medicine” Foundation project, 2009 and the Russian Foundation for Basic Research (project № 09-04-00713).

## ЗЕЛЕННЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ – СВЕТОИНДУЦИРУЕМЫЕ ДОНОРЫ ЭЛЕКТРОНОВ

*Дукьянов К.А., Богданов А.М.*

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

E-mail: kluk@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 данной работе мы показали, что зеленые флуоресцентные белки из разных таксономических групп могут выступать в качестве светоиндуцируемых доноров электронов в фотохимических реакциях с различными окислителями (акцепторами электронов), такими как бензохинон, флавины и флавопротеины, цитохром c и другие. В ходе этих реакций происходит фотоконверсия зеленых флуоресцентных белков в форму с эмиссией в красной области спектра, четко детектируемую 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.

## GREEN FLUORESCENT PROTEINS ACT AS A LIGHT-INDUCED ELECTRON DONORS

*Lukyanov K.A., Bogdanov A.M.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: kluk@ibch.ru

Green fluorescent protein (GFP) from jellyfish *Aequorea victoria* is widely used in modern cell biology and biomedical studies as a genetically encoded fluorescent label. In this work we discovered a new feature of GFPs from diverse taxons can act as the light-induced electron donors in photochemical reactions with various electron acceptors such as benzoquinone, flavins and flavoproteins, cytochrome *c* and others. As a result of these reactions GFPs convert into red fluorescent state which is clearly detectable by fluorescence spectroscopy and microscopy. Moreover, this photoconversion can be observed in living cells without additional treatment, probably due to interactions of GFPs with intracellular redox-active molecules. This finding changes our general view of GFPs: they represent not only passive light absorbers/emitters but also can play an active role in light-induced electron transfer. This provides new insights into evolution and biology of this protein family as well as suggests new areas of practical applications of fluorescent proteins in molecular and cell biology.

## ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА СОДЕРЖАНИЯ ХОЛЕРНОГО И ДИФТЕРИЙНОГО ТОКСИНОВ

*Любавина И.А., Петрова Е.Э., Валякина Т.И.*

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

E-mail: valyakina@ibch.ru

Тел.: (495) 335-35-33

Заболевания, вызываемые бактериальными токсинами, представляют угрозу для здоровья людей. К их числу относятся холерный (СТ) и дифтерийный (ДТ) токсины. Для проведения скринингового и мониторингового экспресс-анализа содержания этих токсинов в образцах различного происхождения нами были разработаны иммунохроматографические тест-системы.

Разработанные тест-системы основаны на принципе сэндвич-иммуноанализа, в основе которого лежит использование пары моноклональных антител, одно из которых связующее токсин, а второе детектирующее, в данном случае, несущее в качестве метки частицы коллоидного золота. Для определения СТ использованы в качестве связующих антитела F5/H3 и антитела B1/F8 – в качестве детектирующих. Для иммунохроматографии ДТ использованы как связующие – антитела E6B9, так и детектирующие – антитела C2G5. Ранее нами методом сэндвич-ИФА в планшетном формате было показано, что именно эти пары антител с максимальной чувствительностью выявляют токсины в исследуемых образцах, а именно, чувствительность определения СТ составляла 0,1 нг/мл, а ДТ – 1 нг/мл.

Были синтезированы конъюгаты антител B1/F8 и C2G5 с частицами коллоидного золота, имеющими размеры 20, 30, 40 и 50 нм. Показано, что максимальная чувствительность иммунохроматографического анализа СТ и ДТ достигается при использовании конъюгатов с частицами размером 40 нм. В анализе использовали тест-полоски, состоящие из впитывающей, тестовой и поглощающей зон, собранные из материалов фирмы Arista, США. При проведении анализа тест-полоску впитывающим концом опускали в водный раствор анализируемого образца. Под действием капиллярных сил образец поднимался вверх, растворяя высушенный на верхней части впитывающей зоны конъюгат детектирующих антител с коллоидным золотом, и, мигрируя с постоянной скоростью через тестовую зону, поступал в поглощающую зону. В случае, если в образце содержался токсин, проходило его связывание с детектирующим конъюгатом антител и связующими антителами, неподвижно сорбированными на поверхности тестовой зоны. В месте нанесения связующих антител появлялась визуально детектируемая полоса фиолетового цвета. В качестве положительного контроля использовали поликлональные овечьи анти-мышинные антитела. Минимальная визуально детектируемая концентрация токсинов с помощью разработанного метода составила для СТ 10 нг/мл; для ДТ 10 нг/мл, время анализа 15 мин. Для увеличения чувствительности анализа использовали

систему усиления сигнала коллоидного золота, содержащую соли серебра фирмы Sigma. В результате этого минимальная детектируемая концентрация обоих токсинов значительно уменьшилась и составила 1 нг/мл. Специфичность разработанных тест-систем характеризовали, определяя с их помощью стафилококковые энтеротоксины А, В, D, С1, Е, F и термолабильный токсин *E. coli* (LT), в диапазоне концентраций 1 мкг/мл связывания не наблюдали. Полученные результаты говорят о высокой специфичности разработанного метода определения СТ и ДТ.

Показано, что определение СТ и ДТ иммунохроматографическим методом можно проводить в образцах различной природы – в молоке, соках, водопроводной и речной воде, а также в сыворотке крови и смывах носоглотки человека без потери чувствительности.

Таким образом, был разработан экономичный, чувствительный, специфичный неинструментальный метод обнаружения холерного и дифтерийного токсинов в образцах различного происхождения, простой и доступный, который может использоваться широким кругом врачей, ученых и военных специалистов, в том числе в малооборудованных лабораториях и полевых условиях.

## IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY OF CHOLERA AND DIPHTHERIA TOXINS

*Ljubavina I.A., Petrova E.E., Valyakina T.I.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: valyakina@ibch.ru

Tel.: (495) 335-35-33

The diseases, caused by cholera (CT) and diphtheria (DT) bacterial toxins, represent a significant threat to human health. An immunochromatographic assay of qualitative express analysis to screening and monitoring the content CT and DT in different origin samples was developed. The methods are based on sandwich assay systems, using two mouse monoclonal antibodies. The first antibody is captured toxin, coated in the nitrocellulose membrane, second antibody is detected, labeled with colloidal gold.

For immunochromatography of CT used F5/H3 antibody as captured and B1/F8 antibody as detected. For detection of DT used E6B9 antibody as captured and C2G5 as detected. Earlier was shown by method of sandwich ELISA in plate format with these couples determined with a maximum sensitivity toxin, limit of detection is 0.1 ng/ml for CT and 1 ng/ml for DT.

The conjugates of the antibodies with colloidal gold with diameters of particles of 20, 30, 40 and 50 nm were synthesized. It is shown, that the particles size 40nm is optimal for maximum sensitivity of the assay. For testing used test strips consist of taking up, test and absorbing parts provided by the Arista (USA). The assay was started from immersion of the taking up end of the strip into the sample solution. The solution rised up the strip due to capillary forces and interacted with specific antibody labeled colloidal gold, applied onto the upper part of the taking up region of the test strip. Then, all the reaction components migrated up through the test zone to the absorbing zone. When toxin existed in samples, it bound to antibody-colloidal gold conjugates and then is bound by solid-phase by captured antibodies.

The sandwiched toxin molecules fixed on the captured antibody line area in the test zone and violet line can be visualized. The sheep polyclonal anti-mouse antibodies used as positive control of the test. The minimal detection concentration by developed methods is 10 ng/ml for CT and DT, the time of analysis is 15 min. The limit of detection was enhanced by silver enhancement kit, Sigma, to 1 ng/ml for CT and DT.

To evaluate specificity of the methods, the cross-reaction between CT, DT, staphylococcus enterotoxins, such as SEA, SEB, SED, SEC1, SEF, SEE and *E. coli* labile heat-toxin (LT) were studied, used concentration of the toxins 1 ng/ml. In the result, unspecific signal has not observed. Thus, indicated a high specificity of the developed methods.

It is shown, that the detection of CT or DT by developed methods is possible in different origin samples, such as milk, juice, tap and river water, human serum, nasal wash without decrease of the sensitivity.

As a result, was developed simple, sensitive, specific, economic, qualitative one-step immunochromatographic assay of detection CT and DT in different origin samples without any special equipment. The immunochromatographic method of detection of CT and DT can be used by a wide range of doctors, scientists and military experts, including not equipped laboratories and field conditions.



## РОЛЬ NADPH ОКСИДАЗЫ В АКТИВАЦИИ MAP КИНАЗНЫХ КАСКАДОВ ПРИ ФАГОЦИТОЗЕ

*Марквичёва К.Н., Мишина Н.М., Белоусов В.В., Лукьянов С.А.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: ksenmark@mail.ru  
Факс/тел.: (495) 429-80-20

Способность макрофагов фагоцитировать и разрушать клетки патогенов очень важна для нормального развития иммунного ответа. До недавнего времени продукция активных форм кислорода (АФК), в особенности перекиси водорода  $H_2O_2$ , NADPH оксидазой клеток-фагоцитов рассматривалась лишь в контексте окислительного повреждения патогенов внутри фагосомы. В то же время, гомологи фагоцитарной NADPH оксидазы были обнаружены практически во всех типах клеток. Таким образом, функционирование этих ферментов не обязательно связано с фагоцитозом, но необходимо для прохождения процессов, универсально представленных в разных клетках. Для нефагоцитирующих клеток таковыми процессами являются начальные внутриклеточные стадии MAP киназных каскадов, для прохождения которых необходима активация NADPH оксидаз. Целью данной работы являлось изучение связи активности NADPH оксидазы в фагоцитирующих макрофагах с регуляцией активности основных MAPK сигнальных каскадов.

В данной работе мы исследовали продукцию клетками макрофагов мыши RAW 264.7  $H_2O_2$  в процессе фагоцитоза частиц опсонизированного сывороткой зимозана, а так же активацию двух основных MAP киназных каскадов, p38 и Erk1/2. Для визуализации продукции  $H_2O_2$  при фагоцитозе на уровне индивидуальных клеток в реальном времени использовали клетки RAW 264.7, экспрессирующие флуоресцентный генетически кодируемый сенсор на основе GFP для детекции  $H_2O_2$  HyPer.

Активация MAP киназных каскадов в фагоцитирующих клетках изучалась методами иммунофлуоресцентного окрашивания и Вестерн-блоттинга. Мы обнаружили, что фагоцитоз активирует оба эти каскада. Кроме того, полученные нами данные свидетельствуют о взаимном ингибировании данных сигнальных каскадов.

При этом активация Erk1/2 зависит, а p38 - не зависит, от активности NADPH оксидазы. Таким образом, можно утверждать, что в фагоцитах активация MAP киназ при фагоцитозе проходит по механизму, сходному с таковым в нефагоцитирующих клетках, что свидетельствует об универсальности функции NADPH оксидаз в клетках различного типа.

## THE ROLE OF NADPH OXIDASE IN MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE CASCADES ACTIVATION AT PHAGOCYTOSIS

*Markvicheva K.N., Mishina N.M., Belousov V.V., Lukyanov S.A.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia  
E-mail: ksenmark@mail.ru  
Fax/tel.: (495) 429-80-20

The macrophage ability to engulf pathogens into specialized endocytic vacuoles and to destruct them is crucial for a proper immune response. For a long time the main mechanism of intraphagosomal pathogen destruction was considered as a result of an oxidative damage of pathogen cells by reactive oxygen species (ROS) produced by NADPH oxidase (NOX). The latest data provided a strong evidence that the pathogen destruction is a result of electrogenic NOX activity and an attended acidification of an intraphagosomal space which is needed for phagocytic proteases activation. At the same time a growing set of data suggests a second messenger role of ROS, mainly  $H_2O_2$ , in different cell types. The best example of redox signaling is mitogen activated protein kinase (MAPK) regulation thought an oxidation of cysteins in a catalytic cleft of protein tyrosine phosphates (PTPs) by  $H_2O_2$ .

In order to understand a correlation between the NOX participation in phagocytic uptake and the  $H_2O_2$  messenger role, we explored a real-time  $H_2O_2$  production and the main MAPK cascades activation in phagocytosing RAW264.7 murine macrophages.

Confocal ratiometric images of the real-time  $H_2O_2$  production in macrophages phagocytosing serum opsonized zymosan were obtained. Cells expressing a GFP-based fluorescent probe for  $H_2O_2$  detection, called HyPer, were used. Time-courses for  $H_2O_2$  production at phagocytosis were obtained for the individual cells.

NOX family proteins are expressed in most cell types and are known to take part in regulation of various signaling cascades. To better understand the NOX activity role in the main MAPK activation pathways in phagocytes, immunofluorescent staining of phagocytosing RAW 264.7 cells and Western blot analysis were used. Both Erk1/2 and p38 cascades have a basal activity in living cells and are upregulated at phagocytosing cells. The reciprocal inhibition of p38 and Erk1/2 cascades at phagocytosis was shown. We also revealed that unlike p38 signal pathway, Erk1/2 one requires ROS-producing NOX activity.

Thus,  $H_2O_2$  production in individual phagocytosing cell is transient. We also suggest that NOX activation at phagocytosis known previously as oxidative burst, is crucial for Erk1/2 signaling pathway activation in macrophages as well as in non-phagocytosing cell types.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНАЗ  
ТЕХНИЧЕСКИХ КУЛЬТУР, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ  
В УЗБЕКИСТАНЕ**

Междумян Л.Г., Рахимова Ш.Х., Абдухаликова М.А., Сагдуллаев Б.Т.,  
Юлдашев П.Х.

Институт химии растительных веществ им. академика С.Ю. Юнусова  
АН РУз, Ташкент, Узбекистан  
E-mail: shahnoza2380@mail.ru  
Факс: (99871) 120-64-75

За рубежом в практику сельскохозяйственного производства растений внедряют создание трансгенных растений, содержащих гены белков других видов растений, повышающих их устойчивость к вредителям и болезням. В настоящее время гены 14 растительных белков-ингибиторов протеиназ экспрессированы в различных культурных растениях.

Наши исследования на хлопчатнике показали линейную зависимость между концентрацией ингибиторов протеиназ и вилтоустойчивостью сорта, а также накопление ингибиторов протеиназ в ответ на инфицирование. На основании установленной зависимости впервые проведен поиск генетически закрепленных форм хлопчатника с высоким содержанием ингибиторов протеиназ. Разработан высокоэффективный метод, сочетающий ингибиторный анализ с методами иммунохимического анализа, для проведения скрининга исследуемых селекционных линий хлопчатника на важнейшие хозяйственно-ценные признаки.

Проведены выделение и очистка бифункционального ингибитора протеиназ и  $\alpha$ -амилаз из местных сортов кукурузы и пшеницы, полученные значения ингибиторной активности могут служить одним из показателей питательной ценности этих культур. Опыты на животных показали, что бифункциональный ингибитор из зерна кукурузы влияет на сворачиваемость крови. В то же время ингибиторы протеиназ привлекают внимание исследователей как вещества, способные влиять не только на пищевую и кормовую ценность растительных белков, но и обладающие определенным терапевтическим антиканцерогенным действием. Обнаруженное нами сочетание антиканцерогенных свойств бифункционального ингибитора  $\alpha$ -амилазы и субтилизина из зерна пшеницы и способности ненасыщенных жирных кислот из водорослей (61,7%) и семян *Feichodesma* (90%) подавлять опухолевый рост клеток может представлять значительный интерес при использовании таких производных ингибитора в качестве потенциальных профилактических средств.

**ПРОСТРАНСТВЕННАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ КАПСИДОВ И  
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ БЕЛКОВ  
БАКТЕРИОФАГОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ЭЛЕКТРОННО-  
МИКРОСКОПИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ**

Фильчиков М.В., Сыкилинда Н.Н., Месянжинов В.В., Мирошников К.А.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: kmi@ibch.ru

*Pseudomonas aeruginosa*, широко распространенная грамотрицательная бактерия, является умеренным патогеном, вызывающим серьезные осложнения, прежде всего у ослабленных больных. Борьба с *Ps. aeruginosa* затруднена в силу выраженной множественной устойчивости бактерии к антибиотикам. Вирусы бактерий (бактериофаги) – природные враги и эволюционные регуляторы численности бактерий – в последнее время рассматриваются как эффективные средства биоконтроля патогенов.

Вирулентные бактериофаги KMV, YuA и SN *P. aeruginosa* были выделены в нашей лаборатории, а после изучения их геномов и протеомов разработаны иммунологические и ПЦР системы детекции фагов этих видов в пробах воды и почвы. Пространственные модели капсидов, построенные на основе реконструкций криоэлектронно-микроскопических изображений с разрешением 16-18 Э, выявили ряд морфологических особенностей, присущих каждому из видов бактериофагов.

Точная идентификация местоположения многокопийных белков представляет интерес в перспективе конструирования генно-инженерных моделей, несущих пептиды на поверхности вирусной частицы (фаговый дисплей). Были получены и очищены рекомбинантные структурные белки – кандидаты и получены специфические поликлональные антитела против них. Иммуоэлектронная микроскопия на препарате очищенных фагов с визуализацией взаимодействия с вторичными антителами, конъюгированными с частицами золота, выявила декорирующие белки капсидов фагов KMV, YuA и SN.

## ELECTRON-MICROSCOPIC 3D-CAPSID RECONSTRUCTION AND IDENTIFICATION OF SURFACE PROTEINS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BACTERIOPHAGES

*Filchikov M.V., Sykilinda N.N., Mesyanzhinov V.V., Miroshnikov K.A.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: kmi@ibch.ru

Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa* bacteria attract significant medical interest as a facultative pathogen causing septic and urologic infections. Due to high natural polyresistance to antibiotics and high colonization level *Ps. aeruginosa* is difficult to treat. It thus is a prospective object for experimental therapeutic methods like phage therapy. Therefore bacterial viruses (bacteriophages), which are natural enemies and evolutionary moderators of population of bacteria, are considered as prospective remedy for pathogen biocontrol.

We have isolated strictly virulent *P.aeruginosa* bacteriophages KMV, YuA and SN, investigated their genomes and proteomes, and designed immunologic and PCR-based systems for rapid identification of YuA-like and KMV-like phages from water/soil samples. Cryo-electronic microscopic images of the phages were recorded, and 3D-image reconstructions of capsids with 16-18 Å resolution have revealed several notable features of virions specific for each particular phage specie.

Exact identification of the location of major multicopy proteins is prospective in terms of the construction of gene-engineered models bearing peptides on the surface of viral particle (phage display). We have selected, constructed and purified candidate structural proteins, and obtained specific polyclonal antibodies. Immunoelectron microscopy of purified phages with visualization by secondary gold-conjugated antibodies has revealed decorative proteins of KMV, YuA and SN capsids.

## ПРОИЗВОДНЫЕ НА ОСНОВЕ ГАНГЛИОЗИДОВ КАК УНИВЕРСАЛЬНЫЕ МЕМБРАННЫЕ ЗОНДЫ

*Михалев И.И.*

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

E-mail: Ilya.mikhalyov@gmail.com

Ганглиозиды являются хорошо известными гликолипидами на основе церамида, содержащими один или несколько остатков сиаловых кислот и выполняющими различные функции: рецепцию бактериальных токсинов и лектинов, участие в клеточных контактах, дифференциации и трансформации клеток и т.д. Все эти свойства обусловлены наличием различных олигосахаридных групп в молекуле ганглиозида. Более того, гидрофобная часть молекулы также играет немаловажную роль, будучи ответственной за участие ганглиозидов, как сфинголипидов, в составе "рафтов". В то же время ганглиозиды могут быть рассмотрены в качестве уникального объекта для конструирования молекулярных зондов при исследовании мембран и флуорофоров. Основным отличием ганглиозидов от других типов липидов, с точки зрения мечения, является возможность введения метки в полярную и неполярную области молекулы без существенного нарушения липидной структуры. Запрет на какие-либо изменения в полярной, "функционально-значимой" области липида, в настоящее время не представляется абсолютным. Остаток сиаловой кислоты, представленный в полярной головке ганглиозида, дает возможность вводить метку в определенную позицию (в противоположность другим сахарам) и может быть осуществлен двумя путями. Первый – это замена N-ацетильной группы на меченую, и второй – пероксидное окисление глициринового остатка C7-C9 в остатке сиаловой кислоты с последующим мечением через образование основания Шиффа. Первый подход представляется предпочтительным, поскольку ведет к меньшим изменениям в природной структуре ганглиозида. В действительности, N-ацил-нейраминовая кислота, в конечном итоге, отстается N-ацилированной, только меченной, тогда как во втором случае остаток сиаловой кислоты лишается 3-х гидроксильных групп. Или, широко применяемый в мембранных исследованиях N-родаминил-фосфатидилэтаноламин не имеет свободной аминогруппы, как его природный предшественник, то есть в этом случае мы имеем принципиальное нарушение природной структуры. Более того, в данном случае метка располагается очень близко к водно-липидной интерфазе и может быть вовлечена в пояс образования водородных связей бислоя в противоположность полярно-меченным ганглиозидам, где метка находится на достаточно удаленном расстоянии от этой зоны. Возможно этим объясняется, почему BODIPY-меченный по полярной части ганглиозид GM1 может выполнять роль "рафтового" зонда. В частности, различные BODIPY-меченные ганглиозиды, перекрывающие широкую область спектра (принимая во внимание преимущества BODIPY флуорофора), могут образовывать уникальный набор зондов с различной областью применения. Таким образом, это дает

возможность изучать полярный и неполярный регионы мембран с помощью однотипных зондов, построенных на основе одних и тех же молекул. Зонды, составляющие донор-акцепторные пары с положением метки в различных областях, показали возможность различать сигналы от полярно- и неполярно-меченных соединений. Другой возможностью использования зондов является изучение пептид-мембранных взаимодействий, используя полярно- или неполярно-меченные зонды, с целью определения глубины погружения различных частей пептида, как это было показано на примере взаимодействия пептида Альцгеймера с мембранами. При введении двух и более меток в состав ганглиозида появляется дополнительная возможность изучения свойств флуорофоров, поскольку метки находятся на определенном расстоянии друг от друга.

Таким образом, поскольку в мембране используются зонды на основе одной и той же молекулы ганглиозида, возможно пренебречь типом липида в противоположность использованию набора различных липофильных зондов.

## **GANGLIOSIDE-BASED DERIVATIVES AS AN UNIVERSAL MOLECULAR PROBES FOR MEMBRANE STUDIES**

***Mikhalyov I.I.***

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia  
E-mail: Ilya.mikhalyov@gmail.com

Gangliosides are well known ceramide-based glycolipids containing one or more sialic acid residues, playing a various number of membrane functions, as a receptor of bacterial toxins and lectins, cell contacts participation, cell differentiation and transformation and many others. All these properties are by virtue of different oligosaccharide head groups in the ganglioside molecules. Moreover the hydrophobic part plays the important role, being responsible for participation of gangliosides, as a sphingolipid, in the partition of "rafts". In the same time gangliosides can be considered as an unique object for the molecular probes design for membrane and fluorophore studies. The main difference of gangliosides from other types of lipids from the point of view of labeling is the possibility to label both polar and non-polar part of molecule without sufficient disturbing of the lipid structure. The restriction to input any changes to the polar, "functionally essential" part of lipid, seems not absolute now. Sialic acid residue, presented in the gangliosides polar head group, gives the opportunity to input the label in the specific position (in contrast to the others sugars) and can be done by two ways. First, is the change of N-acetyl group by the labeled one, the other – by peroxide oxidation of the glycerol residue C7-C9 in the sialic acid residue with following labeling through Schiff-base formation. The first approach seems preferable because leads to less changes of the natural ganglioside structure. In fact, the N-acyl neuraminic acid finally remains N-acyl as well, but just with the labeled one, meanwhile in the second case the sialic acid residue loses three hydroxyl groups. Or, widely used in the membrane studies N-rhodaminyl-phosphatidylethanolamine has no free amino-group as natural lipid has, so we have the principal disturbing of the natural structure. Moreover, in this case the label is situated very close to lipid-water interface and can be involved in the hydrogen bond belt of bilayer in contrast with polar-labeled ganglioside, where the label is far apart from this zone. This is possible explanation why BODIPY-labeled GM1 by the polar part can be used as "raft" probe. Particularly, different BODIPY-labeled gangliosides, covering the broad range of spectrum and, taking into consideration the advantages of BODIPY-fluorophore, can form the unique set of fluorescent probes with the different opportunities to use.

Thus, it gives the possibility to study the polar and non-polar region of membrane with the similar probes, based on the same type of the molecule. The probes, composing the donor-acceptor pair with the different location of the label have shown the possibility to distinguish between the signals from polar- and non-polar-labeled compounds.

The other possibility to use these probes is to study peptide – membrane interaction with polar- or non-polar labeled gangliosides in order to sort out how deep could be loaded several part of peptide, labeled with the corresponding label as well, as it was used for the Alzheimer peptide. When two (ore more) labels were attached to the ganglioside molecule, they were situated in the certain distance between them and give an additional opportunity to study the fluorophore properties as well.

Finally, since the same ganglioside-core probes are used, we can neglect the type of lipid base, in contrast of the case of combination of other lipophilic probes.

## ПЕПТИД ДЕЛЬТА-СНА (ДСИП) И ЕГО АНАЛОГИ: ПОИСК СОЕДИНЕНИЙ С ОНКОПРОТЕКТИВНЫМ ДЕЙСТВИЕМ

*Михалева И.И., Прудченко И.А., Ефремов Е.С., Оноприенко Л.В., Чикин Л.Д., Якубовская Р.И.\*, Немцова Е.Р.\*, Безбородова О.А.\**

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

E-mail: imikha@ibch.ru

\*ФГУ Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена Росздрава, Москва, Россия

Одним из наиболее активно развиваемых сегодня путей изыскания новых терапевтических средств в онкологии является поиск способов значительного улучшения избирательности применяемых средств в отношении опухолевых клеток и способов снижения токсичности противоопухолевой терапии. Активно исследуются фундаментальные механизмы регуляции основных клеточных процессов и межклеточных взаимодействий, нарушения которых лежат в основе канцерогенеза. Большое внимание уделяется изучению регуляторной роли пептидно-белковых факторов эндогенной природы, на основе которых ведется целенаправленное изыскание новых лекарственных средств для онкологии.

ИБХ РАН в течение многих лет проводит исследования структурно-функциональных особенностей, биологических свойств и механизма действия пептида дельта-сна (ДСИП). В результате выявлены яркие стресспротективные свойства этого природного фактора и изучены биохимические механизмы их реализации. Ранее нами уже были получены первые положительные результаты при изучении онкопротективных свойств ДСИП и группы его аналогов. 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 ряд его аналогов существенно уменьшали объем и количество метастаз на мышцах с карциномой Льюиса. Выявлена способность ДСИП ограничивать спонтанный канцерогенез и мутагенез. Результаты ранее проведенных исследований свидетельствуют о перспективности использования соединений этой группы в онкологической практике – это возможное торможение метастазирования, снижение токсического действия цитостатика и ограничение нарушений нейроэндокринного статуса.

В связи с этим нами было предпринято изучение онкопротективного потенциала ДСИП и группы родственных пептидов с целью выявления наиболее эффективных производных этой группы. Проведены работы по синтезу пептида дельта-сна и 10 его аналогов, изучению их антиоксидантных и детоксицирующих свойств, а также влияния пептидов на рост экспериментальных опухолей. Установлено, что ДСИП и его синтетические аналоги в дополнение к выраженному непрямому антиоксидантному действию обладают и прямой антиоксидантной активностью, сравнимой с

таковой витаминов 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 родственных пептида способствовали заметному снижению токсичности препарата, что выражалось в 1,5-кратном снижении летальности животных. Один из исследованных аналогов проявил наиболее положительное влияние, его 4-х кратное применение в дозе 50 мкг/кг на фоне использования цисплатина приводило к существенному снижению летальности до 17%, в то время как в контроле гибель животных достигала 50-67%. Этот же активный аналог способствовал также уменьшению гепато- и нефротоксичности цитостатика. Сочетанное применение цитостатика с ДСИП или его активным аналогом у животных с карциномой Льюиса не приводило к отмене терапевтического действия цитостатика, но и не способствовало его усилению. В настоящее время проводятся исследования еще нескольких новых аналогов ДСИП, среди которых также обнаружены пептиды с выраженным детоксицирующим действием.

Таким образом, данные исследования показали целесообразность дальнейшего изучения детоксицирующего действия регуляторных пептидов на модели токсикоза, индуцированного различными цитостатическими препаратами, поиска оптимального протокола применения пептидов, подробного изучения зависимости доза-эффект и антиметастатического потенциала пептидов.

Работа поддержана Правительством Москвы.



**DELTA-SLEEP INDUCING PEPTIDE (DSIP) AND ITS ANALOGUES: SEARCH FOR COMPOUNDS WITH ONCO-PROTECTIVE EFFECT**

*Mikhaleva I.I., Prudchenko I.A., Efremov E.S., Onoprienko L.V., Chikin L.D., Yakubovskaya R.I.\*, Nemtsova E.P.\*, Bezborodova O.A.\**

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: imikha@ibch.ru

\*Gertsen Scientific-Research Cancer Institute, Russian Ministry of Public Health, Moscow, Russia

One of the most topical lines of the modern oncology is a search for significant improvement of selectivity of therapeutic anti-tumor agents and decrease in their toxicity. Regulatory mechanisms of basic cellular processes and intercellular interactions whose disorders underlie carcinogenesis are actively studied. Much attention is given to investigation of a regulatory role of endogenous peptide and protein factors, which are the basis of a purposeful search for new drugs in oncology.

The Institute of Bioorganic Chemistry has studied structure-functional peculiarities, biological properties, and mechanism of action of Delta-Sleep Inducing Peptide (DSIP) over a long period of time. As a result, pronounced stress-protective properties of this natural factor were revealed, and biochemical mechanisms of their realization are investigated. Previously, our examination of onco-protective properties of DSIP and series of its analogues already gave first positive results. DSIP was found to increase the anti-tumor resistance of animals under the conditions of inoculation of tumor cells under stress and to inhibit dissemination of Lewis carcinoma after its surgical removal. DSIP and a number of its analogues were shown to significantly decrease the tumor volume and the number of metastases in mice with the Lewis carcinoma. The DSIP ability to limit the spontaneous carcinogenesis and mutagenesis was also revealed. Results of the previous studies demonstrate that some of these compounds are promising for oncological practice, in particular, for possible inhibition of metastasis, decrease in the toxic effects of cytostatics, and limitation of disorders of neuroendocrine status.

In this connection, we have studied the onco-protective potential of DSIP and a group of relative peptides with the aim to select the most effective derivatives of this group. DSIP and 10 of its analogues were synthesized, and their anti-oxidant and detoxifying properties and influence on a growth of experimental tumors were studied. DSIP and its analogues were found to exhibit a direct anti-oxidant activity in addition to the pronounced indirect antioxidant effect, and this direct activity was comparable with that of vitamin C and  $\beta$ -carotene. The detoxifying effect of the peptides was studied on several models of toxicosis. DSIP and three relative peptides considerably promoted the decrease in the toxicity in the model of toxicosis induced by the cisplatin cytotoxic agent. The effect of the peptide resulted in 1.5-fold decrease in the animal mortality. One of the studied analogues exhibited the most positive influence; its fourfold application at a dose of 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  on the background of the cisplatin treatment significantly decreased the mortality (up to

17%), whereas the control mortality was as high as 50-67%. The same analogue also favored a decrease in hepatotoxicity and nephrotoxicity of the cytostatic. Combination treatment of the animals with the Lewis carcinoma with the cytostatic and DSIP or its active analogue did not result in both an elimination and increase in the therapeutic effect of the cytostatic. Nowadays, a number of new DSIP analogues are studied, and peptides with the pronounced detoxifying effect are also found among them.

Thus, our studies demonstrated the expedience of the further investigation of the detoxifying effect of the regulatory peptides on the models of experimental toxicosis. The search for optimal protocol of the peptide application and detailed studies of the dose-effect dependence and anti-metastatic potential of the peptides are under way.

This study is supported by the Moscow government.

**ОРИГИНАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ТЕСТИРОВАНИЮ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ И ПРОТИВОИНФЕКЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВ НА НЕ-СПФ МЫШИНЫХ МОДЕЛЯХ**

***Моисеева Е.В., Семушина С.Г., Кесслер Ю.В., Лазарев В.Ф., Барабаншичкова В.С.\*, Козлов А.В.\*, Нефедова Н.В.\****

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: evmoiseeva@ibch.ru

\*МГУ прикладной биотехнологии, Москва, Россия

Тестирование противоопухолевых и противоинфекционных препаратов (по-П и пи-П, соответственно) на мышинных биомоделях, находящихся в условиях, свободных от патогенной флоры (СПФ), ставит вопрос об адекватности полученных результатов для человека. Очевидно, что хронические инфекции у человека (а) протекают одновременно с прогрессией рака молочной железы (РМЖ) и осложняют лечение и (б) не адекватны острым экспериментальным заражениям лабораторных мышей. Поэтому нашей целью было охарактеризовать микробиологический статус наших не-СПФ мышинных моделей и сформулировать основные положения авторского подхода к тестированию по-П и пи-П.

Трехступенчатая система тестирования по-П позволяет выявить как прямое, так и опосредованное иммунной системой действие на рост РМЖ: (1) *in vitro* на краткосрочных культурах раковых и иммунных клеток как интактных мышей, так и опухоленосителей; (2) *in vivo* на сингенных перевиваемых и (3) *in vivo* на спонтанных моделях. Главной особенностью проведения тестирования препаратов против РМЖ на последнем, завершающем этапе является его максимальное приближение к клиническим испытаниям, а именно, апробация в сочетании с хирургическим удалением опухоли и без, что проиллюстрировано на примере иммунотерапии РМЖ интерлейкином-2. Мы показали, что естественно развивающиеся, в том числе, и под действием хронических воспалительных процессов, спонтанные опухоли молочных желез самок мышей BLRB/BYRB и CBRB наиболее адекватно отражают основные типы РМЖ человека. Метод "точечных экспериментов", гипотеза "закрытого окна" и анализ действия препарата по подгруппам в соответствии с особенностями роста опухоли позволяют улучшить дизайн эксперимента при ограниченном количестве подопытных мышей и адекватно проанализировать полученные данные, выявив как положительные, так и отрицательные эффекты действия исследуемого по-П.

Испытания пи-П проводятся на модели хронического дерматита мышей CBRB, которая вполне адекватна соответствующему заболеванию человека. Возбудителями внутрививарной инфекции у мышей, как и внутрибольничных заболеваний человека, являются *Staphylococcus aureus* и коагулазонегативные стафилококки, рост которых, как известно, ингибируют пробиотические культуры, например, лактобактерии, лактококки и продукты их жизнедеятельности. Прижизненный забор проб с кожи спины мышей и их индивидуальный микробиологический анализ позволили выявить как позитивное, так и негативное действие этих пробиотиков на используемой биомодели.

**ORIGINAL APPROACHES TO TEST ANTI-CANCER AND ANTI-INFECTIOUS DRUGS IN NON-SPECIFIC PATHOGEN FREE (NON-SPF) MOUSE MODELS**

***Moiseeva E.V., Semushina S.G., Kessler Yu.V., Lazarev V.F., Barabanshchikova V.S.\*, Kozlov A.V.\*, Nefedova N.V.\****

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: evmoiseeva@ibch.ru

\*MSU of Applied Biotechnology, Moscow, Russia

Routine anti-cancer and anti-infectious drug (ac-D and ai-D, respectively) testing approaches using specific pathogen free (SPF) mouse models rise a question in what extend they correspond to analogous diseases in clearly non-SPF human patients. Chronic infectious processes in humans obviously (a) proceed simultaneously with breast cancer (BC) progression and interfere a given anti-cancer treatment and (b) non-adequate to acute experimental infections in SPF laboratory mice. Therefore, our aim was to characterize microbiological statuses of our non-SPF mouse models and formulate main guidelines of author's approach to ac-D and ai-D testing procedure.

Three-step set of ac-D testing procedure permits to reveal both direct and indirect effect (latter due to immune system control) of a given drug on BC growth: (1) *in vitro*, using short term cultures of both cancer and immune cells from intact and tumor bearing mice; (2) *in vivo*, using transplanted and (3) spontaneous BC mouse models. The main characteristic of ac-D testing procedure at the final step is it's investigation both with and without preceding surgical tumor extirpation, making our approach in mouse model as close to clinical trial as possible. This is illustrated by immunotherapy using interleukin-2. We showed that naturally arisen (including those occurred due to chronic inflammation) spontaneous BC in BLRB/BYRB and CBRB females adequately mimics main types of human BC. "Point experiment" method, hypothesis of "closed window", and subdividing both control and experimental groups in subgroups according to similar characteristics of tumor growth following analysis of ac-D effect within those subgroups permit to improve experimental design using limited amounts of mice and reveal both positive and negative effects of tested drug.

Model of naturally arisen chronic dermatitis in CBRB mice was shown to be adequate to analogous disease in humans. This model is useful for ai-D testing as *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci cause intravivarium contamination for mice and hospital-acquired infection for human patients. As ai-D we tested probiotic cultures, for instance, lactobacterium, lactococci and products of their vital activities that are well known to inhibit staphylococci growth. Regular individual spinal skin probing and microbiological analyses permit to reveal therapeutic efficacy of tested probiotics in mouse model used. Both positive and negative effects were revealed in individual mice.

**СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДИМЕРА  
ТРАНСМЕМБРАННОГО ДОМЕНА БЕЛКА-ПРЕДШЕСТВЕННИКА  
АМИЛОИДА**

*Надеждин К.Д., Бочарова О.В., Бочаров Э.В., Арсеньев А.С.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: verne@nmr.ru

В результате последовательного ферментативного расщепления белка-предшественника амилоида (amyloid precursor protein, APP) в организме человека образуется ряд полипептидов. Одним из них является амилоид-beta пептид (Abeta), который играет ключевую роль в образовании бляшек во время развития болезни Альцгеймера. Однако, физиологическое действие APP остается невыясненным. Хорошо известно, что специфические наследственные мутации APP вызывают усиленное производство Abeta в организме. Большая часть этих дефектов локализована в трансмембранном (TM) домене APP. Возможно, они вызывают нарушения укладки полипептидной цепи TM домена APP, влияя тем самым на димеризацию белка и его последовательное расщепление в плазматической мембране. Присутствие характерных мотивов в последовательности APP, таких как GxxxG/A, указывает на спираль-спиральный механизм димеризации TM домена.

В настоящей работе мы разработали рекомбинантную систему экспрессии и систему очистки фрагмента APP (686-726), включающего в себя TM сегмент. При помощи современных методик ЯМР-спектроскопии мы исследовали структурно-динамические свойства димера TM домена APP в средах, имитирующих мембранное окружение.

**STRUCTURAL INVESTIGATIONS OF DIMERIC  
TRANSMEMBRANE DOMAIN OF AMYLOID PRECURSOR  
PROTEIN**

*Nadezhdin K.D., Bocharova O.V., Bocharov E.V., Arseniev A.S.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow,  
Russia  
E-mail: verne@nmr.ru

The amyloid precursor protein (APP) undergoes sequential cleavages to generate diverse polypeptides, including the amyloid beta peptide (Abeta), which is believed to play a major role in amyloid plaque formation in Alzheimer's disease. However, its physiological functions remain unclear. It is well known that specific familial mutations in APP cause overproduction of Abeta. The majority of these defects is located in the transmembrane (TM) domain of APP, probably disordering the protein fold and influencing its dimerization mechanism in the plasma membrane. The presence of characteristic sequential motifs in the APP polypeptide chain, such as GxxxG/A, indicates the helix-helix type of TM dimerization. We developed the bacterial expression system and purified recombinant APP fragment (686-726) including the TM domain. Using the modern solution NMR techniques we investigated structural-dynamic properties of the dimeric APP TM domain in membrane mimetic environment.

## СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКОВ

*Некрасов А.Н.\*, Зинченко А.А.\*, Кирпичников М.П.\*\*\**

\*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: alexei\_nekrasov@mail.ru

\*\*Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Анализ организации каталитических центров ферментов показывает, что детерминированное изменение взаимной ориентации функциональных групп является ключевым фактором, обеспечивающим эффективность ферментов. Они должны обладать механизмом, обеспечивающим детерминированные перестройки в каталитических центрах. Классические представления об организации белков не всегда позволяют выявить в 3D-структуре ферментов элементы, которые могут выполнять эту функцию. В настоящей работе предложен метод, позволяющий выявлять подобные структурные элементы на основе анализа информационной структуры белковых последовательностей.

В основе метода лежит новое представление о белковой последовательности как совокупности информационных единиц. Такой подход позволяет выявлять в любых аминокислотных последовательностях иерархически организованные элементы – элементы информационной структуры (ЭЛИС). Нами было показано, что в белках с четко выраженной доменной структурой границы структурных доменов совпадают с границами ЭЛИС высших рангов, что позволяет утверждать, что ЭЛИС высшего ранга выполняют функциональную роль структурных доменов. Приведены примеры получения рекомбинантных белков с заданными функциональными характеристиками путем удаления из нативной полипептидной последовательности фрагментов, соответствующих ЭЛИС.

Метод анализа информационной структуры белков реализован в виде "АНИС" веб-сервиса, доступного по адресу: [anis.ibch.ru/trees](http://anis.ibch.ru/trees).

## STRUCTURAL ORGANIZATION OF THE PROTEINS

*Nekrasov A.N.\*, Zinchenko A.A.\*, Kirpichnikov M.P.\*\*\**

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

\*\*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

E-mail: alexei\_nekrasov@mail.ru

Fax: (495) 330-69-83

Analysis of organization of catalytic centers of the enzymes demonstrates that the determined alteration of the functional groups mutual orientation represents the key factor providing enzyme efficiency. They should possess the mechanism providing determined rearrangements in catalytic centers. Classical concepts in protein organization don't always allow to identify the elements responsible for this function in 3D-structure of the enzymes.

In current work we have proposed the method for identification of such structural elements based on the analysis of informational structure of protein sequences. The method relies upon the new concept of protein sequence as a complex of informational units. This approach allows identification in any protein sequences of hierarchically organized elements – elements of informational structure (ELIS). It was shown that in the proteins having obvious domain structure the borders of structural domains correspond to the borders of high-ranking ELIS. In this case one can claim that high-ranking ELIS accomplish the functional role of structural domains. Constructions of recombinant proteins with specified functional properties by deleting ELIS-corresponding fragments from wild-type protein sequences are exemplified.

The method of analysis of informational structure is realized as "ANIS" Web-service at [anis.ibch.ru/trees](http://anis.ibch.ru/trees).

The work is supported by Grant SS-2231.2008.4.

**СТРУКТУРНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ  
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РИБОСОМНОГО БЕЛКА L1 СО  
СПЕЦИФИЧЕСКИМИ ФРАГМЕНТАМИ мРНК И рРНК**

***Никонова Е.Ю., Костарева О.С., Тищенко С.В., Сычева А.М.\*,  
Мошковский С.А.\*, Невская Н.А., Гарбер М.Б., Никонов С.В.***

Институт белка РАН, Пушкино, Россия

\*НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Москва, Россия

E-mail: katya\_nik@vega.protres.ru

Факс/тел.: (495) 632-78-71

Для функционирования многих биологических систем важна способность белков специфически узнавать определенные участки на поверхности РНК, однако, правила, по которым происходит это узнавание, слабо изучены. Объектом наших исследований является рибосомный белок L1. Этот белок образует L1-выступ рибосомы, участвующий в высвобождении деацилированной тРНК из E-сайта. Кроме того, он имеет специфический участок связывания на мРНК и осуществляет регуляцию собственного синтеза по принципу "обратной связи".

В настоящей работе для изучения взаимодействий белка L1 и РНК мы используем комбинированный подход, включающий совокупность рентгеноструктурных и кинетических исследований. Для наших экспериментов мы выбрали мутантные формы белка L1 и его первого домена с заменами аминокислотных остатков в области консервативного РНК-узнающего модуля. Из полученных нами данных можно сделать вывод о том, что одиночные замены в области РНК-белкового интерфейса консервативных полярных аминокислотных остатков на неполярные оказывают аллостерическое воздействие на соседние участки структуры и значительно увеличивают скорость диссоциации РНК-белковых комплексов. Кроме того, показано, что делеция восьми N-концевых аминокислотных остатков в первом домене белка L1 из *Thermus thermophilus* приводит к нарушению формирования комплексов белка, как с матричной, так и с рибосомной РНК.

Работа была поддержана грантом РФФИ (№ 07-04-00734), Программой поддержки ведущих научных школ и Программой МКБ РАН.

**STRUCTURAL AND KINETIC ANALYSIS OF INTERACTIONS  
BETWEEN RIBOSOMAL PROTEIN L1 AND SPECIFIC RNA  
FRAGMENTS**

***Nikonova E.Yu., Kostareva O.S., Tishchenko S.V., Sycheva A.M.\*,  
Moshkovskii S.A.\*, Nevskaya N.A., Garber M.B., Nikonov S.V.***

Institute of Protein Research RAS, Pushchino, Russia

\*Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Moscow, Russia

E-mail: katya\_nik@vega.protres.ru

Fax/tel.: (495) 632-78-71

The ability of proteins to recognize the certain site on the RNA surface with high specificity is very important for functioning of different biological systems. But the rules of such recognition and discrimination are still poorly studied. The object of our investigations is ribosomal protein L1. It is one of the largest ribosomal proteins located on the side protuberance of the 50S ribosomal subunit. L1 is a primary RNA-binding ribosomal protein which associates independently, specifically and strongly with 23S rRNA. Beside that L1 has a specific binding site on its mRNA and regulates its own synthesis by a feedback mechanism.

To investigate L1-RNA interactions we used the combined approach, which include the X-ray and kinetic studies. For our investigations we chose mutant forms of L1 and its domain I with the amino acid substitutions in the conserved RNA-recognition module. Our data demonstrate that a single replacement of conserved polar amino acid residues by a non polar one in the region of the RNA-protein interface has an allosteric action on the neighboring structural elements and significantly increase dissociation rate constants of RNA-protein complexes. We have also shown that deletion of eight N-terminal amino acid residues in domain I of L1 from *Thermus thermophilus* results in impairing of the complex formation with both mRNA and rRNA.

This work was supported by the Russian Academy of Sciences, the Russian Foundation for Basic Research (N 07-04-00734), the Program of RAS on Molecular and Cellular Biology and the Program of the RF President on support of outstanding scientific schools.



**ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА НОВОГО  
АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ИЗ СЕМЯН ЕЖОВНИКА  
ОБЫКНОВЕННОГО (*ECHINOCHLOA CRUSGALLI*)**

***Nolde S.B.*\*, *Rogozhin E.A.*\*, *Vassilevski A.A.*\*, *Barinov N.A.*\*\*\*,  
*Balashova T.A.*\*, *Egorov T.A.*\*, *Grishin E.V.*\*, *Arseniev A.S.*\***

\*Институт биоорганической химии им.академика М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

\*\*Московский физико-технический институт, Долгопрудный Россия

E-mail: aars@nmr.ru

Факс: (495) 335-50-33; тел.: (495) 330-74-83

Растения выработали различные механизмы защиты от патогенов и стрессовых факторов абиотической природы, важную роль в которых играют защитные белки и антимикробные пептиды (АМП). К АМП растений относятся короткие (30-80 аминокислотных остатков) Cys-богатые пептиды, которые ингибируют рост фитопатогенов *in vitro*. Из семян ежовника обыкновенного (*Echinochloa crusgalli*) методами жидкостной хроматографии выделен пептид Ec-AMP1, определена его полная аминокислотная последовательность и изучена биологическая активность. Показано, что этот пептид ингибирует рост конидий ряда фитопатогенных грибов.

Методом <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии определена пространственная структура пептида в водном растворе при pH 3,4 и pH 6,6. При обоих значениях pH пептид имеет сходную структуру: две спирали, образованные остатками 7-14 и 22-30, связаны реверсивным поворотом между остатками 15-21 и стабилизированы двумя дисульфидными мостиками 7-29 и 11-25. Боковые цепи остатков Val22, Val26, Met12 и цистеинов образуют в середине молекулы гидрофобный кластер. Полярные боковые цепи остатков пептида, а также боковая цепь Trp20 экспонированы в водную среду. Боковая цепь Trp20 находится в двух конформациях, переход между которыми осуществляется вращением угла  $\chi^2$ . N- и C-концевые остатки пептида имеют неупорядоченную структуру. В то же время, в структуре Ec-AMP1 были отмечены различия при переходе от pH 6,6 к pH 3,4: обе  $\alpha$ -спирали дестабилизируются, N-концевая  $\alpha$ -спираль переходит в  $3_{10}$ -спираль, увеличивается подвижность петлевого участка между спиралями.

Поиск структурных гомологов изучаемого пептида в базе данных PDB выявил ингибитор трипсина VhTI из семян *Veronica hederifolia* [1]. VhTI представлен в PDB в виде комплекса с трипсином в кристалле. Пептиды имеют высокую структурную гомологию в области  $\alpha$ -спиралей, однако по нашим данным Ec-AMP1 не ингибирует трипсин.

*Литература*

- [1] Connors R., Konarev A.V., Forsyth J., Lovegrove A., Marsh J., Joseph-Horne T., Shewry P., Brady R.L. "An unusual helix-turn-helix protease inhibitory motif in a novel trypsin inhibitor from seeds of Veronica (*Veronica hederifolia* L.)" *J. Biol. Chem.* (2007) **282**, 27760-27768.

**SPATIAL STRUCTURE OF A NOVEL ANTIMICROBIAL PEPTIDE  
FROM SEEDS OF COMMON BARNYARD GRASS  
(*ECHINOCHLOA CRUSGALLI*)**

***Nolde S.B.*\*, *Rogozhin E.A.*\*, *Vassilevski A.A.*\*, *Barinov N.A.*\*\*\*,  
*Balashova T.A.*\*, *Egorov T.A.*\*, *Grishin E.V.*\*, *Arseniev A.S.*\***

\*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

\*\*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudnyj, Russia

E-mail: aars@nmr.ru

Fax: (495) 335-50-33; тел.: (495) 330-74-83

Plants have produced a wide spectrum of defense mechanisms against pathogens and abiotic stress factors. Pathogenesis-related proteins (PR-proteins) and antimicrobial peptides (AMPs) are believed to play an important role in defense mechanisms. Plant AMPs are short (30-80 residues) Cys-rich peptides, which reduce growth of phytopathogens *in vitro*. The peptide Ec-AMP1 was purified from seeds of Common Barnyard Grass (*Echinochloa crusgalli*). Its full amino acid sequence was determined and its biological activity was studied. Micromolar concentrations of the peptide were shown to inhibit conidial growth of several fungal phytopathogens.

Three-dimensional structure of the peptide in aqueous solution was determined by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy at pH 3.4 and pH 6.6. Ec-AMP1 has similar structure at both pH consisting of two antiparallel helices formed by the residues 7-14 and 22-30 that are linked together by a turn (residues 15-21) and stabilized by two disulfide bonds 7-29 and 11-25. A small hydrophobic core between the helices is formed by the side chains of residues Val22, Val26, Met12 and cysteines. All polar side chains and the side chain of Trp20 are exposed to aqueous solution. The side chain of Trp20 has two conformations switched by the rotation around the  $\chi^2$  dihedral angle. N- and C-termini are unstructured. Nevertheless, essential reorganization of the spatial structure was observed while changing pH from 6.6 to 3.4. Both helices became destabilized, the N-terminal  $\alpha$ -helix switched to a  $3_{10}$ -helix, and the mobility of the turn between the helices increased.

Comparative analysis of three-dimensional structures in PDB revealed similarity between Ec-AMP1 and the trypsin inhibitor VhTI from seeds of *Veronica hederifolia* [1]. The structure of VhTI in PDB is in the form of complex with trypsin. VhTI and Ec-AMP1 are highly similar in the helix region. However, our data show no inhibitory activity of Ec-AMP1 against trypsin.

*Reference*

- [1] Connors R., Konarev A.V., Forsyth J., Lovegrove A., Marsh J., Joseph-Horne T., Shewry P., Brady R.L. "An unusual helix-turn-helix protease inhibitory motif in a novel trypsin inhibitor from seeds of Veronica (*Veronica hederifolia* L.)" *J. Biol. Chem.* (2007) **282**, 27760-27768.

**AGGREGATION PROPENSITY OF THE ALZHEIMER'S AMYLOID  $\beta$ -PEPTIDE IS ENHANCED BY THE JAPANESE MUTATION E22 $\Delta$**

*Ovchinnikova O. Yu., FINDER V.H., Vodopivec I. \*, Nitsch R.M. \*, Glockshuber R. \**

Institute of Molecular Biology and Biophysics, ETH Zurich, Switzerland

\*Division of Psychiatry Research, University of Zurich, Switzerland

E-mail: oxanao@mol.biol.ethz.ch

Fax: +41-44-633-10-36; tel.: +41-44-633-27-53

Alzheimer's disease (AD) is an irreversible, progressive brain disease that slowly destroys memory and thinking skills. The pathogenesis of this disease is complex and involves many molecular, cellular and physiological pathologies. AD is characterized by accumulation of extracellular amyloid plaques and intracellular neurofibrillar tangles in human brain tissue. The extracellular deposits are predominantly composed of aggregated amyloid  $\beta$ -peptides ( $A\beta$ ).  $A\beta$  is generated from the amyloid precursor protein (APP) via proteolytic cleavage and has a length of 39-43 amino acid residues. Predominant  $A\beta$  variants are the  $A\beta$ 1-40 and  $A\beta$ 1-42. Majority of AD cases occur spontaneously, a subset of early-onset familial AD cases, however, is caused by mutations in the genes encoding the  $A\beta$  precursor or presenilins.

We investigated an effect of the recently described  $A\beta$  mutation E22 $\Delta$ , which was identified in Japanese patients, on aggregation characteristics and neurotoxicity of  $A\beta$ . The protocol for producing recombinant  $A\beta$ , earlier developed in our group, was improved to obtain highly pure unmodified  $A\beta$ . To investigate aggregation kinetics of the variants  $A\beta$ 1-40 and  $A\beta$ 1-42 with and without the E22 $\Delta$  mutation, we applied thioflavin T assay which allows to measure fluorescence continuously in heterogeneous samples. We also introduced the method for monitoring amount of soluble  $A\beta$  during aggregation process using a plate reader instrument. These assays revealed that recombinant  $A\beta$ 1-42 E22 $\Delta$  and  $A\beta$ 1-40 E22 $\Delta$  exhibited *in vitro* enhanced aggregation propensity compared to  $A\beta$ 1-42 wt and  $A\beta$ 1-40 wt.  $A\beta$ 1-40 E22 $\Delta$  showed an increased tendency to form bundles of fibrils which were visualized with electron microscopy. To investigate the pathogenic role of the mutation E22 $\Delta$ , we performed cytotoxicity assays with the four peptide variants in rat primary neuron cultures. The  $A\beta$ 1-40 E22 $\Delta$  and  $A\beta$ 1-42 wt caused significant detrimental effects on cell viability in contrast to  $A\beta$ 1-42 E22 $\Delta$  and  $A\beta$ 1-40 wt. These results were confirmed by immunocytochemical imaging of the neuronal cells.

**ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР DUSF ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С РЕГУЛЯТОРНЫМИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМИ Е-БОКС В ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ СЕМЕННИК-СПЕЦИФИЧНЫХ ГЕНОВ *STELLATE DROSOPHILA MELANOGASTER***

*Оленкина О.М., Егорова К.С., Кибанов М.В., Гвоздев В.А., Оленина Л.В.*

Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

E-mail: olenkina@img.ras.ru

Факс: (499) 196-02-21; тел.: (499) 196-08-09

Работа посвящена исследованию регуляторной области тандемно повторенных семенник-специфичных генов *Stellate*, расположенных в X-хромосоме и кодирующих белки, гомологичные регуляторной  $\beta$ -субъединице протеинкиназы CK2 (casein kinase 2). В семенниках самцов дикого типа экспрессия генов *Stellate* подавляется высокомолекулярными им повторами Suppressor of *Stellate* (*Su(Ste)*), расположенными в Y-хромосоме. Транскрипция повторов *Su(Ste)* служит источником антисмысловых piRNA (Piwi-interacting RNA), репрессирующих экспрессию генов *Stellate*. Удаление повторов *Su(Ste)* вызывает сверхэкспрессию генов *Stellate* и накопление в клетках сперматоцитов кристаллов белка *Stellate*, что приводит к нарушениям мейоза и стерильности самцов. Промотор генов *Stellate* не содержит ТАТА-бокса, однако несет последовательность инициатора Inr. Ранее было показано, что фрагмента промоторной области генов *Stellate* размером 134 п.о. достаточно как для *Su(Ste)*-зависимого сайленсинга репортерной конструкции *Ste134-lacZ* в семенниках мух, так и для ее высокоэффективной экспрессии в отсутствие повторов *Su(Ste)*. Дальнейший анализ делеционных конструкций, выполненный в этой работе, продемонстрировал значительное снижение экспрессии репортера в линиях *Ste63-lacZ* по сравнению с конструкцией *Ste134-lacZ* и практически полное подавление экспрессии в случае *Ste44-lacZ*. Таким образом, участок 134 п.о. (от -101 до +33 нуклеотида относительно сайта старта транскрипции) представляет собой минимальный промотор генов *Stellate*, короткий участок 71 п.о. (от -101 до -30 нуклеотида) может содержать один или несколько сайтов связывания транскрипционных факторов. Методом гель-шифта мы обнаружили, что в ядерном экстракте семенников содержатся белковые факторы, специфично взаимодействующие с тремя консенсусными последовательностями в минимальном промоторе. Эти последовательности были идентифицированы нами как Е-боксы, сайты связывания транскрипционных факторов класса bHLH (basic helix-loop-helix). Мы продемонстрировали, что связывание факторов с Е-боксами семенник-специфично, нарушение последовательности Е-бокса блокирует образование комплексов, и что со всеми тремя Е-боксами взаимодействует один и тот же фактор (комплекс факторов). Установлен ряд биохимических свойств предполагаемого фактора: зависимость ДНК-белковых взаимодействий от присутствия ионов  $Mg^{2+}$  и окислительно-восстановительного состояния среды, улучшение связывания в присутствии полиаминов. Эти данные в сочетании с данными тканеспецифичных экспрессионных библиотек транскриптов позволили нам предположить, что искомым фактор – это dUSF.

С помощью полученных в мышцах поликлональных анти-dUSF антител методом супер-шифта мы однозначно определили предполагаемый фактор класса bHLH как dUSF. Методом иммунофлуоресцентного окрашивания продемонстрировано присутствие dUSF в клетках первичных и зрелых сперматоцитов, где гены *Stellate* экспрессируются, и отсутствие сигнала от dUSF в культуре клеток *Drosophila* S2, где гены *Stellate* не экспрессируются. Проводится *in vivo* анализ роли E-боксов в регуляции экспрессии генов *Stellate* с помощью трансгенных репортерных конструкций.

**TRANSCRIPTION FACTOR DUSF INTERACTS WITH E-BOX REGULATORY SEQUENCES IN PROMOTER REGION OF THE TESTIS-SPECIFIC *STELLATE* GENES IN *DROSOPHILA MELANOGASTER***

***Olenkina O.M., Egorova K.S., Kibanov M.V., Gvozdev V.A., Olenina L.V.***

Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow, Russia

E-mail: olenkina@img.ras.ru

Fax: (499) 196-02-21; tel.: (499) 196-08-09

This study is devoted to investigation of the regulatory region of the tandemly repeated X-chromosome-linked testis-specific *Stellate* genes in *Drosophila melanogaster*, encoding proteins homologous to the regulatory  $\beta$ -subunit of the protein kinase CK2. In testes of wild-type males, expression of *Stellate* genes is repressed by highly homologous Y-linked *Su(Ste)* (*Suppressor of Stellate*) repeats. Silencing of *Stellate* genes is provided by antisense piRNAs (Piwi-interacting RNA) produced by transcription of *Su(Ste)* repeats. Deletion of *Su(Ste)* locus leads to overexpression of *Stellate* protein, which forms abundant crystals in the spermatocytes, and also to meiotic abnormalities and male sterility. The promoter of *Stellate* genes seems to be TATA-less but initiator-containing one. Previously it was found that 134 bp region containing *Stellate* transcription start site (TSS) was sufficient both for *Su(Ste)*-dependent silencing and high-level expression of the transgene *Ste134-lacZ* reporter in testes of males lacking *Su(Ste)* repeats. Further investigation of the deletion reporter constructs performed in this work demonstrated the significant reduction of *lacZ* expression in *Ste63-lacZ* construct, as compared with *Ste134-lacZ*, and almost complete repression of expression in case of *Ste44-lacZ*. We considered the 134 bp fragment (-101 bp upstream - +33 bp downstream of the TSS) to be a minimal promoter region of *Stellate* genes and that a short fragment of 71 bp (from -101 bp to -30 bp) contained some transcription factor binding site(s). Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) demonstrated the formation of specific protein-DNA complexes with three regulatory sequences from *Stellate* minimal promoter in testis nuclear extract. We identified these sequences as E-boxes, the binding sites for basic helix-loop-helix (bHLH) superfamily of transcriptional regulatory proteins. We demonstrated that the binding of putative bHLH factor(s) with E-boxes was testis-specific, the mutation in the consensus sequence of the E-box disrupted the binding, and that the testis-specific factor(s) binding three E-boxes from *Stellate* promoter region in the testis extract were the same. Several biochemical properties of the putative bHLH factor(s) were demonstrated, such as  $Mg^{2+}$ -dependence of the complex formation, enhancement of the binding in the presence of polyamines, redox-dependence of the protein-DNA interaction. Taken together with tissue-specific expression sequence tags data, these biochemical findings allowed us to suppose dUSF to be a protein of interest. In super-shift EMSA experiments, using polyclonal mouse anti-dUSF antibodies, we identified the transcription factor recognizing E-boxes as dUSF. Immunofluorescence staining of the whole-mount testes from adult flies showed dUSF presented in the primary and mature spermatocytes, where *Stellate* expression was shown to start. We detected no USF signal in the immunostained *Drosophila* S2 cell culture, where *Stellate* was not expressed. *In vivo* analysis of the E-box influence on the expression of *Stellate* genes using reporter gene constructs is now being performed.

## РЕКОМБИНАНТНЫЙ БТШ70 ЧЕЛОВЕКА КАК СРЕДСТВО ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА ОТ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

*Остров В.Ф., Евгеньев М.Б. \*, Мурашев А.Н.*

Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, Россия  
\*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия  
E-mail: ostrov@fibkh.serpukhov.su  
Факс/тел.: (4967) 73-37-53

Эндотоксины грамотрицательных бактерий представляют собой липополисахариды (ЛПС). При проникновении в системный кровоток организма они способны вызывать воспалительную реакцию. При недостаточности или истощении защитных механизмов хозяина могут развиваться такие патологические состояния как сепсис и септический шок.

Одним из важнейших молекулярных механизмов, обеспечивающих защиту клеток и организма от теплового и многих других видов стресса, является внутриклеточная экспрессия белка теплового шока 70 кДа (БТШ70). В нашей лаборатории ранее были получены данные о защитных свойствах БТШ70 из мышцы быка и рекомбинантного человеческого БТШ70 (рБТШ70) при внутривенном введении их (в дозе 266 мкг/кг) крысам с эндотоксическим шоком.

В настоящей работе изучали дозозависимый эффект рБТШ70 на модели эндотоксического шока у крыс. Эксперименты выполнены на свободных от патогенной микрофлоры бодрствующих самцах крыс Sprague-Dawley весом 300-350 г. Эндотоксический шок моделировали внутривенным введением ЛПС из *E. coli* в дозе 2 мг/кг (n=15). Препарат белка вводили внутривенно за 10 минут до ЛПС в дозах 266 мкг/кг (n=15) и 133 мкг/кг (n=10). Регистрировали выживаемость животных от эндотоксического шока в течение 3 суток после начала эксперимента. Параметры гемодинамики (среднее артериальное давление и частота сердечных сокращений) регистрировали в течение 5 часов после введения эндотоксина. Показатели гемостаза (протромбиновое и тромбопластиновое времена свертывания крови, время фибринолиза, концентрация фибриногена) регистрировали в исходном состоянии, через 20 минут и через 5 часов после введения ЛПС.

Показано, что защитное действие рБТШ70 зависит от дозы вводимого препарата. В дозе 133 мкг/кг препарат рБТШ70 оказывает значительно меньший защитный эффект на модели эндотоксического шока. Возможно, это вызвано способностью БТШ70 распознавать и образовывать комплексы с молекулами ЛПС, предотвращая тем самым их токсическое воздействие на организм.

## HUMAN RECOMBINANT HSP70 PREVENTS TOXIC EFFECTS OF LIPOPOLYSACCHARIDES

*Ostrov V.F., Murashev A.N., Evgen'ev M.B. \**

Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino, Russia  
Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow, Russia  
E-mail: ostrov@fibkh.serpukhov.su  
Fax/tel.: (4967) 73-37-53

Lipopolysaccharides (LPS) are cell wall component of gram-negative bacteria. These endotoxic molecules can induce inflammatory in circulation of host. Sepsis and endotoxic shock develop when inner protective mechanisms of host are attenuated and exhausted.

Heat shock proteins 70 kDa (HSP70) are an important family of endogenous cytoprotective proteins that are induced in response to heat and a variety of other stresses. Protective effect of bovine HSP70 in rat sepsis model has been obtained in our laboratory.

In present study we examined dose-dependent effect of HSP70 protection in rat model of endotoxic shock model. Adult male Sprague-Dawley rats (SPF status, weight 300-350 g) were used in the experiment. All animals were anesthetized (chloral hydrate, i.p., 400 mg/kg) and catheterized 24 hours before the experiment. Lipopolysaccharide (*E. coli*) administration (i.v., 2 mg/kg) used to induce the endotoxic shock. Intravenous medication of human recombinant HSP70 (rhHSP70) injected 10 minutes before LPS (266 and 133 µg/kg). rhHSP70 administration had a protect action on clotting time, fibrinogen level, fibrinolytic system, stabilized biochemical parameters of blood, prevented arterial hypotension and tachycardia. Mortality in groups: 83% with LPS, 70% with rhHSP70 (133 µg/kg) + LPS and 30% with rhHSP70 (266 µg/kg) +LPS.

Our results suggested that dose-dependent effect of rhHSP70 was present. High dose (266 µg/kg) was more effective to treat sepsis in rats.



**ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТНЫХ ВАРИАНТОВ ЦИТОХРОМА С  
ЛОШАДИ СО СНИЖЕННОЙ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНОЙ  
АКТИВНОСТЬЮ НА ОСНОВЕ МЕТОДА АНАЛИЗА  
ИНФОРМАЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ**

***Острроверхова Т.В.*\*\*\*, *Черткова Р.В.*\*, *Пепелина Т.Ю.*\*,  
*Богатова О.В.*\*, *Некрасов А.Н.*\*, *Долгих Д.А.*\*\*\*, *Кирпичников М.П.*\*\*\***

\*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

\*\*Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия  
E-mail: tato-tato@list.ru

Целью данной работы является создание мутантных форм цитохрома *c*, обладающих сниженной электрон-транспортной активностью. Исследование таких мутантных форм должно позволить изучить механизм взаимодействия цитохрома *c* с комплексами III и IV дыхательной цепи митохондрии.

Работа основана на ранее предложенной модели функционирования цитохрома *c*, объясняющей механизм возникновения сил, выводящих атом Fe из плоскости гема. Метод анализа информационной структуры (anis.ibch.ru/trees) позволил выявить в первичной структуре цитохрома *c* два элемента информационной структуры (ЭЛИС) высшего ранга, на каждом из которых расположены по одному остатку, взаимодействующему с атомом Fe. Движение друг относительно друга элементов пространственной структуры, соответствующих различным ЭЛИС высшего ранга, обеспечивает возникновение деформаций полипептидной цепи, локализующихся на сайте (76-83), содержащем один из остатков, который взаимодействует с атомом Fe.

Точечными мутациями в сайте 76-83 можно изменить структурные характеристики, обеспечивающие реализацию конформационных перестроек, необходимых для электрон-транспортной активности цитохрома *c*. Анализ структурной значимости отдельных аминокислотных остатков и их локального окружения позволил предложить точечные мутации, ряд из которых был реализован в настоящей работе.

Получены варианты генов цитохрома *c*, несущие мутации I81Y/A83Y/G84N, T78N/K79Y/M80I/I81M/F82N и T78S/K79P. Мутантные гены экспрессированы в бактериальной системе, рекомбинантные белки получены и очищены в необходимых для исследований количествах. В настоящее время проводятся исследования взаимодействия полученных мутантных вариантов цитохрома *c* с его редокс-партнёрами – комплексами III и IV дыхательной цепи митохондрий.

**DESIGN OF MUTANT VARIANTS OF HORSE CYTOCHROME C  
WITH LOWER ELECTRON-TRANSPORT ACTIVITY FROM  
ANALYSIS OF INFORMATIONAL STRUCTURE**

***Ostroverkhova T.V.*\*\*\*, *Chertkova R.V.*\*, *Pepelina T.Y.*\*, *Bogatova O.V.*\*,  
*Nekrasov A.N.*\*, *Dolgikh D.A.*\*\*\*, *Kirpichnikov M.P.*\*\*\***

\*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

\*\*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia  
E-mail: tato-tato@list.ru

The aim of this research work is design of mutant variants of cytochrome *c* with lower electron-transport activity. Examination of such mutant variants will allow to study interaction machinery of cytochrome *c* and complex III and IV of the mitochondrial respiratory chain.

This research work is based on early model of cytochrome *c* functioning, explaining force machinery of Fe atom's moving out of heme cleft. Analysis of informational structure method (anis.ibch.ru/trees) allowed to reveal two supreme elements of informational structure (ELIS) of cytochrome *c* primary structure. Each ELIS contains one residue interacting with Fe atom. Moving of as spatial structure elements relative to each other as different supreme ELIS provides appearance of polypeptide deformation in site (76-83), which contains residue interacting with Fe atom.

Using site-directed approach according site (76-83) we can change structural characteristics, provided conformational adjustments, which are required for electron-transport activity of cytochrome *c*. Analysis of separate residue structural significance and local environment one allowed to suppose point mutations, some of them are realised in this research work.

Mutant genes of cytochrome *c* I81Y/A83Y/G84N, T78N/K79Y/M80I/I81M/F82N and T78S/K79P have been obtained and expressed in bacterial system. Recombinant proteins have been purified at amounts required for further examination. Now we are studying interaction of obtained mutant variants of cytochrome *c* with its redox partners – complex III and IV of the mitochondrial respiratory chain.



## ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ СУРВИВИН И SMAC/DIABLO *IN VITRO*

Павлюков М.С., Антипова Н.В., Завалова Л.Л., Шахпаронов М.И.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: marat.pav@mail.ru  
Тел.: (495) 330-65-56

Сурвивин является многофункциональным белком, он участвует в ингибировании апоптоза, регуляции клеточного цикла, а также в процессе деления клетки. В растворе сурвивин существует в виде гомодимера, однако в каком состоянии он находится в различных компартментах клетки до сих пор однозначно неизвестно. Сурвивин экспрессируется в большинстве опухолей и в эмбриональных тканях, но при этом отсутствует в неделящихся тканях взрослого организма. Повышенная экспрессия сурвивина придаёт раковым клеткам устойчивость к облучению радиацией и противоопухолевым препаратам. Антиапоптотное действие сурвивина основано на его способности взаимодействовать с проапоптотным белком Smac/Diablo и ингибировать его активность. Повышение экспрессии сурвивина в раковых клетках ведёт к тому, что большая часть Smac/Diablo оказывается связанной с сурвивином и из-за этого не способна вызывать апоптоз. Ингибирование экспрессии сурвивина приводит к значительному повышению апоптоза в опухолевых клетках, однако, не влияет на нормальные клетки организма. Таким образом, сурвивин является привлекательной мишенью для антираковой терапии и, кроме этого, на обнаружении присутствия сурвивина в исследуемых образцах могут быть основаны методы диагностики раковых заболеваний.

Нами было осуществлено более точное картирование участка Smac/Diablo, необходимого для связывания с сурвивином. Мы показали, что удаление уже первых восьми аминокислот зрелого Smac/Diablo приводит к отсутствию взаимодействия. Кроме того, мы доказали что *in vitro* Smac/Diablo способен взаимодействовать с мономером сурвивина, хотя ранее предполагалось, что мономер сурвивина не обладает биологической активностью и не способен взаимодействовать с белком Smac/Diablo. В настоящее время нами проводятся эксперименты по изучению взаимодействия этих белков и их мутантов *in vivo* в клетках различных клеточных линий.

## INVESTIGATION OF THE INTERACTION BETWEEN RECOMBINANT SURVIVIN AND SMAC/DIABLO *IN VITRO*

Pavlyukov M.S., Antipova N.V., Zavalova L.L., Shahparonov M.I.

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia  
E-mail: marat.pav@mail.ru  
Tel.: (495) 330-65-56

The protein survivin is an inhibitor of apoptosis which also plays an important role in the regulation of the cell cycle and is necessary for cell division. In solution survivin behaves like a homodimer. However, the state in which it appears in different compartments of the cell still remains unclear. Survivin is selectively overexpressed in most human cancers and in embryonic tissues, but not in differentiated cells of the adult organism. High levels of survivin expression make cancer cells insensitive to radiation and treatment with anti-tumor drugs. The anti-apoptotic effect of survivin is based on its binding to the proapoptotic protein Smac/Diablo and inhibiting Smac/Diablo activity. The increase of survivin expression in tumor cells leads to the its binding to most of the Smac/Diablo molecules, which as a result cannot induce apoptosis. Inhibition of survivin expression leads to apoptosis in cancer cells, but has no effect on normal tissues. Thereby, survivin appears a very attractive target for anticancer therapy. In addition, it might be used as diagnostic molecular marker to distinguish between different types of cancers.

In this report we investigated the interaction between survivin and Smac/Diablo. We made a more accurate map of the region of Smac/Diablo which interacts with survivin. We showed that removing the first eight amino acids of mature Smac/Diablo fully abrogates its interaction with survivin, which narrows it down from the twenty currently considered necessary in the literature. Furthermore, we have proven that *in vitro* Smac/Diablo can interact with the survivin monomer, even though previous results suggested that the surviving monomer doesn't have any biological activity and can't interact with Smac/Diablo. Currently, we are studying the interactions of these proteins and their mutants *in vivo* in different cell lines.

## НОВАЯ СИСТЕМА ВЫЯВЛЕНИЯ СЛУЧАЙНЫХ МУТАЦИЙ В ДНК СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

*Патрушев Д.И., Заболотнева А.А., Патрушева Н.Л.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: patrush@mx.ibch.ru  
Тел.: (495) 429-86-10

Случайные мутации непрерывно возникают в клетках организма на протяжении его жизни как следствие ошибок репликации ДНК, а также эндогенных и экзогенных генотоксических воздействий. Средняя частота спонтанных мутаций у животных оценивается на уровне  $10^{-8}$ - $10^{-10}$  на нуклеотид геномной ДНК и может существенно возрастать в различных экстремальных условиях существования организма. В частности, для опухолевых клеток нередко характерен так называемый мутаторный фенотип, при котором возрастает частота спонтанных мутаций. Мутации в онкогенах и генах-супрессорах опухолей, в свою очередь, являются причиной малигнизации тканей и возникновения злокачественных новообразований. Повышение уровня спонтанного мутагенеза отмечено и в условиях окислительного стресса, а также под действием генотоксических факторов экзогенного происхождения. С учетом этого, для оценки функционального состояния генома, прогноза развития патологических процессов и принятия адекватных мер необходимо определять уровень спонтанного и индуцированного мутагенеза в соматических клетках. Целью проведенных нами исследований была разработка новой концепции в оценке уровней случайного соматического мутагенеза и ее апробация в условиях эксперимента.

Действие разработанной нами системы основано на трех принципах. Во-первых, оценка уровня мутагенеза осуществляется путем измерения числа случайных мутаций в повторяющихся последовательностях ДНК. С помощью ПЦР и одной пары праймеров удается равномерно амплифицировать большинство повторов ДНК анализируемого генома и очистить продукты амплификации для последующего анализа произошедших в них мутаций. Во-вторых, использован высокоэффективный метод обогащения редких мутантных последовательностей. В-третьих, применен основанный на ПЦР высокочувствительный метод их детекции.

В качестве модели нами выбраны В1-ретропозоны мыши (~140 п.н.), для которых известна консенсусная последовательность нуклеотидов, а число копий в геноме составляет ~500 000. В1-Повторы геномной ДНК амплифицировали с помощью пары праймеров, один из которых был биотинилирован по 5'-концу. На этом этапе были оптимизированы условия амплификации, при которых число мутаций, вносимых в продукт ПЦР ДНК-полимеразой, было минимальным. Биотинилированные продукты ПЦР связывали с магнитными микрочастицами (Dyna1 Biotech), содержащими на своей поверхности молекулы стрептавидина, и отделяли от несвязавшегося материала с помощью магнитного концентратора. Число мутантных повторов

в иммобилизованных таким образом продуктах ПЦР определяли по возникновению в них под действием мутаций новых сайтов рестрикции путем замены единственного нуклеотида. В качестве рестриктаз были выбраны AspS91 (Cfr131) с сайтом рестрикции G↓GNCC, Fsp4H1 (Sat1) с сайтом GC↓NGC и HinfI с сайтом G↓ANTC. Освободившиеся рестриктазные фрагменты лигировали с универсальным олигонуклеотидным адаптером, с которым далее взаимодействовал один из праймеров при ПЦР-амплификации фрагментов ДНК. Второй праймер был комплементарен последовательности повтора.

Разработанная система позволила нам впервые выявить в геноме мышей инбредных линий редкие последовательности В1-повторов, исходно содержащие анализируемые сайты рестрикции, которые отсутствуют в консенсусной В1-последовательности. Кроме того, с помощью данной системы проведена качественная оценка уровня соматического мутагенеза у мышей, подвергнутых экзогенному воздействию этилнитрозомочевинной.

## NEW ASSAY FOR DETECTION OF RANDOM MUTATIONS IN THE DNA OF SOMATIC CELLS

*Patrushev L.L., Zabolotneva A.A., Patrusheva N.L.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia

E-mail: patrush@mx.ibch.ru

Tel.: (495)429-86-10

Random mutations continuously arise in the cells during organism life span as a consequence of replication errors as well as endogenous and exogenous genotoxic exposure. Average spontaneous mutation rate in animals is estimated at  $10^{-8}$ - $10^{-10}$  per genomic DNA nucleotide and may be considerably higher under different extreme conditions. In particular, tumor cells often exhibit so-called mutator phenotype, i.e. increased spontaneous mutation rate. The mutations in oncogenes and tumor suppressor genes cause, in turn, tissue malignization and tumor formation. The elevation of spontaneous mutation rate was registered as a consequence of oxidative stress as well as under exposure to the exogenous genotoxic factors. Taking all the abovesaid into account, it is necessary to measure the spontaneous and induced mutation rate in somatic cells for estimation of the genome functional state, for better prognosis of disease and its adequate treatment. The goal of our investigations was the development and experimental testing of new conception of assay for random mutation rate determination.

The operation of our assay is based on three main concepts. First, the mutagenesis was detected by measurement of random mutations in repeated nucleotide sequences. By using one pair of primers only it is possible to amplify evenly most analyzed DNA repeats, followed by PCR product purification and mutation detection. Second, high-performance method for rare mutant sequence enrichment was used. Third, for detection of rare sequences the highly sensitive PCR-based method was applied.

Mouse B1 retroposons (~140 bp,  $\sim 5 \times 10^5$  copy number per genome) with known consensus sequence were chosen as a model. Genomic B1 repeats were amplified by pair of primers, one of which was 5'-biotinylated. At this stage, the amplification conditions were optimized which allow to minimize the number of mutation introduced into PCR product by *Taq* DNA polymerase errors. Biotinylated PCR products were bound by streptavidin-coated magnetic microparticles, and complexes were purified by Dynal Magnetic Particle Concentrator (Dynal Biotech). The number of mutant sequences in immobilized PCR products was determined by appearance of new restriction sites which created by mutational replacement of single nucleotide in several potential site sequences. The following restriction endonucleases were chosen for assay development: Asp91/Cfr131 with restriction site G↓GNCC, Fsp4HI/SatI (GC↓NGC), and HinfI (G↓ANTC). The released restriction fragments were ligated to an universal oligonucleotide adaptor, which serves as the priming site for PCR amplification. The second primer was complementary to the restriction fragment sequence.

The worked out assay permit us to observe for the first time rare B1 repeat sequences which contain initially the restriction sites under study missing in the consensus B1 sequence. Also the qualitative evaluation of somatic mutagenesis was performed in ethylnitrosourea treated mice.

## НЕКОДИРУЮЩИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ГЕНОМА ЗАЩИЩАЮТ КОДИРУЮЩИЕ УЧАСТКИ ГЕНОВ ОТ ХИМИЧЕСКОГО МУТАГЕНЕЗА

*Патрушев Л.Л., Минкевич И.Г.\**

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

E-mail: patrush@mx.ibch.ru

Tel.: (495) 429-86-10

\*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино Россия

Размеры геномов эукариотических организмов, обозначаемые латинским символом *C*, различаются более, чем в 200 000 раз. При этом не обнаруживается корреляции между фенотипической сложностью биологических видов и размером их генома. У позвоночных одними из самых больших геномов обладают хвостатые амфибии и двоякодышащие рыбы – по ~120 пг (~ $1,2 \times 10^{11}$  п.н.) ДНК. Для сравнения – размер генома человека составляет 3,5 пг. Основная масса ДНК больших эукариотических геномов представлена некодирующими последовательностями, функции которых неизвестны. Для объяснения этого феномена ("загадки *C*") нами разработана количественная модель, в соответствии с которой некодирующие последовательности создают новую (третью) защиту кодирующих частей от химических (главным образом эндогенных) мутагенов. Две первые – это системы антимутагенеза и репарации повреждений ДНК.

Предполагается, что химические мутагены, в основном, поступают в ядро путем диффузии через ядерные поровые комплексы (NPC). При этом эволюционное изменение размеров кодирующей и некодирующей частей генома по-разному влияет на поток мутагенов в ядро через NPC, поскольку процесс биосинтеза белковых компонентов NPC в большей степени связан с кодирующей частью генома. Соответственно, скорость потока мутагенов из цитоплазмы в ядро в нашей модели описывается следующим уравнением:

$$\varphi = \varphi_{0c} N_{cT} + \varphi_{0nc} N_{ncT}$$

Здесь  $\varphi$  – общий поток мутагенов в ядро, моль/с,  $N_{cT}$  и  $N_{ncT}$  – общее число нуклеотидов, соответственно, в кодирующих и некодирующих частях генома ("общее" означает сумму поврежденных и неповрежденных мутагенами нуклеотидов);  $\varphi_{0c}$  и  $\varphi_{0nc}$  – коэффициенты, описывающие влияние кодирующих и некодирующих частей генома на поток мутагенов в реальное ядро. Это влияние осуществляется через регуляцию общего количества NPC на поверхности ядра и/или проницаемости NPC для мутагенов. Решение уравнений для стационарного состояния системы ядро мутагены с учетом процессов поступления мутагенов в ядро, повреждения и репарации ДНК приводит к следующей зависимости повреждаемости кодирующих нуклеотидов генома от количества содержащейся в нем некодирующей ДНК:

$$\beta/\beta_0 = N_{cT}/N_T + (1 - N_{cT}/N_T)\varphi_{0nc}/\varphi_{0c},$$

где  $\beta$  – доля поврежденных кодирующих нуклеотидов в реальном геноме (отношение числа поврежденных кодирующих нуклеотидов к общему числу

нуклеотидов генома);  $\beta_0$  – аналогичная величина для гипотетического генома, содержащего всю кодирующую ДНК реального генома и не содержащего его некодирующей ДНК;  $N_T = N_{CT} + N_{ncT}$  – суммарное содержание всех нуклеотидов в геноме (кодирующих и некодирующих, поврежденных и неповрежденных). Из последнего уравнения следует, что в нашей модели гомогенного ядра защитный эффект некодирующих последовательностей имеет место, если  $\varphi_{onc} < \varphi_{oc}$ , то есть, если число NPC и их проницаемость для мутагенов определяются количеством кодирующей ДНК в большей степени, чем количеством некодирующей ДНК. При этом защитное действие некодирующей ДНК тем выше, чем меньше зависит величина потока мутагенов через ядерную мембрану от наличия некодирующих последовательностей, и наибольший защитный эффект некодирующей ДНК должен иметь место при  $\varphi_{onc} = 0$  (одинаковые количество и проницаемость NPC для мутагенов в отсутствие некодирующей ДНК и при ее наличии). Теоретически защитное действие некодирующих последовательностей может быть еще значительнее в том случае, если они уменьшают общий поток мутагенов внутрь ядра  $\varphi_{oc} < 0$ . Наконец, защита будет отсутствовать при равной детерминированности потоков мутагенов кодирующими и некодирующими последовательностями  $\varphi_{onc} = \varphi_{oc}$ . С увеличением в геноме содержания некодирующей части, доля повреждаемых мутагенами нуклеотидов в кодирующих последовательностях уменьшается, причем весьма существенно при  $N_{ncT} \gg N_{CT}$ . Например, для человека вышеупомянутая доля кодирующей ДНК  $\sim 3\%$  означает  $N_{ncT}/N_{CT} \sim 0,97/0,03 \approx 32$ .

У видов, имеющих низкую активность систем антимутагенеза и репарации повреждений ДНК защитный эффект некодирующих НП может играть основную роль в снижении частоты мутаций, возникающих в кодирующих последовательностях, до приемлемого уровня. Для этого клетки должны иметь высокое содержание некодирующих НП в геноме. Это – возможное объяснение "загадки С".

## NON-CODING SEQUENCES OF EUKARYOTIC GENOME PROTECT CODING PARTS OF GENES AGAINST CHEMICAL MUTAGENESIS

*Patrushev L.I., Minkevich I.G. \**

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: patrush@mx.ibch.ru

Tel.: (495) 429-86-10

\*Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino, Russia

Eukaryotic genome sizes, designated by "C" symbol, differ over 200,000-fold. But there is no correlation between the organism genome size and its phenotypic complexity. Among vertebrates, amphibians and lungfishes have the largest genomes of  $\sim 120$  pg ( $\sim 1.2 \times 10^{11}$  bp) DNA. For comparison, the size of the human genome is 3.5 pg. The main part of DNA of large eukaryotic genomes is represented by non-coding sequences, the functions of which are unknown. To explain this phenomenon ("C-value enigma") we have developed a quantitative model, according to which the non-coding sequences serve as a new (third) protection system safeguarding coding parts of genome against chemical (mainly endogenous) mutagens. The first two are antimutagenesis and DNA repair systems.

It is assumed at this stage of modelling that chemical mutagens enter the nucleus mainly by diffusion through nuclear pore complexes (NPC). Moreover, the evolutionary changes of coding and non-coding genome region sizes differently influence the flow of mutagens into the nucleus through NPC, since the process of biosynthesis of the NPC protein components is largely associated with the genome coding part. Accordingly, the rate of mutagen flow from cytoplasm into nucleus in our model describes the following expression:

$$\varphi = \varphi_{oc} N_{CT} + \varphi_{onc} N_{ncT}$$

where  $\varphi$  is total mutagen flow into the nucleus, mole/sec;  $N_{CT}$  and  $N_{ncT}$  are total numbers of nucleotides, respectively, in coding and non-coding genome regions ("total" means the sum of damaged and undamaged nucleotides);  $\varphi_{oc}$  and  $\varphi_{onc}$  are coefficients that describe the effect of coding and non-coding genome regions on the mutagen flow into the real nucleus. This effect is based on regulation of the NPC total number on the nuclear surface and/or the NPC permeability for mutagens. The model equations take into account the processes of mutagen delivery into the nucleus, nucleotide damage and repair. Solution of the equations for steady state of the nucleus-mutagen system results in the following dependence:

$$\beta/\beta_0 = N_{CT}/N_T + (1 - N_{CT}/N_T)\varphi_{onc}/\varphi_{oc},$$

where  $\beta$  is the fraction of damaged nucleotides in the real genome (ratio of the number of damaged nucleotides to total number of nucleotides in the genome);  $\beta_0$  is a similar value for a hypothetical genome containing total coding DNA of real genome and free of its noncoding DNA;  $N_T = N_{CT} + N_{ncT}$ , the total content of all nucleotides in the genome (coding and non-coding, damaged and undamaged). It

follows from last equation that under the above assumptions the protective effect of non-coding sequences takes place when  $\varphi_{\text{onc}} < \varphi_{\text{oc}}$ , i.e. if the number of NPC and their permeability for mutagens are defined to a higher extent by the amount of coding than non-coding DNA. It should be emphasized that the lower is the dependence of the mutagen flow through the nuclear membrane on the presence of non-coding sequences (i.e., the lower is the coefficient  $\varphi_{\text{onc}}$ ), the higher the protective effect of non-coding DNA is. The highest protective effect of non-coding DNA should take place at  $\varphi_{\text{onc}} = 0$  (when both NPC amount and permeability for mutagens have equal values in the presence and absence of non-coding DNA). In theory, the protective effect of non-coding sequences might be even higher if they reduced the total mutagen flow into the nucleus ( $\varphi_{\text{onc}} < 0$ ). Finally, protection is absent in the case of equal determinacy of mutagen flows by coding and non-coding sequences ( $\varphi_{\text{onc}} = \varphi_{\text{oc}}$ ). As the content of non-coding region in the genome increases, the fraction of mutagen-damaged nucleotides in coding NS decreases and rather greatly at  $N_{\text{ncT}} \gg N_{\text{cT}}$ .

In species, which have low activities of antimutagenesis and DNA repair systems, the protective effect of non-coding sequences may play the main role in reduction of spontaneous mutation rate in the coding sequences to acceptable level. For this, the cells should have very high content of non-coding sequences in their genome. This is a possible solution of "C-value enigma".

## ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ЖЕЛТОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА PhiYFP, УСТАНОВЛЕННАЯ С ПОМОЩЬЮ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИХ И РАСЧЕТНЫХ МЕТОДОВ

*Пахомов А.А., Мартынов В.И.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: alpah@mail.ru

Желтый флуоресцентный белок (YFP) широко применяется в качестве FRET партнера к циановому флуоресцентному белку (CFP) при изучении биопроцессов на клеточном уровне. Желтый флуоресцентный белок из *Phialidium sp.* (PhiYFP) имеет дополнительный батохромный сдвиг в 20 нм по сравнению с широко распространенным EYFP и по спектральным характеристикам близок к гомологу из *Zoanthus sp.*, zFP538. В настоящей работе при помощи гомологичного моделирования установлена структура PhiYFP. Ранее структура флуоресцентных белков определялась исключительно при помощи кристаллографических исследований, так как при помощи моделирования нельзя установить структуру хромофора – ключевого компонента белка. Мы установили структуру хромофора PhiYFP при помощи масс-спектрометрических исследований выделенного из белка хромофорсодержащего пептида. Объединив данные масс-спектрометрии и гомологичного моделирования, мы получили полную структуру PhiYFP. Комбинирование масс-спектрометрических и расчетных методов для установления структуры флуоресцентных белков было применено впервые и может быть использовано для определения структуры других гомологов, не поддающихся кристаллизации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 09-04-00212), а также Российского Федерального агентства по науке и инновациям (МК-1094.2009.4).



### 3D-STRUCTURE OF YELLOW FLUORESCENT PROTEIN PhiYFP SOLVED BY MASS-SPECTROMETRIC AND COMPUTATIONAL METHODS

Pakhomov A.A., Martynov V.I.

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: alpah@mail.ru

The yellow fluorescent protein (YFP) is widely used as a FRET partner of the cyan fluorescent protein (CFP) in the study of bioprocesses at the cell level. The yellow fluorescent protein from *Phialidium sp.* (PhiYFP) exhibits additional bathochromic shift of 20 nm as compared to widespread EYFP and spectrally is very close to its homolog, zFP538 from *Zoanthus sp.*. In the present work the spatial structure of PhiYFP was determined by means of homology modeling. Previously, the structures of FPs were determined solely by crystallographic studies mostly because of impossibility of modeling the unknown chromophore structure, a key component of a fluorescent protein. Here we have determined the PhiYFP chromophore structure by means of mass-spectrometric analysis of the chromophore-bearing peptide isolated from a proteolytic digest of the protein. By combining mass-spectrometric and homology modeling data, the complete 3D-structure of PhiYFP has been obtained. This novel approach combining mass-spectrometric and computational methods can be used in 3D-structure determination of non-crystalizable homologous proteins.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (No. 09-04-00212) and by the Russian Federal Agency for Science and Innovations (MK-1094.2009.4).

### ИСКУССТВЕННЫЕ ФНО-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ ДОМЕНА ФИБРОНЕКТИНА

Петровская Л.Е., Шингарова Л.Н., Некрасов А.Н., Крюкова Е.А., Болдырева Е.Ф., Якимов С.А., Долгих Д.А., Кирпичников М.П.

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

E-mail: lpetr65@yahoo.com

Факс/тел.: (495) 330-69-83

Фибронектиновый домен (10 домен фибронектина III типа, Fn3) является структурным аналогом VN домена иммуноглобулинов. Этот небольшой белок не содержит остатков цистеина и хорошо экспрессируется в клетках *E. coli* в растворимой форме. Варьирование аминокислотных последовательностей в трех петлях Fn3, соответствующих CDR в молекулах антител, позволяет получать белки, обладающие способностью связывать различные антигены.

Фактор некроза опухолей-альфа человека (ФНО) - полифункциональный цитокин, один из основных медиаторов воспаления. Многие аутоиммунные и воспалительные заболевания человека сопровождаются сверхпродукцией ФНО, которая приводит к патологическим состояниям, включая септический шок. Таким образом, конструирование ФНО-связывающих белков для снижения уровня этого цитокина в организме представляет собой актуальную задачу белковой инженерии. Нами получены гены искусственных белков, в которых последовательности петель Fn3 заменены последовательностями CDR из легкой (Fn3L) и тяжелой (Fn3H) цепей антитела F10, связывающего ФНО с высокой аффинностью и обладающего нейтрализующими свойствами. Разработаны методики экспрессии полученных генов в *E. coli* и выделения рекомбинантных белков. Проведен анализ связывания ФНО вариантами Fn3L и Fn3H с использованием метода ELISA. Показано, что оба варианта специфически связываются с ФНО, при этом взаимодействие с другими цитокинами не наблюдается.

С целью изучения роли отдельных CDR в связывании ФНО получены варианты Fn3L и Fn3H с заменами одного из CDR последовательностями петель Fn3. Проводится изучение полученных белков.

Работа проводится при финансовой поддержке гранта НШ-2231.2008.4 и программы РАН "Молекулярная и клеточная биология".

## ARTIFICIAL TNF-BINDING PROTEINS BASED ON HUMAN FIBRONECTIN DOMAIN

*Petrovskaya L.E., Shingarova L.N., Nekrasov A.N., Kryukova E.A., Boldyreva E.F., Yakimov S.A., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

E-mail: lpetr65@yahoo.com

Fax/tel.: (495) 330-69-83

Human fibronectin domain (10<sup>th</sup> fibronectin type III domain, Fn3) is the structural analogue of VH immunoglobulin domain. This small protein doesn't contain cysteine residues and is expressed in *E. coli* cells at high level in soluble form. Variation of amino acid sequences of 3 CDR-like loops of Fn3 generates proteins which can bind different antigens with high affinity.

Human tumor necrosis factor-alpha (TNF) is a multifunctional cytokine which plays a central role in inflammation. Many autoimmune and inflammatory diseases are accompanied with TNF superproduction leading to pathologic conditions including septic shock. Therefore construction of TNF-binding proteins in order to decrease the level of this cytokine in the organism represents the urgent task of the protein engineering. F10 monoclonal antibody was previously shown to bind TNF with high affinity and neutralize its activity. We have obtained the synthetic genes encoding for artificial proteins in which Fn3 loop sequences are displaced with CDRs from the light (Fn3L) and the heavy (Fn3H) chains from F10. We have expressed these genes in *E. coli* cells and purified the corresponding proteins. By the use of ELISA with recombinant human TNF we have shown that both variants specifically bind TNF but don't interact with other cytokines tested.

To study the role of individual CDR's in TNF binding we have substituted one of each CDR regions in Fn3L and Fn3H proteins with corresponding wild-type Fn3 loop sequences. The properties of the chimeric proteins are under investigation.

The work is supported by Grant SS-2231.2008.4 and Russian Academy of Sciences Programme "Molecular and Cell Biology".

## TRIP8b – НОВЫЙ КЛАТРИН-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК

*Попова Н.В., Деев И.Е., Петренко А.Г.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: popova@ibch.ru

Клатрин-опосредованный эндоцитоз (СМЕ) необходим для транспорта липидов и белков с цитоплазматической мембраны и сети Гольджи. В нервных окончаниях с помощью этого процесса осуществляется компенсаторный эндоцитоз синаптических пузырьков после выброса нейромедиатора. В последнее десятилетие были найдены многие белковые компоненты сложного механизма, регулирующего СМЕ и образование клатрин-покрытых пузырьков. Многие белки экспрессируются в широком диапазоне клеток и выполняют общие функции, но в то же время, найдены белки, которые экспрессируются в ограниченном типе клеток и выполняют более специфичные функции.

Нами был обнаружен цитоплазматический белок с несколькими тетраатрикопептидными повторами (TRIP8b), связывающийся с кальцийнезависимым рецептором альфа-латротоксина (CIRL). Для изучения функциональной роли TRIP8b мы провели поиск белков, которые с ним взаимодействуют, методом аффинной хроматографии экстрактов мозга крысы на иммобилизованном TRIP8b. В элюатах с TRIP8b-сефарозы были идентифицированы клатрин и субъединицы комплекса AP-2. С помощью укороченных конструкций и многоточечных мутантов TRIP8b в последовательности этого белка были определены области, отвечающие за взаимодействие с клатрином.

Методом дифференциального центрифугирования была выделена фракция клатрин-покрытых пузырьков. Окрашивание специфичными антителами показало, что TRIP8b действительно содержится в данной фракции.

Полученные результаты позволяют предположить участие TRIP8b в клатрин-опосредованном эндоцитозе.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №09-04-01644-а), Программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Фундаментальные науки - медицине".

## TRIP8b IS A NOVEL CLATHRIN-BINDING PROTEIN

*Popova N.V., Deyev I.E., Petrenko A.G.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

E-mail: popova@ibch.ru

Clathrin-mediated endocytosis (CME) is necessary for the transport of lipids and proteins from the cytoplasmic membrane and Golgi network. In axon terminals, CME is required for synaptic vesicle recycling after neurotransmitter release. Over the past decade, numerous protein components of the complex machinery, regulating CME and the formation of clathrin-coated pits, have been identified. Many of these proteins have general functions, common to all forms of CME, and are found in all cell types. However, proteins, expressed in limited cell types, were also identified that exhibit specific functions.

TRIP8b, a putative cytosolic adapter protein with multiple tetratricopeptide repeats, was initially identified by us as calcium-independent receptor of latrotoxin (CIRL)-interacting protein. To understand functional significance of CIRL-TRIP8b interaction, we further isolated TRIP8b-interacting proteins by affinity chromatography of brain extracts on immobilized recombinant TRIP8b. Clathrin and the subunits of AP2 complex appeared to be the major TRIP8b-interacting proteins. We identified two clathrin binding sites in TRIP8b using N-terminal GST-fused TRIP8b truncated proteins and multiple point mutants. The fraction of clathrin-coated vesicles (CCV) was isolated, and TRIP8b was detected in this fraction with specific antibodies.

Our data suggest a role of TRIP8b in receptor-mediated endocytosis.

This work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 09-04-01644-a) and Program of Presidium of the Russian Academy of Sciences "Fundamental Sciences for Medicine".

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ПРОАПОПТОЗНОГО БЕЛКА BNIP3

*Шульга А.А., Пустовалова Ю.Е., Ткач Е.Н., Кирпичников М.П., Арсеньев А.С.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: jul@nmr.ru

Проапоптотный белок BNIP3 играет ключевую роль в смерти клеток при гипоксии. Белок принадлежит к семейству митохондриальных белков BCL-2, подгруппе BH3-only, на основании гомологии аминокислотной последовательности, но механизм его действия значительно отличается от других проапоптотных белков этого же семейства. Клеточная смерть, вызванная BNIP3, не сопровождается высвобождением цитохрома *c*, а имеет несколько признаков некроза. Более глубокий анализ активности BNIP3 является проблематичным, если не обеспечить источник, из которого его можно выделять в больших количествах. Поэтому BNIP3 синтезировали в *Escherichia coli* напрямую или же в виде гибридного белка, будучи присоединенным к С-концу SUMO или Mistic. Самый высокий уровень экспрессии наблюдался в случае гибрида SUMO-BNIP3 - более чем 100 мг/л в богатой автоиндукционной среде. Гибридный белок содержал две аффинных тага-последовательности из шести гистидинов на N-конце и Streptag II на С-конце. Выращивание бактерий при высоких температурах (около 37°C) способствовало накоплению белка в тельцах включения, тогда как при более низких температурах (около 13°C) большая часть белка локализовалась в бактериальной мембране. Были подобраны минимальные автоиндукционные среды, пригодные для мечения белка стабильными изотопами <sup>15</sup>N и <sup>13</sup>C, которые обеспечивают выход BNIP3 не менее, чем 20 мг на литр культуры. Разработан протокол выделения гибридного белка из мембранной фракции, который включал в себя экстракцию белка из клеток при помощи детергента и металлохелатную аффинную хроматографию. Гибридный белок затем расщеплялся при помощи SUMO гидролазы и BNIP3 выделялся путем аффинной хроматографии на смоле с иммобилизованным Streptactin и ионообменной хроматографии. Следуя этому протоколу, было очищено несколько миллиграмм <sup>15</sup>N-меченного BNIP3. Белок был солюбилизован в водном растворе мицелл ДФХ с молярным соотношением белок/детергент – 1:60. Были получены предварительные <sup>15</sup>N-HSQC спектры при 40°C для образца, содержащего 20 мМ ацетатного буфера, 0.15 мкМ азида натрия, 1 мМ ЭДТА и 5% D<sub>2</sub>O (pH 5.0). В полученном ЯМР спектре наблюдалось примерно 70% HN-N кросс-пиков.

## EXPRESSION AND PURIFICATION OF PRO-APOPTOTIC PROTEIN BNIP3

*Schulga A.A., Pustovalova Yu.E., Tkach E.N., Kirpichnikov M.P., Arseniev A.S.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia  
E-mail: jul@nmr.ru

Mitochondrial pro-apoptotic protein BNIP3 plays an important role in hypoxia-induced death of normal and malignant cells. BNIP3 belongs to BH3-only subfamily of Bcl-2 family but it has atypical mechanism of activity. Cell death mediated by BNIP3 is independent of cytochrome *c* release and shows several characteristics of necrosis. The deeper analysis of BNIP3 activity is problematic without availability of raw material, containing this protein in big quantities. The *BNIP3* gene was expressed in *Escherichia coli* directly or as fusion to 3'-end of SUMO or Mistic genes. The highest expression level was observed in the case of the SUMO fusion - more than 100 mg/l in rich autoinduction medium. The fusion protein contains two affinity tags – sequence of six histidins on N-terminus of SUMO and Streptag II on C-terminus of BNIP3. Bacterial growth at higher temperatures (about 37°C) is favored to the protein deposition in inclusion bodies, whereas at lower temperatures (about 13°C) most of the protein is localized in the bacterial membrane. Minimal autoinduction media were selected for <sup>15</sup>N-, <sup>13</sup>C-isotope labeling of BNIP3 which give yields of 20 mg/l. The protocol for the fusion protein purification from the membrane fraction was developed which includes steps of the protein detergent extraction from bacterial cells and metal-chelate affinity chromatography. Then fusion protein is digested with the recombinant SUMO hydrolase and BNIP3 is isolated with Streptactin affinity and ion-exchange chromatographies. Following this protocol several milligrams of <sup>15</sup>N-labeled BNIP3 was isolated. The protein was solubilized in aqueous solution of DPC micelles prepared with protein/detergent molar ratio of 1:30. Preliminary <sup>15</sup>N-HSQC spectrum was acquired at 40°C using 0.4 mM samples of BNIP3 built in DPC micelles dissolved in solution (pH 5.0) containing 20 mM deuterated sodium acetate, 0.15 μM sodium azide, 1 mM EDTA and 5% D<sub>2</sub>O. In this NMR spectrum 70% of HN-N cross-peaks were observed.

## АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ИОНОВ И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

*Радциг М.А., Хмель И.А.*

Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия  
E-mail: radzig@yandex.ru  
Факс: (499) 196-02-21; тел.: (499) 196-00-16

Антимикробная активность соединений серебра известна и используется для борьбы с патогенными микроорганизмами очень давно. В настоящее время интерес к использованию серебра, и особенно в форме наночастиц (НЧС), обусловлен широким распространением форм патогенных бактерий, резистентных к антибиотикам. Объектом данных исследований были ионы серебра (в составе нитрата серебра) и стабилизированные НЧС размером 5 нм. Определены минимальные ингибирующие концентрации этих соединений для грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* K12, *Serratia proteamaculans* 94 и *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 и грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*. Исследовано действие ионов серебра и НЧС на формирование биопленок грамотрицательными бактериями, а также влияние НЧС на дисперсию уже образованных биопленок. Не наблюдалось различий в чувствительности к ионам серебра и НЧС у штаммов *E. coli* дикого типа и штаммов, дефектных по эксцизионной репарации (*uvrA*, *uvrB* мутанты), SOS-репарации и рекомбинации (*recA*, *lexA*, *recBC*, *recF*, *umuC* мутанты). Это позволяет предположить, что их антибактериальное действие не связано со значительными повреждениями ДНК, которые могут быть восстановлены при участии известных репаративных систем клетки. Мутантные штаммы *E. coli*, лишенные поринов OmpF или OmpC, были в 3-4 раза более устойчивыми к ионам и наночастицам серебра по сравнению со штаммом дикого типа, что свидетельствует об участии поринов в транспорте соединений серебра в клетки бактерий. Показано, что Quorum Sensing системы не участвуют в регуляции чувствительности *Pseudomonas* и *Serratia* к ионам серебра и НЧС.

## ANTIBACTERIAL EFFECTS OF SILVER IONS AND SILVER NANOPARTICLES

Radzig M.A., Khmel I.A.

Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow, Russia

E-mail: radzig@yandex.ru

Fax: (499) 196-02-21; tel.: (499) 196-00-16

Antimicrobial activity of silver compounds is well known and used against pathogenic microorganisms long ago. Current interest in using silver, and especially in the form of nanoparticles (SNP), results from a wide spread of pathogenic bacteria resistant to antibiotics. The subjects of our investigations were silver ions (entering into the composition of silver nitrate) and stabilized SNPs of size 5 nm. Minimal inhibiting concentrations of these compounds for gram-negative bacteria *Escherichia coli* K12, *Serratia proteamaculans* 94, and *Pseudomonas aeruginosa* PAOI, and for gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* were determined. Action of silver ions and SNPs on the biofilm formation by gram-negative bacteria has been investigated along with the SNP action on dispersion of already formed biofilms. Wild-type *E. coli* strains and the strains deficient in excision repair (*uvrA*, *uvrB* mutants), SOS-repair or recombination (*recA*, *lexA*, *recBC*, *recF*, *umuC* mutants) did not differ in their sensitivity to silver. This implies that the bacteria sensitivity to silver does not depend on DNA lesions which could be restored with the assistance of known cell's repair and recombination systems. *E. coli* mutant strains deficient in *OmpF* or *OmpC* porins were 3-4-fold more resistant to silver ions and SNPs when compared to the wild-type strains; it indicates that porins take part in transport of silver compounds into bacteria cells. We showed that Quorum Sensing systems have not taken part in the control of sensitivity / resistance of *Pseudomonas* and *Serratia* to silver compounds.

## НОВЫЙ БЕЛОК ОБОНЯТЕЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ КРЫСЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЙСЯ В ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

Радченко В.В., Ильницкая Е.В., Третьяков В.Е. \*, Сторожева З.И. \*\*, Шубаева Т.М., Липкин В.М.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: radchenko@mail.ibch.ru

\*НИИ физико-химической медицины МЗСР РФ, Москва, Россия

\*\*Институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН, Москва, Россия

При ПААГ-анализе белкового экстракта респираторного эпителия крыс нами было установлено, что у животных с искусственно вызванными нейродегенеративными изменениями наблюдается значительное увеличение полосы белка с кажущейся электрофоретической подвижностью ~43 кДа. Природный белок был выделен и определена его молекулярная масса – 42986 Да. Определение N-концевой последовательности белка по методу Эдмана позволило установить 11 аминокислотных остатков: YQLMCYUYSWA. При MALDI-TOF-анализе триптического гидролизата было идентифицировано 14 пептидов, практически перекрывающих последовательность белка. Расчетная молекулярная масса белка, состоящего из 380 а.о., составляла 42949,29 Да, расчетная изоэлектрическая точка – 5,36.

Наиболее близкой по структуре к обнаруженному белку является последовательность гипотетического белка chitinase 3-like protein 3 precursor (Secretory protein YM-1, NCBI: LOCUS XP\_227567), включающая 424 а.о. Белок YM-1 относится к семейству 18 гликогидролаз (хитиназоподобных белков CLPs), однако, большинство представителей этого семейства не обладают ферментативной активностью, но способны связываться с карбогидратными полимерами и распознавать микроорганизмы, содержащие хитин в клеточной стенке. Ранее было доказано, что развитие многих видов Т-хелпер-2-зависимых воспалительных и аллергических заболеваний, происходящих с опосредованным участием П-4 или П-13, связано с накоплением в слизистых оболочках тех или иных представителей CLPs (в том числе и YM-1).

Получена конструкция, которая обеспечивает продукцию рекомбинантного аналога YM-1 в клетках *E.coli*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" (грант № 200101).



## NOVEL PROTEIN FROM RAT OLFACTORY EPITHELIUM EXPRESSING IN PATHOPHYSIOLOGICAL CONDITIONS

*Radchenko V.V., Ilnitskaya E.V., Tretyakov V.E. \*, Storozheva Z.I. \*\*, Shuvaeva T.M., Lipkin V.M.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: radchenko@mail.ibch.ru

Fax: (495) 335-71-03

\*Research Institute of Physicochemical Medicine, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Moscow, Russia

\*\*Anokhin Institute of Normal Physiology RAMS, Moscow, Russia

Upon SDS-PAGE analysis of rat olfactory epithelium protein extract we have established that in the animals with artificially induced neurodegenerative changes considerable increase of protein band with molecular mass ~43 kDa have been observed. Natural protein was separated and its molecular mass was fixed as 42986 Da. The N-terminal protein sequence determination using Edman degradation allowed to establish 11 amino acid residues: YQLMCYYTSPA. MALDI-TOF-analysis of tryptic hydrolyzate identified 14 peptides almost overlapped protein sequence. Calculated molecular mass of the protein, consisted of 380 amino acid residues was 42949,29 Da, Ip – 5,36.

Most close to found protein in structure the sequence is of the hypothetical protein Chitinase 3-like protein 3 precursor (Secretory protein YM-1, NCBI: LOCUS XP\_227567), including 391 amino acid residues. Protein YM-1 belongs to the family 18 of glycohydrolase (chitinase-like proteins, CLPs), however almost all members of this family have no demonstrated enzyme activity, but they are able to bind to carbohydrate polymers and to recognize microorganisms that bear chitin molecules on their cell walls. Earlier, it was proved that the development of many T-helper 2-dependent inflammatory and allergic diseases, induced by Il-4 or Il-13, is associated with accumulation of CLPs (including YM-1) in mucus epithelium.

The construction providing the production of recombinant YM-1 in *E. coli* cells was designed.

This work was supported by the grant Molecular and Cellular Biology (N 200101).

## СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕИНАЗ ИЗ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ И КОДИРУЮЩИЕ ИХ ГЕНЫ

*Резина Т.А., Кладницкая Г.В., Гвоздева Е.Л., Парфенов И.А., Валуева Т.А.*

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

E-mail: valueva@inbi.ras.ru

Факс: (495) 954-27-32; тел.: (495) 952-13-84

Ингибиторы протеиназ типа Кунитца из клубней картофеля относят к суперсемейству соевого ингибитора трипсина Кунитца, включающему растительные ингибиторы протеиназ, встречающиеся в семенах и запасующих органах растений различных систематических групп, и выделяют в подсемейство, обозначенное как РКРІ (potato Kunitz-type protease inhibitors). На основании структуры N-концевых аминокислотных последовательностей среди белков РКРІ выделяют три структурные группы: РКРІ-А, РКРІ-В и РКРІ-С.

Из клубней картофеля сорта Истринский были выделены два белка ингибитора с молекулярными массами 21 и 22 кДа, обозначенные РКSI (potato Kunitz-type subtilisin inhibitor) и РКТИ-22 (potato Kunitz-type trypsin inhibitor), соответственно. Белок РКSI эффективно подавлял активность субтилизина Карлсберг ( $K_i = 1,67$  нМ), но не действовал на трипсин, химотрипсин и цистеиновую протеиназу – папаин. Белок РКТИ-22 проявлял себя как эффективный ингибитор трипсина ( $K_i = 2,06$  нМ), слабо действовал на химотрипсин и не подавлял активность субтилизина Карлсберг. Кроме того, белок РКТИ-22 не только подавлял прорастание гиф, но и ускорял разрушение макроконидий гриба *Fusarium culmorum*.

Определены N-концевые аминокислотные последовательности обоих белков-ингибиторов, содержащие 19(20) аминокислотных остатков. Их анализ позволил предположить, что белок РКSI кодируется геном *PKPI-C2*, а РКТИ-22 – геном *PKPI-B10*. В результате гетерологичной экспрессии генов *PKPI-C2* и *PKPI-B10* в клетках *Escherichia coli* были получены и очищены до гомогенности рекомбинантные белки РКРІ-С2 и РКРІ-В10. Анализ структуры и свойств этих белков показал, что первый из них идентичен белку РКSI, а второй – РКТИ-22. Эти данные подтверждают предположение о том, что гены *PKPI-C2* и *PKPI-B10* активируются при созревании клубней картофеля. Возможно, белки, кодируемые этими генами, включены в систему защиты растения картофеля от поражения фитопатогенными микроорганизмами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 07-04-00254).

## SPECIFIC PROTEASE INHIBITORS FROM POTATO TUBERS AND THEIR GENES

*Revina T.A., Kladnitskaya G.V., Gvozdeva E.L., Parfenov I.A., Valueva T.A.*

Bach Institute of Biochemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: valueva@inbi.ras.ru

Fax: (495) 954-27-32; tel.: (495) 952-13-84

Some inhibitors from potato tubers are believed to be members of the Kunitz-type soybean trypsin inhibitor super family on the basis of their primary structures. The plant proteins, members of this super family were found in seeds and storage organs of different systematic group plants. Potato inhibitors are combined into a subfamily denoted as PKPI (potato Kunitz-type protease inhibitors). The proteins of the PKPI family can be classified into three structural groups, namely, PKPI-A, PKPI-B and PKPI-C, on the basis of the homology of their N-terminal amino acid sequences.

Two protein inhibitors have been isolated from potato tubers (*Solanum tuberosum* L. cv. Istrinskii). One of them denoted as PKSI (potato Kunitz-type subtilisin inhibitor) tightly inhibited subtilisin Karlsberg ( $K_i = 1,67$  нМ), whereas it did not interact with trypsin, chymotrypsin and papain (plant cysteine protease). The second protein denoted as PKTI-22 (potato Kunitz-type trypsin inhibitor) tightly inhibited trypsin ( $K_i = 2,06$  нМ), whereas its interaction with chymotrypsin is substantially weaker. The PKTI-22 did not act on subtilisin. Besides, PKTI-22 suppressed the mycelium grown of fungi *Fusarium culmorum*. It induced the destruction of fungal macroconidia.

N-Terminal amino acid sequences consisted 19 or 20 residues of both proteins were been determined. Analysis of these sequences was shown that PKSI and PKTI-22 are very likely encoded by *PKPI-C2* and *PKPI-B10* genes respectively. The recombinant proteins have been obtained by heterologous expression of genes *PKPI-C2* and *PKPI-B10* in *Escherichia coli*. They were been purified additionally. The analysis of their structures and properties is shown that the recombinant protein PKPI-C2 is identical to PKSI, but the protein PKPI-B10 – PKTI-22. Our results suggest that genes *PKPI-C2* and *PKPI-B10* are activated during potato tuber maturing. Perhaps proteins encoded by these genes are involved in the protection of potato plants from phytopathogenic microorganisms.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project no. 07-04-00254).

## ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛОПОДОБНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ К ГАПОНИНУ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

*Родионова А.С., Радченко В.В., Костянян И.А., Сурина Е.А., Липкин В.М.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: radchenko@mail.ibch.ru

В клетках линии HL-60 нами был обнаружен новый белок гапонин, имеющий, как оказалось, значительную структурную гомологию с эукариотическим фактором инициации трансляции eIF1A (82,9%). В настоящее время проводятся интенсивные структурно-функциональные исследования этого белка. Для выяснения тканевой и внутриклеточной локализаций гапонина необходимо наличие высокоспецифичных антител. Однако, значительная гомология гапонина и eIF1A делает малоэффективным использование поликлональных антител, а получение специфических моноклональных – сложный, длительный и дорогостоящий процесс.

Нами применен современный подход, заключающийся в том, что на базе аминокислотной последовательности варибельной части антител австралийской ковровой акулы были сконструированы антителоподобные рекомбинантные белки (АПРБ), способные специфически взаимодействовать со строго определённым участком последовательности гапонина. В качестве модельной антигенной детерминанты выбран иммуногенный участок последовательности гапонина  $^{43}\text{TAQGQRF}^{49}$ . Математические расчёты позволили получить несколько вариантов аминокислотной последовательности гиперварибельных участков (CDR – complementarity determining regions) варибельной области АПРБ, формирующих антигенсвязывающий центр. В прокариотической системе экспрессии получены два варианта химерных АПРБ, состоящие из последовательно соединённых: варибельной части антител акулы с рассчитанными CDR, димеризующего пептида, последовательности GFP и К1-пептида, обеспечивающего кальциевую преципитацию АПРБ. Специфичное взаимодействие обоих АПРБ с природным и рекомбинантным гапонинами крысы и человека было исследовано в экспериментах с использованием дот-блота, Вестерн-блота и ELISA.

Работа поддержана грантом Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" (№ 200101).

## GENERATION OF THE RECOMBINANT ANTIBODY LIKE PROTEINS TO THE MAMMALIAN HAPONIN

*Rodionova A.S., Radchenko V.V., Kostanyan I.A., Surina E.A., Lipkin V.M.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: radchenko@mail.ibch.ru

Fax: (495) 335-71-03

In the HL-60 cells, we have found a new protein haponin. It turns out that haponin has a significant structural homology with the eukaryotic translation initiation factor eIF1A (82,9%). At present, the intensive structural-functional investigations of this protein are being carried out. To elucidate tissue and intracellular localization of haponin the availability is necessary of the high-specific antibodies. However the essential homology of the haponin with eIF1A makes inefficient the using of the polyclonal antibodies, but obtaining of the specific monoclonal antibodies is complex, long-term and expensive.

We have used a modern approach consisting in designing of the recombinant antibody like proteins (RALP) on the base of the amino acid sequence of the Australian carpet shark antibodies variable region. RALP are able to bind specifically to strongly defined sequence region of the haponin. Immunogenic region <sup>43</sup>TAQGQR<sup>49</sup> of the haponin sequence was chosen as a model antigenic determinant. Mathematical calculations allowed obtaining several variants of the amino acid sequences of complementarity determining regions (CDR) of the variable region of the RALP, which form antigen-binding site. In prokariotic expression system, two variants of the chimeric RALP were designed consisting of connected in series the shark antibodies variable region with calculated CDR, dimeric peptide, GFP sequence and KI-peptide providing Ca-precipitation of the RALP. Specific binding of both of the RALP to natural and recombinant rat and human haponin was investigated with dot-blot, Western-blot and ELISA.

This work was supported by the grant of Presidium of RAS "Molecular and Cellular Biology" (N 200101).

## РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БОТУЛИНИЧЕСКИХ ТОКСИНОВ ТИПОВ А, В, Е И F НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

*Аббасова С.Г., Руденко Н.В., Шувалова О.П., Виноградова И.И. \*,  
Вертиев Ю.В. \*, [Несмеянов В.А.]\*\*, Гришин Е.В. \*\**

Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия  
\*НИИ микробиологии и эпидемиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва, Россия

\*\*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: svetlanaabbasova@rambler.ru

Ботулизм – заболевание, вызываемое самыми токсичными из всех известных веществ, ботулиническими нейротоксинами. Ботулинические нейротоксины секретируются спорообразующими облигатными анаэробными микроорганизмами *Clostridium botulinum*. Заболевания людей ботулизмом могут быть вызваны пищевыми отравлениями, попаданием инфекции в организм через поврежденные кожные покровы (травматический ботулизм), известны также случаи младенческого ботулизма. Ботулинические нейротоксины в связи с их экстремальной токсичностью квалифицируются как агенты биотеррористической угрозы первостепенной опасности наряду с сибирской язвой, чумой, вирусными геморрагическими лихорадками и др. Угроза биотерроризма стала особенно актуальной в последние годы, достаточно вспомнить о попытке применения данных токсинов для массового отравления японской сектой Aum Shinrikyo.

Ботулинические нейротоксины серологически подразделяются на группы А, В, С, D, Е, F и G, для человека угрозу представляют токсины серотипов А, В, Е и F. Пищевые отравления наиболее часто связаны с серотипами А и В. Ботулинические нейротоксины образуют стабильные комплексы с другими белками (в основном, гемоглобинами), с которыми они связаны нековалентными связями. Комплексообразование защищает ботулотоксины от агрессивной среды желудка при пищевой интоксикации и увеличивает их время жизни в кровотоке, а возможно, и усиливает сродство к пресинаптическим мембранам нейронов, тем самым значительно снижая летальную дозу токсина при оральном и парентеральном способах введения.

Проблема разработки высокочувствительных экспресс-методов диагностики ботулинических токсинов остается актуальной в настоящее время. Нами получена и охарактеризована панель моноклональных антител против ботулинических нейротоксинов типов А, В, Е и F, способных специфично взаимодействовать с соответствующими токсинами в составе токсических комплексов. На основе полученных антител разработаны тест-системы для детекции ботулинических токсинов в варианте "сэндвич"-ИФА с пределом детекции около 1 нг/мл. Показано, что полученные моноклональные антитела могут также применяться для одновременного анализа нескольких токсинов в формате биологических микрочипов.

## DEVELOPMENT OF A MONOCLONAL ANTIBODY-BASED TEST SYSTEM FOR THE DETECTION OF BOTULIN TOXINS TYPE A, B, E, AND F

Abbasova S.G., Rudenko N.V., Shuvalova O.P., Vinogradova I.I. \*, Vertiev Yu.V. \*, Nesmeyanov V.A.\*\*\*, Grishin E.V.\*\*

Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino, Russia

\*Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology RAMS, Moscow, Russia

\*\*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: svetlanaabbasova@rambler.ru

Botulism is a disease caused by one of the most toxic known substances - botulin neurotoxins. The neurotoxins are secreted by the microorganism *Clostridium botulinum*, an obligate anaerobic, Gram positive, spore-forming bacteria. The disease in human can be: food borne; induced by trauma when a wound is infected with *C. botulinum*; or, can occur in infants because of ingesting the spores. The neurotoxins owing to their extreme toxicity are classified as a top-rank bioterrorist threat, along with such agents as anthrax, plague, viral haemorrhagic fevers, and some others. A bioterrorism attack has become a real threat these days, as exemplified by a recent attempt of mass poisoning with the botulism neurotoxins by the Japanese Aum Shinrikyo sect.

There are seven serologically distinct toxin types, A, B, C, D, E, F, and G, of which only types A, B, E, and F are dangerous to humans. Food borne poisoning is most often caused by the botulin neurotoxins A and B. The neurotoxins form stable non-covalent complexes with other proteins, mostly hemagglutinins. The formation of such complexes protects the toxins from aggressive milieu of the digestive system and extends their blood circulation time, and possibly increases their affinity toward post-synaptic neuron membranes thus significantly diminishing the oral and parenteral lethal doses of the toxins.

The highly sensitive detection of the botulin toxins remains a challenging task. We have obtained and characterized a panel of monoclonal antibodies against the neurotoxins type A, B, E, and F, which are capable of specific interactions with each of these toxins in the toxic complexes. Test systems based upon these antibodies have been developed that detect botulin toxins employing sandwich ELISA with the detection limit about 1 ng/ml. The monoclonal antibodies are shown to be also suitable for simultaneous detection of several toxins in bio-microchip format assays.

## ОПТИМИЗАЦИЯ СИНТЕЗА *HBsAg* В КЛЕТКАХ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Рукавицова Е.Б., Чеботарева Е.Н., Бурьянов Я.И.

Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия  
E-mail: ruk@fibkh.serpukhov.su

Трансгенные растения являются перспективными объектами для получения дешевых и безопасных вакцин по сравнению с их традиционными источниками. Растения как потенциальные продуценты вакцин имеют преимущество перед бактериями, не имеющими систем эукариотической постсинтетической модификации белков. Экспрессия генов таких белков в растениях позволяет осуществить в растительной клетке полноценный синтез целевых антигенов, способных вызывать активный иммунный ответ.

С целью максимальной экспрессии гена поверхностного антигена вируса гепатита В (*HBsAg*) проведено изменение его первичной структуры с учетом частоты встречаемости кодонов в генах растений. Синтезированный ген *HBsAg* встроен под контроль сильного промотора с двойным энхансером 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (CaMV 35S). Генетические конструкции перенесены в штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (рМР90RK) методом прямой трансформации. Эти штаммы использовали для заражения листовых эксплантов табака. Регенеранты трансгенных растений будут подвергнуты в дальнейшем молекулярно-биологическому и биохимическому анализам.

Созданы генетические конструкции, содержащие ген *HBsAg* под контролем промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (CaMV 35S) с несколькими энхансерами, что должно многократно увеличить синтез рекомбинантного белка *HBsAg* в клетках трансгенных растений по сравнению с ранее использованными конструкциями.

Для получения безмаркерных трансгенных растений, экспрессирующих ген поверхностного антигена вируса гепатита В (*HBsAg*) без дополнительных селективных генов или генов-репортеров, получен рекомбинантный вектор рВМ без таких маркерных генов и в нем клонирован ген *HBsAg*. Для отбора трансгенных растений с геном *HBsAg* применяли метод иммуоферментного анализа. Получено 15 линий трансгенных растений табака и 10 линий томата без селективных маркеров, синтезирующих антиген на уровне 0.01-0.05% от общего растворимого белка. Разработанный метод отбора безмаркерных трансформантов может использоваться в общей стратегии получения безопасных растений без селективных маркеров.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантами РФФИ № 08-08-00328 и 08-08-90014.



## OPTIMIZATION OF *HBsAg* SYNTHESIS IN TRANSGENIC PLANT CELLS

*Rukavtsova E.B., Chebotareva E.N., Buryanov Ya.I.*

Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,  
Pushchino, Russia

E-mail: ruk@fibkh.serpukhov.su

Transgenic plants are promising for the production of inexpensive and safe vaccines compared to traditional producers. Plant cells have enzymatic systems of post-translational modifications that are required for the assembling of the synthesized monomeric vaccine polymers into immunogenic multimeric forms. Gene expression of such proteins in plants allows the full synthesis of target antigens able to induce an active immune response in a plant cell.

Synthesis of *HBsAg* gene according to frequency of codon usage in plants was carried for enhance of HBs-antigen expression in cells of transgenic plants. The synthesized gene was cloned under the control of strong virus promoter with double enhancer on the base of 35S RNA cauliflower mosaic virus promoter (CaMV 35S). Genetic constructions were transferred into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90RK) strain by a method of direct transformation. Received agrobacterial strains used for infection of leaf explants of tobacco. Obtained regenerants will be subjected to the molecular biological and biochemical analysis.

Genetic constructions with *HBsAg* gene under the control of CaMV 35S promoter with few enhancers were obtained. This should increase the protein synthesis in transgenic cells many times higher in comparison of previously constructed plasmids.

It was constructed the pBM plasmid vector which not contain selective marker genes of antibiotics and herbicides resistance for selection of transgenic plants. The *HBsAg* gene under the control of CaMV 35SS promoter was cloned into this plasmid. ELISA has been applied for screening of transgenic plants with *HBsAg* gene. Such a way we found 15 tobacco and 10 tomato marker-free transgenic lines which synthesized HBsAg at the 0.01-0.05% of total soluble protein. The developed method of transformants selection is the base of general strategy of marker-free plants construction.

This study was supported by Russian Foundation for Basic Research (projects N 08-08-00328 and N 08-08-90014).

## ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДЕФОЛИАНТА ДРОППА НА СИНТЕЗ БЕЛКА В ЖИВОТНЫХ КЛЕТКАХ

*Саитмуратова О.Х., Назаров Т.А.\**

Институт биоорганической химии им. академика А.С. Садыкова, АН РУз,  
Ташкент, Узбекистан

E-mail: ibchem@uzci.net

Web-site: www.Biochem.fam.uz

\*Ташкентский педиатрический медицинский институт, Ташкент,  
Узбекистан

Известно, что ядохимикаты, применяемые в сельском хозяйстве, оказывают воздействие на биохимические процессы в клетках и тканях растений. Эти процессы изучены недостаточно. Среди ядохимикатов дропп является наименее токсичным, применяется в качестве дефолианта хлопчатника средневолокнистых и тонковолокнистых сортов с нормой расхода 0,3-0,7 кг/га.

В настоящей работе изучено влияние дроппа на синтез белка в клетках разных органов крыс. Для эксперимента использовали <sup>14</sup>C дропп с уд. активностью 1μС, который вносили в инкубационную среду. После инкубации меченые белки осаждали, промывали, высушивали и измеряли радиоактивность на β-счетчике. Синтез белка определяли по включению меченых аминокислот в течение 24 и 72 часов после внесения в инкубационную среду препарата. Установлено, что через сутки синтез белка в желудке крыс снижается на 32%, а через 72 часа – на 66% по сравнению с нормой. После 24 часов синтез белка в печени снижается на 14%, через 72 часа – на 45%; в 12-перстной кишке через 24 часа – на 39%, через 72 часа – на 48% по сравнению с контролем. Следовательно, синтез белка наиболее интенсивно происходит в желудке, 12-перстной кишке и печени. Дропп через короткое время выводится из организма.

Таким образом, дропп как и другие ранее проверенные препараты (Харвейд F 25, альфа суми) подавляет синтез общего белка в желудке, 12-перстной кишке и в печени, что подтверждает низкую токсичность данного препарата.



## BIOLOGICAL EFFECT OF DEFOLIANT DROPP ON PROTEIN SYNTHESIS IN CELLS

*Saitmuratova O.H., Nazarov T.N.\**

Sadykov Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan

E-mail: [ibchem@uzci.net](mailto:ibchem@uzci.net)

Web-site: [www.Biochem.fam.uz](http://www.Biochem.fam.uz)

\*Tashkent Pediatric Medicinal Institute, Tashkent, Uzbekistan

It is known that toxins used in agriculture effect the biochemical processes in cells and tissues. These effects are not studied properly. Among the toxins dropp is one of the less toxic and is used as cotton defoliant for average-stapled and fine-stapled species with rate of application of 0.3-0.7 kg/hectare.

In the present paper dropp's effect on protein synthesis in various rat's organs were studied. In our experiments we used  $^{14}\text{C}$  dropp with specific activity  $1\mu\text{Ci}$  and brought it into the incubation medium. After incubation period labeled proteins were precipitated, washed, dried and their radioactivity was measured using  $\beta$ -counter. Protein synthesis was defined by  $^{14}\text{C}$  inclusioned into amino acids during 24 and 72 hours after dropp had been added to medium. We have found that protein synthesis in stomach after 24 hours decreases to 32%, after 72 hours – to 66% in comparison with control experiments. After 24 hours protein synthesis in liver decreases to 14%, and after 72 hours – to 45%. In duodenum protein synthesis decreases to 39% after 24 hours, and to 48% – after 72 hours correspondingly. Protein synthesis is more observed in stomach, duodenum and liver. Dropp is not strongly toxic and after a short period of time excretes from organism.

Thus dropp as some other previously studied toxins (Harvade F 25, alfa sumi) suppress general protein synthesis in stomach, duodenum and liver that proves its low-toxicity.

## ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЙ ЯДА КОБРЫ И ФРАГМЕНТА НЕЙРОПЕПТИДА НА ЯДЕРНЫЙ СИНТЕЗ БЕЛКА

*Саитмуратова О.Х., Сагдиев Н.Ж.*

Институт биоорганической химии им. академика А.С. Садыкова АН РУз, Ташкент, Узбекистан

E-mail: [ibchem@uzci.net](mailto:ibchem@uzci.net)

Web-site: [www.Biochem.fam.uz](http://www.Biochem.fam.uz)

Ранее нами впервые было показано, что в ядрах клеток головного мозга кроликов синтезируются низкомолекулярные гликопротеиды с Мм. 10-15 кДа и 25-30 кДа. Установлено, что эти белки обладают физиологической активностью, в частности, изменяют двигательную активность и поведенческие реакции животных.

Целью нашего исследования было изучение влияние яда кобры и фрагмента нейропептида АКТГ<sub>(4-7)</sub> на биосинтез белка в клеточных ядрах. Яд кобры с ЛД<sub>50</sub> вводили кроликам в ушные вены в концентрации 0,1 мг/кг. Через 15 мин и 18 часов животных декапировали, выделяли ядра из головного мозга, и изучали белоксинтезирующую активность ядер после воздействия яда кобры. Биосинтез белка в ядрах клеток изучали по включению  $^{14}\text{C}$  аминокислот. Показано, что белоксинтезирующая активность ядер уменьшается и достигает 70% через 18 часов после воздействия яда.

Нами также было изучено влияние нейропептида АКТГ<sub>(4-7)</sub> на биосинтез белка в ядрах клеток. Для этого из головного мозга животных были выделены ядра. Чистоту ядер контролировали микроскопически. Ядра суспендировали в 0,25 М растворе фосфатного буфера, рН 7,4 в концентрации 1 мг/мл и далее добавляли АКТГ<sub>(4-7)</sub> в концентрации 5 мкг/мл. Биосинтез контролировали по включению  $^{14}\text{C}$  аминокислот в течение 1 часа. Показано, что нейропептид стимулирует синтез белка на 45%.

Таким образом, нами было установлено, что яд кобры угнетает биосинтез белка в ядрах клеток животных, а нейропептид АКТГ<sub>(4-7)</sub>, наоборот, стимулирует этот процесс.

## ANALYSIS OF EFFECT OF COBRA'S TOXIN AND NEUROPEPTIDE FRAGMENT ON NUCLEUS PROTEIN SYNTHESIS

*Saitmuratova O.H., Sagdiev N.J.*

Sadykov Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan  
E-mail: [ibchem@uzci.net](mailto:ibchem@uzci.net)  
Web-site: [www.Biochem.fam.uz](http://www.Biochem.fam.uz)

Previously we have found that in the nucleus of cerebrum cells low-molecular glycoproteids with molecular masses of 10-15 кДа и 25-30 кДа are synthesized. These proteins showed physiological activity, in particular, they could effect motor activity and behavioral reaction of animals.

The main purpose of the present paper was to study the effects of cobra's toxin and ACTG<sub>(4-7)</sub> neuropeptide's fragment on protein's biosynthesis in nucleus cells. Cobra's toxin of LD<sub>50</sub> was injected into auricular veins of rabbits at concentration of 0,1 mg/kg. After 15 minutes and 18 hours animals were decapitated, nucleuses were extracted from cerebrum and the proteins productivity was measured by registering the inclusion of <sup>14</sup>C into amino acids. It was found that protein synthesis productivity of nucleus cells decreases and reaches 70% after 18 hours of toxin's exposure.

We also studied the effect of ACTG<sub>(4-7)</sub> neuropeptide on protein synthesis productivity in cells' nucleus. By this purpose nucleuses were extracted from cerebrum cells. Purity of nucleuses was monitored visually by microscope. Nucleuses were suspended in 0.25 M phosphate buffer, pH 7.4 to the concentration of 1 mg/ml and then ACTG<sub>(4-7)</sub> at concentration of 5 µg/ml was added. Biosynthesis was checked by inclusion of <sup>14</sup>C during 1 hour. It was shown that neuropeptide stimulates protein synthesis to 45%.

Thus we established that cobra's toxin suppresses protein biosynthesis in cell nucleus of animals, however ACTG<sub>(4-7)</sub> neuropeptide's stimulates the process.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НЕКОТОРЫХ СИСТЕМ ИОННОГО ТРАНСПОРТА НА ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ И ГЕМОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТИ ЛАТАРЦИНА Ltc1

*Самсонова О.В.*\*\*\*, *Арсеньев А.С.*\*, *Кирпичников М.П.*\*\*\*, *Феофанов А.В.*\*\*\*

\*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
\*\*Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия  
E-mail: [olgsamsonova@yandex.ru](mailto:olgsamsonova@yandex.ru)

Латарцины, пептиды, обнаруженные в яде паука *Lachesana tarabaevi*, обладают выраженной антимикробной активностью, но проявляют также цитотоксический и гемолитический эффекты *in vitro*. Проведенные ранее исследования латарцина Ltc1 показали, что основной мишенью действия пептида является плазматическая мембрана клетки. Применение методик оптической микроскопии выявило изменения в морфологии клетки на начальном этапе (блеbbing и увеличение объема) и возрастание проницаемости клеточной мембраны для органических молекул в широком диапазоне молекулярных масс на терминальной стадии воздействия пептида, что является отличительным признаком гибели клетки по типу некроза. Тем не менее, молекулярные механизмы развития цитотоксических процессов под действием Ltc1 требуют более детального исследования.

Взаимодействие Ltc1 с мембраной, приводящее к набуханию клетки, по-видимому, нарушает механизмы поддержания постоянства внутриклеточного объема. В большинстве случаев регуляция объема клетки осуществляется при участии системы транспорта ионов. Нами исследовано влияние ингибиторов различных типов ионной проводимости на цитотоксическое и гемолитическое действие пептида. Обнаружено, что в присутствии 5-нитро-1-(3-фенилпропиламино)бензойной кислоты (блокатора объем-регулируемых анионных каналов) и хинакрин (ингибитора никотинового ацетилхолинового рецептора и фосфолипазы A2) существенно возрастает активность Ltc1 в отношении клеток эритролейкоза человека K562 и эритроцитов человека. Умеренное увеличение гемолитичности наблюдается также при одновременном воздействии пептида и 5-(N-метил-N-изобутил)амилорида, ингибитора Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обменника. Как известно из литературных данных, указанные соединения способны подавлять отдельные механизмы регулируемого уменьшения объема, активируемые при набухании клетки в гипотонической среде или при патологических состояниях, ведущих к некрозу.

Нами показано, что цитотоксичность Ltc1 для клеток K562 зависит от ионного состава среды, а именно, уменьшается в случае замены Na<sup>+</sup>-на K<sup>+</sup>-или Cl<sup>-</sup> на фосфат-ионы. Наиболее выраженное снижение активности наблюдалось в случае почти полного замещения NaCl другими компонентами фосфатно-солевого буферного раствора.

В то же время, не обнаружено влияния на токсичность Ltc1 агентов, изменяющих внутриклеточную концентрацию свободных ионов Ca<sup>2+</sup>, таких

как хелатор  $\text{Ca}^{2+}$  ацетоксиметилловый эфир ВАРТА, блокатор механочувствительных кальциевых каналов  $\text{GdCl}_3$  и АТФ, индуцирующий кратковременное повышение цитоплазматической концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . Ингибирование клеточных путей синтеза АТФ также не оказывает существенного влияния на уровень токсичности Ltc1 для клеток K562.

Таким образом, мембранная активность Ltc1 не является АТФ-зависимой и не регулируется внутриклеточным уровнем ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , что позволяет практически исключить участие механизмов активного транспорта или сигнальных каскадов. Мы предполагаем, что Ltc1 действует как прямой литический фактор, пермеабилуя мембрану эукариотической клетки для неорганических ионов. При низких концентрациях Ltc1 в клетке активируются регуляторные процессы, направленные на компенсацию дестабилизирующего воздействия пептида. В качестве вероятного ключевого аспекта цитолитического механизма рассматривается дисбаланс анионов  $\text{Cl}^-$  между цитоплазмой клетки и внеклеточной средой.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 07-04-01166).

## STUDY OF THE ROLE OF SOME ION TRANSPORT SYSTEMS IN THE LATARCIN Ltc1 CYTOTOXIC AND HAEMOLYTIC ACTIVITIES

*Samsonova O.V.*\*\*\*, *Arseniev A.S.*\*, *Kirpichnikov M.P.*\*\*\*, *Feofanov A.V.*\*\*\*

\*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

\*\*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

E-mail: olgsamsonova@yandex.ru

Latarcins, the peptides discovered in the spider *Lachesana tarabaevi* venom, have pronounced antimicrobial activity but produce also cytotoxic and haemolytic effects *in vitro*. Earlier research revealed that plasma membrane is the main target of the latarcin Ltc1 action. Using optical microscopy methods, cellular morphology was found to change since the very initial stage of the peptide-cell interaction. Morphology changes included membrane blebbing and an increase in volume. At the terminal stage of peptide-cell interaction the plasma membrane became permeable for large molecules. These features are hallmarks of the cell death by necrosis. However, molecular mechanisms underlying the Ltc1-induced cytotoxic process needs further investigation.

Ltc1 induced cell swelling impairs presumably the mechanisms that maintain a constant cell volume. Generally, cell volume regulation is controlled by the ion transport system. Accordingly, we have studied how peptide cytotoxic and haemolytic action was affected by some inhibitors of ion conductivity. It was found that 5-nitro-1-(3-phenylpropylamino)benzoic acid (volume-regulated anion channels blocker) and quinacrine (inhibitor of nicotinic acetylcholine receptor and phospholipase A2) enhance significantly Ltc1 activity towards human erythroleukemia cells K562 and erythrocytes. A moderate increase in haemolytic power of the peptide was observed in the presence of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger inhibitor 5-(N-methyl-N-isobutyl)amiloride. The studied inhibitors of ion conductivity are known to suppress certain mechanisms of regulatory volume decrease that are activated at cell swelling under hypotonic conditions or at pathologies followed by necrosis.

We revealed that Ltc1 cytotoxicity for K562 cells depends on the medium ion composition. Thus,  $\text{Na}^+$  by  $\text{K}^+$  or  $\text{Cl}^-$  by phosphate replacement increases cell surviving. A decrease in Ltc1 activity was maximal when NaCl was replaced almost totally by other components of phosphate buffered saline.

At the same time the agents that affect intracellular concentration of free  $\text{Ca}^{2+}$ , *viz.*  $\text{Ca}^{2+}$  chelator BAPTA acetoxymethyl ether, mechanosensitive calcium channel blocker  $\text{GdCl}_3$  or ATP, inducing transient increase of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ , did not alter Ltc1 activity. Inhibition of ATP synthesis also did not influence significantly to the peptide toxicity for K562 cells.

In conclusion, Ltc1 membrane activity is neither ATP-dependent nor governed by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  level, thus prompting us to conclude that the active transport systems or signal cascades don't play any meaningful role in the peptide-induced cell killing mechanism. We suggest that Ltc1 acts as a direct lytic factor permeabilizing the eukaryotic cell membrane for the inorganic ions. At low concentrations of Ltc1, regulatory processes are stimulated in a cell in order to compensate destabilizing action of the peptide. Anionic imbalance of intracellular and extracellular media, in particular, imbalance of  $\text{Cl}^-$ , is considered to be the most probable key force of the latarcin-induced cytolysis.

The work was supported by RFFI (grant N 07-04-01166).

## ЭФФЕКТЫ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ПУЛА БТШ70 В ПОПУЛЯЦИЯХ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК

Сапожников А.М., Алекперов Э.А., Бойко А.А., Луцан Н.И., Клиникова А.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: amsap@ibch.ru

В последние годы в литературе появились сведения о существовании в сыворотке крови человека и животных циркулирующего внеклеточного пула БТШ70 эндогенного происхождения. Было продемонстрировано, что экзогенные БТШ70 взаимодействуют с антигенпредставляющими клетками, Т-лимфоцитами, НК-клетками и с системой комплемента. Появление в организме внеклеточных БТШ70 рассматривается рядом авторов как "сигнал тревоги" для иммунной системы. Эти данные дают основание для предположения о вовлеченности сывороточных циркулирующих БТШ70 в систему иммунорегуляции. Однако, механизмы влияния внеклеточных БТШ70 на иммунную систему остаются во многом неизученными. Не идентифицирован также источник присутствующего в организме сывороточного пула данных протеинов. В то же время, в опытах *in vitro* было продемонстрировано, что способностью к секреции БТШ70 в окружающую среду обладают разные типы клеток, в том числе клетки иммунной системы. Данная работа посвящена изучению феномена секреции БТШ70 в популяциях лимфоцитов и анализу взаимодействия внеклеточного пула БТШ70 с различными типами лимфоидных клеток.

В экспериментах использовали клетки, выделенные из различных лимфоидных органов мышей, и линии опухолевых клеток. Анализ уровня экспрессии поверхностных и внутриклеточных протеинов, оценку взаимодействия экзогенных БТШ70 с клетками-мишенями, а также измерение процентного содержания апоптозных клеток в клеточных культурах проводили с помощью методов проточной цитофлуориметрии и сканирующей конфокальной микроскопии. Аффинное выделение БТШ70 проводили на колонке с АТФ-агарозой. В экспериментах по изучению взаимодействия экзогенного пула БТШ70 с клетками использовали биотинилированную форму рекомбинантного БТШ70 человека. Для изучения феномена секреции БТШ70 лимфоидными клетками применяли Вестерн-блот и иммуноферментный анализ.

Результаты проведенных экспериментов продемонстрировали, что сообщества лимфоидных клеток, культивируемые *in vitro*, характеризуются присутствием в межклеточном пространстве растворимой формы БТШ70. Очевидно, что молекулы внеклеточного пула БТШ70 выполняют определенные функции, связанные, в частности, с взаимодействием с клетками-мишенями. Мы провели исследование взаимодействия экзогенных БТШ70 с лимфоидными клетками разных типов. Было обнаружено, что биотинилированные БТШ70 выявляются во внутриклеточном пространстве всех протестированных разновидностей клеток, что свидетельствует об

интернализации данными клетками экзогенных БТШ70. В отдельной серии экспериментов было продемонстрировано, что преинкубация лимфоидных клеток с экзогенными БТШ70 повышает устойчивость клеточной культуры к действию индукторов апоптоза.

Таким образом, наши результаты свидетельствуют о том, что в различных популяциях лимфоцитов происходит формирование внеклеточного пула БТШ70. Это позволяет рассматривать лимфоидные клетки как один из источников сывороточных БТШ70, циркулирующих в организме. Внеклеточные БТШ70 интернализируются лимфоцитами различной органной локализации, что приводит, в частности, к увеличению резистентности клеток к факторам, индуцирующим апоптоз. Полученные данные указывают на то, что иммуномодулирующие функции внеклеточных БТШ70 связаны не только с активацией антигенпредставляющих клеток, но и с влиянием этих протеинов на Т-клеточное звено иммунной системы.

## EFFECTS OF EXTRACELLULAR POOL OF HSP70 IN POPULATIONS OF LYMPHOID CELLS

*Sapozhnikov A.M., Alekperov E.A., Boyko A.A., Lutsan N.I., Klinkova A.V.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia

E-mail: amsap@ibch.ru

The data demonstrating presence of extracellular circulating pool of endogenous Hsp70 in human and animal blood serum was published in literature during several past years. It was also shown that extracellular Hsp70 interact with antigen-presenting cells, T lymphocytes, NK cells, and with complement system. Presence of extracellular Hsp70 in organism is considered by a number of authors as a "danger signal" for immune system. Thus, existing data suggest involvement of circulating serum Hsp70 in immunoregulation. However, the mechanisms of Hsp70 influence on immune system remain unstudied in many respects. The source of serum extracellular Hsp70 also was not yet identified. At the same time, in experiments *in vitro* it was demonstrated that exocytosis of Hsp70 resided different types of cells including immunocompetent cells. The goal of this work was study of phenomenon of Hsp70 secretion in population of lymphocytes and analyses of interaction of extracellular pool of the protein with different types of lymphoid cells.

Tumor cell lines and cells isolated from different mouse lymphoid organs were used for the experiments. Flow cytofluorimetry and laser confocal microscopy were used for analysis of surface and intracellular protein expression, evaluation of interaction of exogenous Hsp70 with target cells, detection of apoptosis in lymphoid cell cultures. Isolation and purification of Hsp70 was performed by affine chromatography using ATP-agarose. Determination of exogenous Hsp70 adsorption and internalization in cell populations was carried out by using biotinilated recombinant human Hsp70. Western-blot and immune-enzyme analysis was used to study phenomenon of Hsp70 secretion in lymphoid cell cultures.

Obtained results demonstrated that formation of extracellular pool of Hsp70 in the cell cultures *in vitro* was the feature of all tested types of lymphocytes. This fact suggests that extracellular molecules of the protein have certain functions connected, in particular, apparently with interaction with target cells. Therefore we analyzed adsorption of exogenous Hsp70 by different lymphoid cell types. It was revealed that biotinilated Hsp70 penetrated to intracellular space of all tested types of lymphocytes, that was evidence of internalization of the protein by the cells. In an additional series of experiments it was demonstrated that preincubation of lymphoid cells with exogenous Hsp70 resulted in essential increase of the cell culture resistance to inductors of apoptosis.

Thus, our results show that in different population of lymphocytes the formation of extracellular pool of Hsp70 takes place. This fact allows to consider lymphoid cells as a source of serum Hsp70 circulating in organism. Lymphocytes of different origin are able to internalize extracellular Hsp70, and this internalization results in increase of cell resistance to apoptogenic factors. Our data suggest that immunomodulating effects of extracellular Hsp70 are mediated not only by interaction of the protein with antigen-presenting cells but also by influence on T cell populations.

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ ЭПИТОПОВ ДЕСМОГЛЕИНА 3 ЧЕЛОВЕКА

*Свирицкая Е.В., Лысенко А.А., Дементьева Д.В., Прохоров А.В.*

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

E-mail: esvir@mx.ibch.ru

Пузырчатка является аутоиммунным заболеванием, которое вызывается формированием аутоантител к молекулам адгезии кератиноцитов кожи и слизистых оболочек десмоглеинам (ДСГ) 1 и 3. Различают вульгарную и листовидную формы пузырчатки, при которых в сыворотках крови больных выявляют антитела к ДСГ3 либо ДСГ1, соответственно. Известно, что патогенные антитела распознают конформационные эпитопы в первом дистальном домене, структура которых зависит от присутствия ионов кальция. ДСГ1 и ДСГ3 имеют 78% гомологии, что позволяет методом выравнивания идентифицировать негомологичные участки белков.

Целью работы являлась идентификация негомологичных участков белков ДСГ1 и ДСГ3, конструирование конформационных негомологичных эпитопов методами молекулярного моделирования и верификация их патогенности *in vitro*. Для построения пространственной структуры гомодимера, образованного N-концевыми доменами ДСГ3 человека, использовали данные кристаллографического анализа Е-кадгерина человека (50% гомологии в первых доменах). Модель была построена с помощью открытого сервера Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>). В первом домене ДСГ3 выявили четыре линейных негомологичных участка. Для формирования конформационного В-клеточного эпитопа требуется три сближенных в пространстве участка в антигене, соответствующие каждому из гипервариабельных участков IgG. Исходя из этого и на основе пространственной модели ДСГ3, нами были отобраны два линейных участка, которые потенциально могут входить в состав негомологичных конформационных эпитопов. Линейный эпитоп 25-34 находится на верхушке первого домена и входит в состав альфа-спирали, а эпитоп 83-98 формирует протяженный участок, часть из которого также экспонирована на верхушке домена в петле между  $\beta$ -тяжами F и G, а второй участок занимает боковое положение и находится в самом  $\beta$ -тяже G. Поскольку эпитоп 83-98 явно формирует два различных по свойствам участка, пространственно удаленных, то мы разделили его на два пептида. Все три пептида 25-34, 78-90 и 89-98 были синтезированы, и к ним были получены кроличьи антисыворотки. Для проверки патогенного действия антисывороток использовали линию кератиноцитов человека HaCaT. Клетки инкубировали на покровных стеклах до достижения конфлюэнтного монослоя. Сыворотку против пептидов (10% о/о) добавляли и оставляли на 48 ч. Оценивали экспрессию десмоглеина 3 на поверхности клеток методом конфокальной микроскопии с помощью моноклонального антитела к ДСГ3. Показали, что антитела к пептидам 25-34 и 78-90 вызывают за 48 ч полное истощение ДСГ3 из десмосом, а антитела к пептиду 89-98 лишь снижают его экспрессию. В качестве контроля использовали сыворотки больных вульгарной пузырчаткой, которые также вызывали истощение ДСГ3 из десмосом. Таким образом, методом молекулярного моделирования идентифицировано два патогенных эпитопа на молекуле ДСГ3 человека и показано, что они локализируются на верхушке первого домена. Исходя из имеющихся литературных данных по механизмам формирования димеров ДСГ3, можно предположить, что связывание аутоантител с эпитопами 25-34 и 83-90 препятствует переходу цис-димеров ДСГ3 в транс-димеры.



## IDENTIFICATION OF HUMAN DESMOGLEIN 3 PATHOGENIC EPITOPES

*Svirshchevskaya E.V., Lysenko A.A., Dementyeva D.V., Prokhorov A.V.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: esvir@mx.ibch.ru

Pemphigus is an autoimmune disease induced by the formation of autoantibodies to desmogleins (DSG) 1 and 3, adhesion molecules of keratinocytes and mucous membranes. There are two major forms of pemphigus: vulgaris and foliaceus, at which antibodies to DSG 3 and 1 accordingly are developed. Pathogenic antibodies recognize conformational epitopes located in the first distal domain. Their structure depends on the presence of calcium ions. DSG 1 and 3 demonstrate 78% homology however pemphigus vulgaris (PV) sera do not cross-recognize DSG1. Protein alignment permits identification of non-homologous regions which potentially form pathogenic epitopes of DSG3 recognized by PV sera. The aim of this work was to identify non-homologous regions of DSG1 and DSG3, construct conformational epitopes using molecular modeling and verify their pathogenicity *in vitro*. The spatial structure of homo-dimers formed by N-terminal domains of human DSG3 was modeled on the basis of human E-cadherin (50% homology for the first domains) crystallographic data by the resources of open server Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>). We have identified four non-homologous regions in the first DSG3 domain. To form conformational B-cell epitope three peptides on the protein surface of antigen protein must be closely located according to each hyper-variable regions of IgG. Basing on this and according to spatial DSG3 model we have selected two linear peptides which potentially can form non-homologous conformational epitopes. It appeared that 25-34 epitope which forms  $\alpha$ -helix, seats on the top of the first domain facing adhesion molecules from an adjacent cell. At the same time epitope 83-98 belongs to  $\beta$ -strand F and G. It contains two functionally different parts one of which (83-90) is also exposed on the top of the molecule, while the other (90-98) forms lengthy region in G  $\beta$ -strand itself and is situated in the lateral position. Because peptide 83-98 obviously forms two functionally and spatially different regions we have divided it into two peptides. All three peptides 25-34; 78-90, and 89-98 were synthesized and rabbit anti-sera were obtained. To verify pathogenic activity of anti-peptide sera we have used human keratinocyte cell line HaCaT. The cells were incubated on cover glasses until confluence. The anti-sera have been added (10% v/v) for 48 h. The expression of DSG3 on the cell surface has been analyzed by confocal microscopy using murine monoclonal antibody to DSG3. Rabbit antibodies to 25-34 and 78-90 peptides have induced complete depletion of DSG3 from desmosomes while anti-89-98 only decreased its expression. Pemphigus sera were used as controls. These also induced DSG3 depletion from desmosomes. Thus, two pathogenic DSG3 epitopes were identified by molecular modeling. Both have been localized on the top of first domain. Basing on these as well as existing data it can be speculated that the binding of autoantibody with 25-34 or 83-90 epitopes can disturb the transition of DSG3 from cis- to trans-dimer due to sterical hindrance.

## 1,4,6,10-ТЕТРААЗАДАМАНТАНЫ – НОВЫЙ КЛАСС ГЕТЕРОАДАМАНТАНОВ

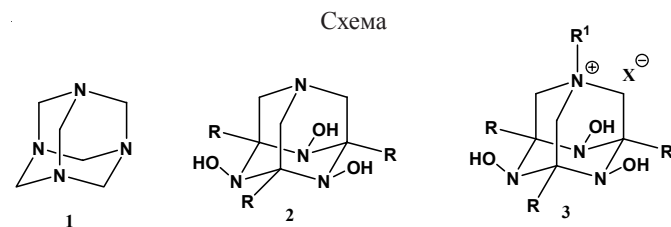
*Семакин А.Н., Сухоруков А.Ю., Лесив А.В., Иоффе С.Л.*

Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

E-mail: sukhorukov@server.ioc.ac.ru

Факс: (499) 135-53-28; тел.: (499) 135-53-29

Азотистые производные адамантана находят широкое применение в современной медицине. Хорошо известны препараты на основе адамантанов, обладающие противовирусной, иммунопротекторной, антикаталептической и цитотоксической активностями [1]. 1,3,5,7-Тетраазаадамantan **1** (см. схему), более известный как уротропин, является одним из наиболее старых синтетических лекарственных средств, используемых в настоящее время. Уротропин **1** и его немногочисленные производные являются единственными известными на сегодняшний день представителями класса тетраазаадамantanов, в то время как их структурные изомеры, весьма интересные с точки зрения биологической активности, не найдены.



R = H, Me, Et, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Me, CH<sub>2</sub>Ph; R<sup>1</sup> = H, CH<sub>2</sub>Ph; X = Cl, Br

Нами впервые синтезированы 4,6,10-тригидрокси-1,4,6,10-тетраазаадамantanы **2** и **3**, новый класс гетероадамantanов, содержащих каркас, изомерный уротропину. Предложенный трех-стадийный метод синтеза адамантанов **2** и **3** крайне прост в реализации и исходит из коммерчески доступных алифатических нитросоединений и аммиака [2].

В докладе будут рассмотрены аспекты синтеза адамантанов **2** и **3**, их реакционной способности, а также предварительные исследования биологической активности некоторых представителей.

### Литература

1. Морозов И.С., Петров В.И., Сергеева С.Л., "Фармакология адамантанов", Волгоград, ВМА, 2001.
2. Semakin A.N., Sukhorukov A.Yu., Lesiv A.V., Ioffe S.L., Nelyubina Yu.V., Lyssenko K.A., Tartakovsky V.A., *Organic Letters*, in press.

## 1,4,6,10-TETRAAZAADAMANTANES – A NEW CLASS OF HETEROADAMANTANES

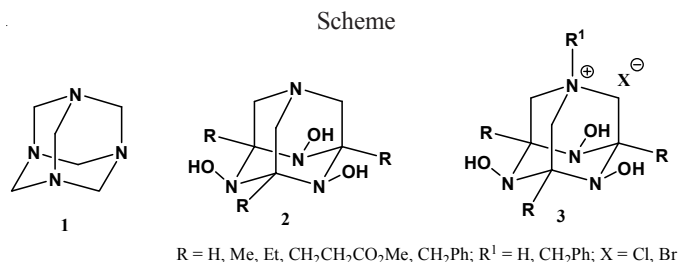
*Semakin A.N., Sukhorukov A. Yu., Lesiv A.V., Ioffe S.L.*

Zelinsky Institute of Organic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: [sukhorukov@server.ioc.ac.ru](mailto:sukhorukov@server.ioc.ac.ru)

Fax: (499) 135-53-28; tel.: (499) 135-53-29

Nitrogen derivatives of adamantanes are widely applied in modern medicine. Many adamantane-based drugs possessing antiviral, immunoprotector, anticataleptic and cytotoxic activity [1]. 1,3,5,7-Tetraazaadamantane **1** (see Scheme) known as urotropin is one of the oldest therapy agents used to date. Urotropin and some of its derivatives are the only representatives of tetraazaadamantanes class, whereas their structural isomers, which may be of certain interest to biochemistry, are unknown.



Here we present the first synthesis of 4,6,10-trihydroxy-1,4,6,10-tetraazaadamantanes **2** and **3**, a new class of heteroadamantanes, which contain a cage isomeric to urotropin. The suggested simple three-step synthesis of adamantanes **2** and **3** starts from commercially available aliphatic nitro compounds and ammonia [2].

Different aspects of synthesis of adamantanes **2** and **3**, their reactivity, as well as the preliminary results of biological activity studies for some representatives, will be discussed in the report.

### References

1. Morosov I.S., Petrov V.I., Sergeeva S.L., "Farmakology of adamantanes", Volgograd, VMA, 2001.
2. Semakin A.N., Sukhorukov A. Yu., Lesiv A.V., Ioffe S.L., Nelyubina Yu. V., Lyssenko K.A., Tartakovsky V.A., Organic Letters, in press.

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОФАГОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ В КРАСНОДАРСКОМ И ПРИМОРСКОМ КРАЯХ, И ПОЛУЧЕНИЕ НА ЭТОЙ ОСНОВЕ ПРЕПАРАТА ДЛЯ ФАГОВОЙ ТЕРАПИИ ЭШЕРИХИОЗА У СВИНЕЙ

*Скобликов Н.Э., Васильева Е.А. \*, Васильева Е.Л. \*, Москаленко Е.А., Зимин А.А. \**

Северо-Кавказский НИИ животноводства, Краснодар, Россия

\*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пушино, Россия

E-mail: [skoblikow@yandex.ru](mailto:skoblikow@yandex.ru), [skoblikow@yandex.ru](mailto:skoblikow@yandex.ru),

[zimim@ibpm.pushchino.ru](mailto:zimim@ibpm.pushchino.ru)

Факс/тел.: (8-61)-260-87-72; (8-467)-73-04-79

Одной из основных ветеринарных проблем сельского хозяйства являются эшерихиозы – инфекции, вызываемые патогенными штаммами кишечной палочки (*E. coli*), чей патогенный потенциал в наибольшей степени реализуется у молодняка животных в периоды отъема.

Из ветеринарных препаратов, применяемых для борьбы с инфекционными заболеваниями, особое место занимают бактериофаги, обладающие рядом значительных преимуществ по сравнению с антибиотиками. Они специфично действуют на определённые виды и даже штаммы бактерий, не поражая нормофлору кишечника; инертны в отношении клеток животного; способны к саморазмножению с последующей самоэлиминацией. В настоящее время существенные ограничения фаготерапии связаны со способностью фагов трансдуцировать различные гены, в частности – детерминанты устойчивости к антибиотикам. По этой причине формирование коллекций нетрансдуцирующих фагов может считаться основой разработки успешной стратегии получения перспективных бактериофагов, соответствующих требованиям, предъявляемым к современным медицинским и ветеринарным препаратам.

Для формирования такой коллекции был произведен отбор проб из природных и сточных вод в Краснодарском и Приморском краях, а также из фекалий свиноматок и поросят-отъёмшей в СТФ ОПХ "Рассвет" СКНИИЖ пос. Знаменский (г. Краснодар).

Были исследованы две пробы фекалий от свиноматок и две пробы от клинически здоровых поросят двухмесячного возраста, а также три пробы из реки Кубань на разных уровнях относительно г. Краснодара. Кроме того, были использованы 9 групп проб сточных вод и водных экосистем Приморского края. Также были использованы фаги из коллекции ИБФМ РАН. Из отобранных проб было проведено выделение бактериофагов и сформирована коллекция, включающая 98 фагов.

Для изучения эффективности фагов из биоматериала поросят (фекалии, секционный материал) с установленным ветеринарным диагнозом кишечного

эшерихиоза были выделены штаммы патогенных энтеробактерий. После определения видовой принадлежности, биохимической активности и проведения серологической идентификации была сформирована рабочая коллекция (13 штаммов из шести районов Краснодарского края), выделенных в регионе распространения возбудителей кишечного эшерихиоза.

Штаммы *E. coli* Ec-26 и Ec-27 были получены от павших от эшерихиоза поросят на свиноферме Тихорецкого района. Серологическое исследование показало, что штамм *E. coli* Ec-26 относится к O33-серотипу, а штамм *E. coli* Ec-27 – к O18-серотипу. Штаммы *E. coli* Ec-23 (серотип O138), Ec-24 (серотип O139), Ec-25 (серотип O155), Ec-28 (серологически не охарактеризован) и Ec-29 (серотип O33) были выделены от павших поросят на двух свинофермах Кавказского района. Штаммы *E. coli* Ec-23 и Ec-24 характеризовались отрицательной биохимической активностью в тесте на ферментацию лактозы. Штаммы *E. coli* Ec-21 (серотип O41) и Ec-22 (серотип O119) были изолированы от мумифицированных плодов свиноматок, заболевших кишечным эшерихиозом. Серологически не охарактеризованные штаммы *E. coli* Ec-01 и Ec-02 (г. Краснодар), а также Ec-04 и Ec-12 (Новокубанский район) были выделены из фекалий поросят-отъёмышей с диареей.

Проведена проверка чувствительности патогенных штаммов *E. coli* к отобраным бактериофагам, по результатам которой бактерии были разделены на две группы, представители каждой из групп характеризовались чувствительностью к своим бактериофагам. Лишь немногие из выделенных бактериофагов лизировали представителей альтернативной группы бактерий. Коллекция бактериофагов, изолированных из биоматериала поросят, была исследована с помощью ПЦР с использованием праймеров к гену 23 бактериофага T4-типа. Ген 23 кодирует основной белок головки бактериофага и является характеристическим белком для этой группы вирусов. По этому признаку все выделенные бактериофаги были отнесены к T4-типу.

Обнаружены два бактериофага, способные лизировать все штаммы бактерий – возбудителей эшерихиоза у поросят. После исследования этих фагов на способность к трансдукции плазмидных маркеров антибиотикорезистентности было установлено, что оба бактериофага не обладают трансдуцирующим эффектом и могут быть названы генетически безопасными для применения в фаговой терапии.

#### **Выводы.**

1. Создана коллекция из 98 бактериофагов, специфичных к ряду штаммов *E. coli*.
  2. Создана коллекция из 13 штаммов *E. coli*, выделенных от поросят, больных эшерихиозом.
  3. Из коллекции фагов отобраны два нетрансдуцирующих бактериофага T4-типа, способные лизировать все исследованные штаммы патогенных *E. coli*.
  4. Показано, что до 100% бактериофагов, выделенных из биоматериала поросят, могут относиться к бактериофагам T4-типа семейства *Myoviridae*.
- Работа была поддержана грантами РФФИ: № 07-04-01563-а, № 09-04-10132-к, № 08-04-10149-к, № 08-04-99111-р\_офи, № 09-04-90824-моб\_сг.

## **MICROBIOLOGICAL AND MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTIC OF BACTERIOPHAGES ISOLATED FROM VARIOUS SOURCES IN KRASNODAR AND PRIMORIE REGIONS, AND PREPARATING THE PHAGE MEDICINE FOR THERAPY OF ESCHERICHIOSIS OF PIG**

*Skoblikov N.E., Vasilyeva E.A. \*, Vasilyeva E.L. \*, Moskalenko E.A., Zimin A.A. \**

North Caucasian Research Institute of Animal Husbandry, Krasnodar, Russia  
\*Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino, Russia

E-mail: skoblikov@yandex.ru, zimin@ibpm.pushchino.ru  
Fax/tel.: (8-61)-260-87-72; (8-467)-73-04-79

One of the general veterinary problem of agriculture are escherichiosis as infection disease induced by pathogenic strains of *E. coli*, which pathogenic potential in most degree released in animal youth in during the post-weaning period.

From the wide specter of veterinary medicines used for therapy of infectious diseases, the phages have the special place. The phages possess a number of significant advantages in comparison with antibiotics: they specifically act to concrete species and even strains of bacteria; they do not target the intestinal normal microflora; they are indifferent for animal's eukaryotic cells; they capable to self-multiplication with subsequent self-elimination. Now the serious restrictions of phage therapy associated with ability of phages to transduce the various genes, in particular – the determinants of antibiotic resistance. By this cause the forming of non-tansducing phages may be considered as a basis for design of successful strategy of reception the perspective phages, accords to requirements to modern medical and veterinary medicines.

Sampling has been made for formation of such collection from natural waters and sewages from Krasnodar and Primorie regions and also fecal probes from sows and weaned piglets (Krasnodar district).

Two fecal probes from sows and two fecal probes from clinically healthy piglets of two-month age have been selected. The water ecosystem probes of Krasnodar region included three probes from different water levels of Kuban river near the Krasnodar city. Besides, the 9 groups of probes of sewages and natural waters of Primorie region have been used. Also the phages from IBPM collection used. The phages from selected probes has been isolated and the collection consisted from the 98 of these phages has been created.

The pathogenic *Enterobacteriaceae* strains have been isolated from biomaterials (excrements, section material) of piglets with established intestinal escherichiosis veterinary diagnosis for reception the objects of studying of phages efficiency. The working collection of pathogenic *E. coli* strains (13 strains from 6 districts of Krasnodar region) formed after species detection and serological identification.

The strains *E. coli* Ec-26 and Ec-27 has been isolated from died by escherichiosis piglets from pig farm of Tikhoretsk district. Serologic analysis has

shown that strain *E. coli* Ec-26 are O33-serotype, and strain *E. coli* Ec-27 are O18-serotype. The strains *E. coli* Ec-23 (O138-serotype), Ec-24 (O139-serotype), Ec-25 (O155-serotype), Ec-28 (non-typed serologically) and Ec-29 (O33-serotype) isolated from died by escherichiosis piglets from two pig farms of Caucasuskaya district. The strains *E. coli* Ec-23 and Ec-24 were characterized as negative for lactose fermentation. The strains *E. coli* Ec-21 (O41-serotype) and Ec-22 (O119-serotype) has been isolated from mummified (necrotic) embryos of sows, diseased by intestinal escherichiosis. The non-characterized serologically strains *E. coli* Ec-01 and Ec-02 (Krasnodar district) and Ec-04 и Ec-12 (Novokubansk district) have been isolated from weaned piglets with diarrhea.

The test of sensitivity of pathogenic *E. coli* strains to selected phages has been executed. In result of it the all bacterial strains divided on two groups. The bacteria of each of these groups characterized by sensitivity for self phages. Only few of isolated phages has been lysed the members of other bacterial group. The collection of phages isolated from pig biomaterial, has been analysed by PCR with using the primers to gene 23 of T4-type phages. The gene 23 codes the major phage head protein and is characteristic for this group of viruses. To this sign all isolated phages have been carried to T4-type.

The two phages, capable to lyse all bacterial strains induced the intestinal escherichiosis found out. After analysis of these phages for capability to transduce the plasmid markers of antibiotic resistance, has been established that both phages do not possess the transducing effect and may be named genetically safe for phage therapy. Two these phages may be offered for the phage therapy.

#### **Results.**

1. The collection of 98 specific to *E. coli* strains phages created.
2. The collection of 13 *E. coli* strains isolated from piglets with escherichiosis created.
3. From phage collection selected two non-transducing T4-type phages, capable to lyse all of investigated pathogenic *E. coli* strains.
4. It is shown that till 100% phages isolated from piglets biomaterials, may be carried to T4-type *Myoviridae* genera phages.

This work was supported by RFBR grants 07-04-01563-a, 09-04-10132-к, 08-04-10149-к, 08-04-99111-p\_ofi, 09-04-90824-mob\_st.

## **ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ ХИТООЛИГОСАХАРИДОВ НА АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ *PHYTOPHTHORA INFESTANS***

***Сорокань А.В., Черепанова Е.А.***

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

E-mail: phyto@anrb.ru

Факс/тел.: (347) 235-60-88

Олигомеры хитина, входящего в состав клеточных стенок грибов, способны распознаваться рецепторами растительных клеток, что приводит к запуску в них защитных механизмов. В литературе имеются весьма противоречивые данные по поводу иммуностимулирующих свойств хитоолигосахаридов (ХОС) в зависимости от их степени ацетилирования (СА). Так как пероксидазам отводится значительная роль в иммунном ответе растений, интересно узнать, меняется ли активность пероксидаз под влиянием ХОС с различной СА и одинаково ли их действие на пероксидазы различной локализации.

Для исследования использовались пробирочные растения картофеля, устойчивого к фитофторозу сорта Невский, выращенные на средах культивирования с добавлением препаратов ХОС с СА 65% и 30% и без них. На 7 сутки листья инокулировали суспензией зооспор *Phytophthora infestans*. Контролем служили неинфицированные растения. На 1, 3 и 7 сутки после заражения растений в супернатантах свободно-растворимой и ионно-связанной с клеточными стенками фракциях определяли активность пероксидазы.

Результаты показали, что ХОС с СА 30% способствовали ранней активации свободно-растворимых пероксидаз растений, а с СА 65% – гораздо более сильной активации пероксидаз, связанных с клеточными стенками. Так как активация пероксидаз в клеточных стенках создает как механический, так и химический барьер для патогена вокруг зоны инфицирования, эта стратегия позволяет растению эффективнее защищаться. Наши визуальные наблюдения показали, что под воздействием ХОС с СА 65% и количество некротизированных участков на зараженных листьях картофеля было значительно меньше, чем на ХОС с СА 30%.

Работа была поддержана грантами РФФИ № 08-04-90259-Узб\_а и АЦВП "Развитие научного потенциала высшей школы" № 113/09.



**INFLUENCE OF ACETYLATION DEGREE OF CHITIN ON  
PEROXIDASES ACTIVITY IN POTATO, INFECTED BY  
*PHYTOPHTHORA INFESTANS***

***Sorokan A.V., Cherepanova E.A.***

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center RAS, Ufa, Russia

E-mail: phyto@anrb.ru

Fax/tel.: (347) 235-60-88

Chitin is compound of fungal cell walls, which distinguished by receptors of plant cells and initiates protective mechanisms. The information about influence of acetylation degree (AD) of these molecules on their immunostimulation properties is rather inconsistent. Because peroxidases are considered like important players in the immune reaction of plants, it is interesting to investigate to study changes activity of peroxidases with chitin oligomers (CO) treatment, and difference of influence the CO with various AD on peroxidases with various location in plant cell.

We used potato plants which cultivated in tubes sort Nevskiy and are resistant to late blight. Murashige-Skoog medium contained chitin oligomers with AD 65% and 30% in concentration of 1 mg/l and without it. After 7 days of growth we inoculate plants by suspension of *Ph. infestans* zoospores. Non-inoculated plants were used for control. Measurements were made on the 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup> and 7<sup>th</sup> days after the infection. The activity of peroxidases was defined in supernatants of soluble and ionic-bound fractions.

The results showed that the chitin with AD 30% promoted early activation of soluble plant peroxidases, and chitin with AD 65% increased the activity of association with cell walls peroxidases. Because activation of cell-wall peroxidases creates mechanical and chemical barrier in zone of pathogen attack, this strategy allows a plants to protect themselves more effectively. Our visual observation showed that addition of chitin with AD 65% led to formation of less quantity of necrosis sites on the infected potato leaves, than presence of chitin oligomers with AD 30% in medium.

Work was supported by a grant from Russian Foundation for Basic Research № 08-04-90259-Uzb a and ACVP "Development of scientific potential of the Higher School" № 113/09.

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И  
ОЛИГОМЕРИЗАЦИЯ УКРОЧЕННЫХ В ОБЛАСТИ  
N-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА ФОРМ АТР-ЗАВИСИМОЙ  
Lon-ПРОТЕИНАЗЫ *E. COLI***

***Степнов А.А., Андрианова А.Г., Чащинова Д.В., Мельников Э.Э.,  
Ротанова Т.В.***

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: anton.stepnov@gmail.com

АТР-зависимая Lon-протеиназа *E. coli* (Ec-Lon), представитель суперсемейства AAA(+)-белков, участвует в поддержании сохранности клеточного протеома путем селективной деградации ряда регуляторных белков, а также аномальных и дефектных полипептидов по уникальному процессивному механизму. Фермент является гомоолигомером и имеет мультидоменную организацию. Субъединица Ec-Lon (784 а.о.) объединяет три домена: некаталитический N-концевой (N, а.о. ~1-300), АТР-азный (A, ~300-584) и протеолитический (P, 585-784). В N-домене обнаружена протяженная coiled-coil (CC)-область (а.о. ~180-280), предположительно ответственная за олигомеризацию фермента и его взаимодействие с белковым субстратом.

Для выявления структурно-функциональной роли CC-области в Ec-Lon получены и охарактеризованы делеционная форма d(CC)-Lon, а также укороченные формы фермента, сохранившие либо полную CC-область (Lon(173-784)), либо ее C-концевую половину (Lon(235-784)).

Установлено, что форма Lon(235-784) обладает пониженной по сравнению с полноразмерным ферментом степенью олигомеризации. Кроме того, эта форма характеризуется необычным автолизом, который значительно усиливается при гидролизе АТР и приводит к отщеплению оставшейся части CC-области. Выдвинуто предположение о внутримолекулярном механизме протекания автолиза. Все модифицированные формы Ec-Lon проявляют непроцессивную протеолитическую активность. Особенности делеционной формы d(CC)-Lon являются нечувствительность к действию АDP – ингибитора полноразмерной Ec-Lon и отсутствие АТР-азной активности при сохранении способности к связыванию нуклеотидов.

Полученные результаты свидетельствуют об участии N-концевого фрагмента в формировании полноценной олигомерной структуры фермента, необходимой для процессивной деградации белковых мишеней, а также доказывают вовлеченность C-концевой части CC-области в систему регуляции функционирования АТР-азного и протеолитического центров Ec-Lon-протеиназы.

Работа поддержана грантом РФФИ № 08-04-00977.



**FUNCTIONAL CHARACTERISTICS AND OLIGOMERIZATION OF  
*E. COLI* ATP-DEPENDENT Lon PROTEASE WITH VARIOUS  
TRUNCATIONS IN THE REGION OF N-TERMINAL DOMAIN**

***Stepnov A.A., Andrianova A.G., Chaschinova D.V., Melnikov E.E.,  
Rotanova T.V.***

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow,  
Russia

E-mail: anton.stepnov@gmail.com

ATP-Dependent Lon protease from *E. coli* (Ec-Lon) is a representative of AAA(+) protein superfamily and participates in cellular proteome maintenance by selective degradation of a number of regulatory proteins as well as abnormal and defective polypeptides using a unique processive mechanism. Ec-Lon is a homooligomer and has a multidomain organization. The enzyme subunit (784 a.a.) consists of a non-catalytic N-terminal domain (N, a.a. ~1-300), an ATPase (A, a.a. ~300-584) and a proteolytic domain (P, a.a. 585-784). The N-domain contains an extended coiled-coil (CC) region (a.a. ~180-280) presumably responsible for the enzyme oligomerization and interaction with a protein target.

For revealing a structure-functional role of CC region in Ec-Lon the deletion form d(CC)-Lon as well as truncated forms of the enzyme which have kept either the full CC region (Lon (173-784)) or its C-terminal half (Lon(235-784)) are received and characterized.

Lon(235-784) was found to possess the lowered extent of oligomerization in comparison with the full-length enzyme. Besides, this form is characterized by unusual autolysis which considerably increases at ATP hydrolysis and leads to the removal of the rest part of the CC region. The intramolecular mechanism of the autolysis is suggested. All modified forms of Ec-Lon display a non-processive proteolytic activity. Exciting features of d(CC)-Lon are the tolerance to the inhibitor of the full-length Ec-Lon - ADP and the loss of ATPase activity while keeping the ability to nucleotide binding.

These results confirm the participation of the N-terminal fragment in formation of the enzyme oligomeric structure which is necessary for the processive degradation of protein targets, and also prove an involvement of the C-terminal part of the CC region in the regulation of functioning of Ec-Lon ATPase and proteolytic sites.

This work is supported by the Russian Foundation for Basic Research grant № 08-04-00977.

**ИНДУЦИРУЕМАЯ АРЕНИЦИНАМИ ПРОВОДИМОСТЬ  
БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН (БЛМ)**

***Суханов С.В., Барсуков Л.И., Баландин С.В., Жмак М.Н.,  
Овчинникова Т.В.***

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: ssv@ibch.ru

Изучено действие ареницина-1 и ареницина-2 из морских полихет *Arenicola marina* на проводимость БЛМ в широком диапазоне концентраций пептидов и мембранных потенциалов. Установлено, что как ареницин-1, так и ареницин-2 в очень низких концентрациях ( $10^{-8}$  –  $10^{-7}$  М) индуцируют интенсивные флуктуации мембранного тока в липидных мембранах. Более высокие концентрации пептидов приводят к полному разрушению мембран, причем время их жизни сильно зависит от концентрации пептидов и величины приложенного потенциала. Анализ зависимости времени жизни мембраны от концентрации ареницина и величины приложенного потенциала, а также динамики нарастания проводимости во времени позволяет заключить, что в мембране происходит постепенное накопление ареницина, приводящее к возникновению флуктуаций мембранного тока с участием временно открывающихся пор и каналов. Судя по величине минимальных флуктуаций мембранного тока, при малых концентрациях ареницина и низких потенциалах основной вклад в проводимость мембраны вносят структуры типа одиночных каналов. По мере накопления ареницина в мембране образуются достаточно крупные поры, в формировании которых могут участвовать более десяти пептидных молекул. На основании электрохимических характеристик наблюдаемых флуктуаций мембранного тока можно сделать вывод, что каналы и поры, формируемые ареницином в мембране, обладают слабой анионной селективностью. При высоких концентрациях ареницина и приложенных потенциалах мембрана, в конечном счете, разрушается, по-видимому, за счет образования в ней большого количества крупных пор и их слияния, что приводит к нарушению целостности липидного бислоя. В ходе проведения сравнительных экспериментов на БЛМ, приготовленных из цвиттер-ионных и отрицательно заряженных фосфолипидов, были обнаружены существенные различия в характере действия ареницинов на ионную проводимость, что позволяет предположить, что мембранные липиды также вовлечены в формирование молекулярных структур, ответственных за мембранолитическую активность этих пептидов.

## ARENICIN-INDUCED CONDUCTIVITY OF BILAYER LIPID MEMBRANES (BLM)

*Sukhanov S.V., Barsukov L.I., Balandin S.V., Zhmak M.N., Ovchinnikova T.V.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: ssv@ibch.ru

The effect of arenicin-1 and arenicin-2 from marine polychaeta *Arenicola marina* on BLM conductivity was studied in the broad range of polypeptide concentrations and membrane potentials. Both arenicins have been found to induce intensive current fluctuations in BLM at very low concentrations ( $10^{-8}$  –  $10^{-7}$  M). Higher peptide concentrations give rise to complete disruption of BLM, the lifetime of the membrane being greatly dependent on the peptide concentration and the value of applied potential. An analysis of these dependences as well as the dynamics of growth in membrane conductivity with time implies that gradual accumulation of arenicin in the membrane results in appearance of current fluctuations representing temporarily opened pores and channels. Judging by the lowest values of current fluctuations recorded at low arenicin concentrations and weak potentials, the molecular structures similar to single channels make the major contribution in the membrane conductivity under these conditions. As more arenicin is accumulated in the membrane, rather large pores are formed containing more than ten peptide molecules. Electrochemical characteristics of the membrane current fluctuations indicate that the channels and pores formed by arenicin in the membrane have moderate anionic selectivity. At high arenicin concentrations and applied electrical potentials, the membrane is ultimately broken down apparently due to formation of large pores and their subsequent fusion, which violates the integrity of lipid bilayer. Comparative studies have revealed substantial differences in the action of arenicins on BLMs prepared from neutral and negatively charged phospholipids. This implies that membrane lipids are also involved in formation of molecular structures responsible for the membranolytic activity of these peptides.

## ВКЛЮЧЕНИЕ ДЕЛЬТА-СОН ИНДУЦИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА В ПОЛИМЕРНЫЕ МАТРИЦЫ

*Суханова Т.В., Гуревич Я.М.\*, Артюхов А.А.\*, Ефремов Е.С., Чикин Л.Д., Прудченко И.А., Штильман М.И.\*, Марквичева Е.А.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

\*Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Учебно-научный центр "Биоматериалы", Москва, Россия

E-mail: sukhanovat@mail.ru

Дельта-сон индуцирующий пептид (ДСИП, TrpAlaGlyGlyAspAlaSerGlyGlu) – регуляторный нейропептид, обладающий стресс-протекторной и адаптогенной активностями [1]. ДСИП является действующим веществом лекарственного препарата Дельтаран. Известно, что молекула ДСИП обладает низкой стабильностью в физиологических условиях и разрушается через несколько минут после введения в организм [2].

Целью данного исследования было изучить возможность включения ДСИП в пористые биодegradируемые полимерные матрицы и исследовать его выход в модели *in vitro*. Для включения ДСИП использовали три типа макропористых полимерных гидрогелей: на основе акрилового производного поливинилового спирта (ПВС, электронейтральная матрица) [3], сополимера акриловой кислоты и N,N'-метилен-бис-акриламида (ПАА, отрицательно заряженная матрица) [4], сополимера диметиламиноэтилметакрилата и N,N'-метилен-бис-акриламида (пДМАЭМА, положительно заряженная матрица) [4]. Включение пептида в ПВС матрицу проводили путем добавления раствора ДСИП (0,5-1 мг/мл, 400 мкл) с последующим (спустя 1 ч) лиофильным высушиванием. Матрицы ПАА и пДМАЭМА (4-20 мг) инкубировали в течение 16 ч в растворе пептида (0,5-1 мл, концентрация пептида 0,1 мг/мл) и лиофильно высушивали. Методом обращенно-фазовой хроматографии обнаружено, что ДСИП адсорбируется на матрице пДМАЭМА из водного раствора частично (65% от исходного количества) в течение 6 ч и полностью – спустя 16 ч. В то время как в ПВС матрицу ДСИП включался полностью, адсорбции пептида в ПАА матрице не наблюдали. Для исследования десорбции пептида из предварительно лиофильно высушенных матриц последние помещали в 0,9% раствор NaCl или PBS (pH 7,4; 6,0; 5,0). Обнаружено, что полный выход пептида в растворы из ПВС матрицы происходил через 3 ч, в то время как из пДМАЭМА матрицы выход пептида составил 86% в течение 1-3 ч при нейтральном pH (7,4) и 56-61% при pH 5,0 и 6,0, соответственно. В контрольном образце (инкубация пДМАЭМА матрицы в воде MilliQ) выхода пептида не наблюдали даже после 24 ч. Добавление к нему раствора PBS (pH 7,4) приводило к полной десорбции пептида.

Таким образом, ДСИП можно иммобилизовать на пористых гидрогелевых матрицах ПВС и пДМАЭМА за счет формирования водородных и ионных связей. Данные результаты могут быть использованы при разработке биодegradируемых носителей для создания трансплантатов с включенными в них биоактивными пептидами.

*Литература*

1. Koplík E.V., Umryukhin P.E., Konorova I.L., Terekhina O.L., Mikhaleva I.I., Gannushkina I.V., Sudakov K.V. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2008; **38**(9):953-7.
2. Graf M.V., Saegesser B., Schoenberger G.A. *Peptides* 1987; **8**:599-603.
3. Shtilman M.I., Artyukhov A.A., Zolotaikina T.S., Korshak A.Yu., Gorchakov A.V., Tsatsakis A.M. *Int. Polymer. Sci. Tech.* 2006; **33**(10):25-9.
4. Shtilman M.I., Artyukhov A.A., Chalykh A.E., Semenchuk O.V., Tsatsakis A.M. *Int. Polymer. Sci. Tech.* 2007; **34**(3):41-6.

## ENTRAPMENT OF DELTA-SLEEP INDUCING PEPTIDE INTO POLYMER MATRICES

*Sukhanova T.V., Gurevich Y.M. \*, Artyukhov A.A. \*, Efremov E.S., Chikin L.D., Prudchenko I.A. \*, Shtilman M.I. \*, Markvicheva E.A.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

\*Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Research and Teaching Center "Biomaterials", Moscow, Russia  
E-mail: sukhanovat@mail.ru

Delta-sleep inducing peptide (DSIP, TrpAlaGlyGlyAspAlaSerGlyGlu) is a regulatory neuropeptide with stress-protectoric and adaptogenic activities [1]. It is an active substance of medical product Deltaran. As well known, DSIP molecule has low stability under physiological conditions and was destroyed in some minutes after its administration in a body [2].

The aim of this research is to study possibility of DSIP entrapment in biodegradable porous polymer matrices and to estimate its release using *in vitro* model. Three types of macroporous polymer hydrogels were used for DSIP entrapment: acrylate modified polyvinyl alcohol (PVA, electroneutral matrix) [3], copolymer of acrylic acid and N,N'-methylene-bis-acrylamide (PAA, negatively charged matrix) [4], copolymer of dimethylaminoethyl methacrylate and N,N'-methylene-bis-acrylamide (PDMAEMA, positively charged matrix) [4]. Peptide entrapment in PVA matrix was carried out by addition of DSIP solution (0.5-1 mg/ml, 400µl) following lyophilization after 1 h. PAA and pDMAEMA matrices (4-20 mg) were incubated in aqueous peptide solution (0.5-1 ml, 0.1 mg/ml) for 16 h following lyophilization. It was found by reverse phase chromatography, DSIP was adsorbed on PDMAEMA matrix from aqueous solution partially (65% from basic amount) in 6 h and completely in 16 h. Where as DSIP entrapped in PVA matrix completely, peptide adsorption on PAA matrix is not observed. For study of peptide desorption from previously lyophilized matrices they were positioned in 0.9% NaCl solution or PBS (pH 7.4; 6.0; 5.0). It was found, the complete DSIP release in solutions from PVA matrix was observed after 3 h, where as from PDMAEMA matrix DSIP release was 86% in 1-3 h at neutral pH (7.4) and 56-61% at pH 5.0 and 6.0 respectively. In control (incubation PDMAEMA matrix in MilliQ water) peptide release was not observed even in 24 h. Addition of PBS solution (pH 7.4) resulted to 100% peptide desorption.

This allows to predict DSIP immobilization on porous hydrogel PVA matrix and PDMAEMA matrix by forming hydrogen and ionic bonds. These results can be used for development of biodegradable carriers for transplants with entrapped in it bioactive peptides, accelerating of tissues reparation processes.

### References

1. Koplík E.V., Umryukhin P.E., Konorova I.L., Terekhina O.L., Mikhaleva I.I., Gannushkina I.V., Sudakov K.V. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2008;**38**(9):953-7.
2. Graf M.V., Saegesser B., Schoenenberger G.A. *Peptides* 1987;**8**:599-603.
3. Shtilman M.I., Artyukhov A.A., Zolotaikina T.S., Korshak A.Yu., Gorchakov A.V., Tsatsakis A.M. *Int. Polymer. Sci. Tech.* 2006;**33**(10):25-9.
4. Shtilman M.I., Artyukhov A.A., Chalykh A.E., Semenchuk O.V., Tsatsakis A.M. *Int. Polymer. Sci. Tech.* 2007;**34**(3):41-6.

## СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОЗИДОВ ФЕРМЕНТАТИВНЫМ ТРАНСГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕРМОСТАБИЛЬНЫХ НУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ

*Таран С.А. \*\*\*, Феофанов С.А. \*, Мирошников А.И. \**

\*Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия  
E-mail: corresponder@rambler.ru

\*\*Пушинский государственный университет, Пущино, Россия

Нуклеозиды, содержащие различные модификации в основании или рибофуранозном остатке, как правило, получают многостадийным химическим синтезом. Такой синтез трудоемок, характеризуется низким выходом целевых продуктов и сложностью их выделения по причине формирования в реакции смеси регио- и стереоизомеров. Альтернативным способом получения природных нуклеозидов и их модифицированных аналогов может служить биосинтетический процесс, катализируемый N-дезоксирибозилтрансферазами или нуклеозидфосфорилазами микроорганизмов. Основным преимуществом биоконверсии перед химическим синтезом является абсолютная регио- и стереоспецифичность катализируемых ферментами процессов. Кроме того, эти реакции не требуют никаких кофакторов и могут протекать в экологически и технологически безопасных водных буферах. Благодаря широкой субстратной специфичности нуклеозидфосфорилазы являются более подходящими биокатализаторами для промышленного применения.

Нуклеозидфосфорилазы – одна из групп ключевых ферментов синтеза и обмена пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов в живых организмах - от бактерий до млекопитающих. В присутствии ортофосфата эти ферменты катализируют обратимый фосфоролит рибо-, арабино- и дезоксирибонуклеозидов до пентозо-1-фосфата и соответствующих оснований, а также фосфатзависимый перенос пентозы между пуриновыми и пиримидиновыми основаниями или нуклеозидами (трансгликозилирование) с образованием нуклеозидов, отличных от исходных, по схеме:



Нами были клонированы гены нуклеозидфосфорилазы *Geobacillus stearothermophilus* VKM-2194 и получены рекомбинантные штаммы *E.coli* BL21(DE3)/pBstPNPII и BL21(DE3)/pBstPYNP, продуцирующие, соответственно, пуриನ್ನуклеозидфосфорилазу II (КФ 2.4.2.1) и пиримидиннуклеозидфосфорилазу (КФ 2.4.2.2) *G. stearothermophilus*. Удельная активность полученных ферментных препаратов, определенная в реакции фосфоролита соответствующих субстратов, составляла 55±4 ед/мг белка для препарата пуриನ್ನуклеозидфосфорилазы и 112±7 ед/мг белка для пиримидиннуклеозидфосфорилазы *G. stearothermophilus*. Термостабильность этих ферментов была высока и время полужизни при температуре 65°C

составляло 250 и 118 часов для пуриноклеозидфосфорилазы и пиримидинуклеозидфосфорилазы, соответственно. Охарактеризованные ферментные препараты рекомбинантных нуклеозидфосфорилаз *G. stearothermophilus* иммобилизовали на аминопропилированном макропористом стекле AP-CPG-170 и использовали в реакциях фосфорилирования и трансгликозилирования природных и модифицированных нуклеозидов.

Введение различных модификаций по 2- и 6-положениям пуриновых оснований и 5-положению пиримидиновых оснований не приводило к существенному изменению активности ферментов по сравнению с природными субстратами, что позволяет использовать полученные ферментные препараты для синтеза модифицированных нуклеозидов.

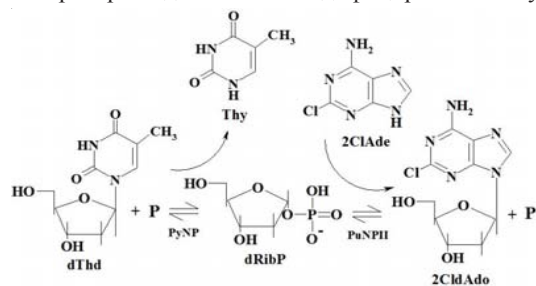


Схема получения 2-хлор-2'-деоксиаденозина

Показана возможность эффективного применения ферментных препаратов нуклеозидфосфорилаз *G. stearothermophilus* для биотехнологического получения ряда субстанций фармацевтической продукции: 2-хлор-2'-деоксиаденозина (субстанция препарата "Кладрибин") в сопряженной реакции трансгликозилирования с тимидином (донор дезоксирибозы) и 2-хлораденином (модифицированное основание); 9-β-D-арабинофуранозил-2-фтораденина (субстанция препарата "Флударабин") в сопряженной реакции трансгликозилирования с 9-β-D-арабинофуранозилурацилом (донор арабинозы) и 2-фтораденином (модифицированное основание); 1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (субстанция препарата "Виразол") с гуанозином (донор рибозы) и 1,2,4-триазол-3-карбоксамидом (модифицированное основание). Разработаны методики и технологические регламенты биотехнологического синтеза и выделения целевых продуктов из реакционной смеси ионообменной хроматографией на различных сорбентах отечественного и импортного производства (Dowex, AB17x2) с использованием экологически и технологически безопасных элюентов (вода, аммиачная вода) и реактивов.

Создан "биотехнологический инструментарий", который может использоваться для получения широкого спектра как уже исследованных, так и новых препаратов нуклеозидной природы для нужд медицины и других применений.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты РФФИ 08-04-12143, 08-04-01842) и Федерального агентства по образованию (проект Тематического плана № 1.1.09).

## SYNTHESIS OF NUCLEOSIDE ANALOGUES BY ENZYMATIC TRANSGLYCOSYLATION WITH RECOMBINANT THERMOSTABLE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASES

*Taran S.A.*\*\*\*, *Feofanov S.A.*\*, *Miroshnikov A.I.*\*

\*Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino, Russia

E-mail: [corresponder@rambler.ru](mailto:corresponder@rambler.ru)

\*\*Pushchino State University, Pushchino, Russia

**Background.** Modified nucleosides and their analogs are now widely used in medical practice as an important group of efficient chemotherapeutics for treatment of viral and cancer diseases. Biotechnological production of the nucleoside analogs containing modified bases with the help of bacterial nucleoside phosphorylases is more promising than chemical synthesis.

### Objectives.

1. Construction of genetically engineered *E. coli* strains producing *Geobacillus stearothermophilus* B-2194 thermostable purine (PuNP) and pyrimidine (PyNP) nucleoside phosphorylases.

2. Investigation of the potential of engineered *E. coli* strains for synthesis of natural nucleosides and their modified derivatives using various pentose donors and acceptors.

**Methods.** Cloning of *G. stearothermophilus* nucleoside phosphorylase genes into expression vectors. Preparation of natural and modified nucleosides by transglycosylation reactions.

### Results.

1. We have constructed the genomic library of the *G. stearothermophilus* B-2194. By using conserved gene primers, we have detected the fragments of the *punB* and *pyn* genes. The genes were cloned into the pET-related vectors and the enzymes were expressed in *E. coli* BL21(DE3).

2. The yield of nucleoside phosphorylases in this case reached 40% of the total cellular protein.

3. Use of the cells containing the thermostable enzymes allowed us to conduct the process at 70-75°C, providing the maximal concentrations of sparingly soluble substrates.

4. The study has demonstrated that intact cells of the tested recombinant *E. coli* strains, the overproducers of the *G. stearothermophilus* purine (PuNP) and pyrimidine (PyNP) nucleoside phosphorylases, are appropriate for a highly efficient synthesis of 2'-deoxyinosine, 2'-deoxyguanosine, 2ClAdo (cladribine) and 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (ribavirin).

**Conclusion.** We have developed very efficient biocatalysts for the preparation of natural and modified nucleosides.



**РАЗРАБОТКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ  
ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ ПРОГРАММ  
УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ЗАСОЛЕНИЮ**

Тарлачков С.В., Вшивцева Е.Н., Шевчук Т.В.\*, Дьяченко О.В.\*,  
Захарченко Н.С.\*, Бурьянов Я.И.\*

Пушкинский государственный университет, Пушкино, Россия  
\*Филиал Института биоорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, Россия  
E-mail: ovdyaachenko@fibkh.serpukhov.su

В настоящее время все проводимые в мире исследования по созданию устойчивых к абиотическому стрессу растений направлены на изменение только одного из многочисленных звеньев их метаболического защитного ответа, в то время как растения имеют интегральную молекулярно-генетическую систему взаимосвязанных физиологических ответов на стресс. Энзиматическое метилирование ДНК играет важную роль в регуляции таких клеточных процессов у растений, как дифференцировка и морфогенез, апоптоз, формирование структуры хроматина и экспрессия генов. Имеются предпосылки создания трансгенных растений с активированными эпигенетическими программами защитного ответа на абиотические стрессы.

Целью работы является создание биологической модели для исследования трансген-индуцированной активации генетических программ защиты растений от солевого стресса на основе факультативных галофитных растений *Mesembryanthemum crystallinum*. Эти растения отвечают на солевой стресс или водный дефицит переключением C3-фотосинтеза на САМ-метаболизм и увеличением CpNpG-метилирования (N-любой нуклеозид) повторяющихся последовательностей ядерного генома. Предложена гипотеза о специфической функциональной роли CpNpG-гиперметилирования повторяющихся последовательностей генома в образовании специализированной структуры хроматина в клетках растений *M. crystallinum* при их адаптации к солевому стрессу и переключении на САМ-метаболизм. Разработана система генетической трансформации растений *M. crystallinum* специализированными векторами, содержащими гены сайт-специфических цитозинового ДНК-метилтрансфераз. Проведена агробактериальная трансформация растений *M. crystallinum* вектором, несущим модифицированный ген бактериальной ДНК-метилтрансферазы EcoRII. Получены трансгенные растения первого поколения, приводятся результаты их молекулярно-генетического анализа.

Работа выполнена при поддержке грантами РФФИ № 09-08-00687 и № 09-04-12126.

**DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL MODEL OF EPIGENETIC  
ACTIVATION OF ABIOTIC STRESS RESISTANCE PROGRAMS  
IN PLANTS**

Tarlachkov S.V., Vshyvceva E.N., Shevchuk T.V.\*, Dyachenko O.V.\*,  
Zakharchenko N.S.\*, Buryanov Ya.I.\*

Pushchino State University, Pushchino, Russia  
\*Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,  
Pushchino, Russia  
E-mail: ovdyaachenko@fibkh.serpukhov.su

At present the common approach to abiotic stress-resistant transgenic plants creation is the introducing only some new specific reactions among numerous interrelated biochemical pathways of metabolic response. However, plants possess the whole integrated system of interconnected physiological pathways of stress response. Enzymatic DNA methylation plays important role in regulation of morphogenesis, cell differentiation, apoptosis, chromatin structure formation, and gene expression regulation in plant cell. There are possibilities for creation of transgenic plants with artificially activated epigenetic programs of abiotic stress response. The aim of present work is development of biological model for studying transgene-induced activation of genetic programs which are responsible for plant protection against salt stress. *Mesembryanthemum crystallinum* is choose as a model plant organism. This halophyte plant are known to respond on a salt stress or water deficit by switching of C3 photosynthesis to CAM-metabolism with simultaneous increase of CNG-methylation level (N – any nucleotide) in repeated sequences in nuclear genome. The hypothesis was proposed, that CNG-hypermethylation of satellite sequences play a role in specific chromatin structure creation, assisting salt stress adaptation and switching to CAM-metabolism. Genetic transformation system of *M. crystallinum* plant with vectors carrying site-specific cytosine methyltransferases genes was elaborated. Agrobacterial transformation of *M. crystallinum* plant with plasmid carrying modified gene of bacterial DNA methyltransferase EcoRII was carried out. First generation transgenic plants are under investigation.

This work had been supported by grants from RFBR: N09-08-00687 and N09-04-12126.



**ПРИМЕНЕНИЕ МЕЗО-ЗАМЕЩЕННЫХ ПОЛИМЕТИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ В КАЧЕСТВЕ СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ**

*Татиколов А.С., Акимкин Т.М., Кашин А.С., Панова И.Г.\**

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

\*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

E-mail: tatikolov@sky.chph.ras.ru

Факс: (495) 137-41-01; тел.: (495) 939-71-71

Поиск простых и удобных методов изучения биологических объектов, в частности, использование красителей-зондов, является важным для исследовательских и экспериментальных целей. Нашей задачей было найти такие красители, которые могли бы служить спектрально-флуоресцентными зондами для различных биомакромолекул при анализе и изучении биологических систем. Такими зондами могут служить *мезо*- (или 9-) замещенные полиметиновые красители. В незамещенных полиметиновых красителях *цис*-изомер обычно имеет более высокую энергию, чем *транс*-изомер, и *транс-цис* равновесие смещено в сторону *транс*-изомера. В *мезо*-замещенных полиметиновых красителях *транс*- и *цис*-изомеры могут быть сравнимы по энергии вследствие стерических препятствий, и *транс-цис* равновесие становится подвижным, сдвигается в ту или другую сторону в зависимости от молекулярного окружения. Это делает *мезо*-замещенные полиметиновые красители перспективными для использования в качестве спектрально-флуоресцентных зондов для биомакромолекул. Один из таких красителей, 3,3'-ди(сульфопропил)-4,5,4',5'-дibenzo-9-этилтиакарбозианин-бетаин, был использован нами в качестве зонда для анализа внеклеточных сред глаза человека и некоторых животных на альбумин и коллагены. Нами изучено также взаимодействие другого анионного *мезо*-замещенного красителя – 3,3'-ди(сульфопропил)-9-метилтиакарбозианин-бетаина – с сывороточными альбуминами человека и быка и показано, что он может служить спектрально-флуоресцентным зондом на сывороточные альбумины. Исследовано нековалентное взаимодействие ряда скварилиевых красителей (которые можно рассматривать как полиметиновые красители с *мезо*-заместителем) с сывороточными альбуминами различных животных и установлено, что один из таких красителей также может служить зондом на сывороточные альбумины. Данный краситель использован нами при изучении состава стекловидного тела глаза цыпленка. Подробно изучено взаимодействие 3,3',9-триметилтиакарбозианина с ДНК. Обнаружено, что этот краситель взаимодействует не только с ДНК, но и с гиалуроновой кислотой, образуя на ее молекулах Н-агрегаты. Сделан вывод, что *мезо*-замещенные полиметиновые красители могут служить эффективными спектрально-флуоресцентными зондами для различных биомакромолекул при изучении биологических объектов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 09-04-01054а).

**APPLICATION OF MESO-SUBSTITUTED POLYMETHINE DYES AS SPECTRAL-FLUORESCENT PROBES FOR BIOMACROMOLECULES**

*Tatikolov A.S., Akimkin T.M., Kashin A.S., Panova I.G.\**

\*Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, Russia

\*Koltsov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, Russia

E-mail: tatikolov@sky.chph.ras.ru

Fax: (495) 137-41-01; tel.: (495) 939-71-71

A search for simple and convenient methods for the study of biological objects, in particular, the use of dye probes, is of importance for investigative and experimental purposes. Our task was to find dyes that could serve as spectral-fluorescent probes for various biomacromolecules in the analysis and the study of biological systems. *Meso*- (or 9-) substituted polymethine dyes can serve as such probes. For unsubstituted polymethine dyes the *cis*-isomer usually has higher energy than the *trans*-isomer, and the *trans-cis* equilibrium is shifted toward the *trans*-isomer. For *meso*-substituted polymethine dyes the energies of the *trans*- and *cis*-isomers can be comparable due to steric hindrances, the *trans-cis* equilibrium becomes mobile and is shifted toward one or another side depending of the molecular surrounding. This makes *meso*-substituted polymethine dyes promising for application as spectral-fluorescent probes for biomacromolecules. We used one of such dyes, 3,3'-di(sulphopropyl)-4,5,4',5'-dibenzo-9-ethylthiacarbocyanine betaine, as a probe for analysis of the extracellular media of the human eye and the eye of some animals for albumin and collagens. We also studied the interaction of the other *meso*-substituted polymethine dye, 3,3'-di(sulphopropyl)-9-methylthiacarbocyanine betaine, with human and bovine serum albumins and showed that this dye can serve as a spectral-fluorescent probe for serum albumins. We studied the non-covalent interaction of a number of squarylium dyes (which can be considered as polymethine dyes with a *meso*-substituent) with serum albumins of various animals and found that one of these dyes can also serve as a probe for serum albumins. We used this dye in the study of the composition of the vitreous body of the chick eye. The interaction of 3,3',9-trimethylthiacarbocyanine with DNA was studied by us in detail. We found that this dye interacts not only with DNA, but also with hyaluronic acid to form H-aggregates on its molecules. It was concluded that *meso*-substituted polymethine dyes can serve as efficient spectral-fluorescent probes for various biomacromolecules in studies of biological objects.

The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project 09-04-01054a).

**ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ  
КАРБОНОВЫХ И ФОСФОРНОЙ КИСЛОТ, СОДЕРЖАЩИХ  
ФРАГМЕНТЫ АЛКАЛОИДОВ**

Тиллябаев З., Абдувахабов А.А.

Институт биоорганической химии им. академика А.С. Садыкова АН РУз,  
Ташкент, Узбекистан  
E-mail: tilyabaevzaid@mail.ru  
Факс: (99871) 262-70-63; тел.: (99871) 262-35-40

Минуло 200 лет с тех пор, как из млечного сока мака *Papaver somniferum* Л. Деронь выделил первый алкалоид. За истекший период многими химиками выделено и описано строение более 20 тысяч алкалоидов. Весомым является вклад в химию алкалоидов выдающихся ученых Узбекистана академиком А.С. Садыкова и С.Ю. Юнусова, создателей известных школ исследователей Узбекистана в области биоорганической химии. Отличительной особенностью исследований, проводимых в этих школах, было не просто выделение и установление структуры алкалоидов Центральной Азии, но и выяснение взаимосвязи между строением, функцией и физиологическим действием не только самих алкалоидов, но и их разнообразных химических модификаций. Развитие данного направления было начато А.С. Садыковым в 1949 году с модификации алкалоида лупинина, в ряду которого обнаружены вещества с выраженной проводниковой анестезией. Такой эффект, как было показано, проявляется благодаря поверхностно-активным свойствам, липофильности и проникающей способности синтезированных соединений через мембраны, а также скорости метаболического разрушения последних под действием различных гидролитических ферментных систем организма.

Впервые были синтезированы органические соединения фосфора, в составе молекул которых содержались такие алкалоиды как анабазин, лупинин, пиперидин, морфолин, декагидрохинолин, эфедрин, псевдоэфедрин, сальсолин, сальсолидин, цитизин и др. Анализируя кинетические параметры взаимодействия этих соединений с такими ферментами метаболизма, как холинэстеразы и карбоксилэстеразы, мы выявили различия в топографии активного центра аналогичных ферментов теплокровных и ряда членистоногих, что послужило теоретической основой для создания избирательно действующих инсекто-акарицидов против вредителей хлопчатника, а также синергистов, потенцирующих активность промышленно выпускаемых химических средств защиты растений, в частности карбаматов, пиретроидов и препаратов, получаемых микробиологическим путем.

**POLYFUNCTIONALITY OF ESTERS AND PHOSPHATES WITH  
ALKALOID FRAGMENTS**

Tilyabaev Z., Abduvakhobov A.A.

Sadykov Institute of Bioorganic Chemistry of the Uzbek Academy of Sciences,  
Tashkent, Uzbekistan  
E-mail: tilyabaevzaid@mail.ru  
Fax: (99871) 262-70-63; tel.: (99871) 262-35-40

It is almost 200 years since L. Derosne had isolated the first alkaloid from *Papaver somniferum*. For expired period chemists isolated and characterized the structures of more than 20000 alkaloids. A great contribution to alkaloids' chemistry was made by famous Uzbek scientists A.S. Sadykov and S.Yu. Yunusov - the founders of worldwide known Uzbekistan research schools in the field of bioorganic chemistry. A specific feature of investigations conducted in these schools was not just isolation of Central Asian alkaloids and establishment of their structure, but also determination of interconnection between structure, function and physiological action of alkaloids as well as their derivatives. This scientific direction was developed by A.S. Sadykov, who in 1949 modified alkaloid lupinine and synthesized its derivatives exhibiting a pronounced conductive anesthesia. Such effect, as it has been shown, was caused by surface activity, lipophilicity and membrane permeability of synthesized compounds and also by the rate of metabolic destroys of membranes by different hydrolyzing enzymatic systems of organism.

Phosphor organic compounds containing the fragments of alkaloids such as anabazine, lupinine, piperidine, morpholine, decahydroquinoline, ephedrine, pseudo-ephedrine, salsoline, salsolodine, cytisine and others have been synthesized for the first time. By analyzing kinetic parameters of interaction of these compounds with such metabolic enzymes as cholinesterase and carboxyl esterase the differences in topography of an active center of analogical enzymes of warm-blooded animals and arthropods have been revealed. It served as theoretical basis for creating selectively acting insect-acaricides against cotton pests and also for developing synergists that potent the activity of industrial plant protection chemicals, especially carbamates, piretroids and microbiopreparations.

## **ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ФРАКЦИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ ФОТОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

*Трубецкая О.Е., Шалойко Л.А., Демин В.Д.\*, Трубецкой О.А.\**

Филиал Института биоорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, Россия

\*Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушкино, Россия

E-mail: trub@fibch.serpukhov.su

Гуминовые вещества (ГВ) – возобновляемые и практически неисчерпаемые природные органические биополимеры, являются обязательным и стабильным компонентом экосферы, обеспечивая ее многие токсикопротекторные функции. Около 25 лет назад было обнаружено, что ГВ способны не только связывать, но и эффективно разрушать пестициды и другие поллютанты, используя в качестве источника энергии солнечный свет, причем эффективность деградации поллютантов гуминовыми веществами на порядок превышает соответствующую активность микроорганизмов. Несмотря на многочисленные исследования в этой области до настоящего времени нет четкого представления ни о первичной структуре и пространственной организации гуминового комплекса, ни о его компонентах, отвечающих за светозависимую деградацию пестицидов и других поллютантов.

Целью настоящей работы было выделение и структурные исследования фотохимически активной фракции ГВ чернозема, являющегося наиболее плодородной почвой России. Для этих целей была разработана методика многократной ультрафильтрации одного и того же образца ГВ, растворенного в 7М мочеvine, на мембране с номинальным размером пор 5 кДа. После 20 ультрафильтрационных процедур концентрат (ГВ, задерживаемые на мембране и обладающие номинальной молекулярной массой  $M_m > 5$  кДа) и фильтрат (ГВ, проходящие через мембрану и обладающие номинальной  $M_m < 5$  кДа) анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, разработанном ранее [1] с последующей детекцией геля в видимом и ультрафиолетовом свете. Несмотря на то, что детекция геля в ультрафиолетовом свете является рутинной техникой, широко используемой в химии нуклеиновых кислот и белков, для детекции ГВ она была использована впервые. Было обнаружено, что фракция с  $M_m < 5$  кДа в ультрафиолетовом свете ( $\lambda = 312$  нм) обладает собственной голубой и желто-зеленой флуоресценцией, детектируемой на трансиллюминаторе без окрашивания, в то время как концентрат с  $M_m > 5$  кДа не флуоресцировал. Анализ фотохимической активности с использованием в качестве субстратов триметилфенола и фурфурола показал, что вся фотохимическая активность сконцентрирована в низкомолекулярной флуоресцирующей фракции.

Субфракционирование фотохимически активной фракции было проведено ультрафильтрацией на 3 кДа и 1 кДа мембранах. Анализ с помощью трехмерной флуоресценции показал, что фракция 3-5 кДа содержит желто-зеленый флуорофор ( $\lambda_{\text{возбуждения}}/\lambda_{\text{эмиссии}} = 260\text{нм}/550\text{нм}$ ), фракции 1-

3 кДа – голубой ( $\lambda_{\text{возбуждения}}/\lambda_{\text{эмиссии}} = 260\text{нм}/510\text{нм}$ ), а фракции 1-0,5 кДа – синий ( $\lambda_{\text{возбуждения}}/\lambda_{\text{эмиссии}} = 280\text{нм}/350\text{нм}$ ,  $265\text{нм}/400\text{нм}$ ,  $265\text{нм}/430\text{нм}$ ).

Изучение структуры фотохимически активных компонентов ГВ создает основу для принципиального усовершенствования методов очистки и возобновления биосферных ресурсов в связи с возрастающим загрязнением окружающей среды и ухудшением качества питьевой воды.

Работа поддержана грантом ИНТАС № 06-8055.

### *Литература*

1. Trubetskaya, O., Trubetskoj, O., Guyot, G., Andreux, F., Richard, C. (2002). Fluorescence of soil humic acids and their fractions obtained by tandem size exclusion chromatography-polyacrylamide gel electrophoresis. *Org. Geochem.* **33**, 213-220.

## SEPARATION AND ISOLATION OF PHOTOCHEMICALLY ACTIVE AND FLUORESCENT SPECIES FROM HUMIC SUBSTANCES

*Trubetskaya O.E., Shaloiko L.A., Demin D.V.\*, Trubetskoj O.A.\**

Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino, Russia

\*Institute of Basic Biological Problems RAS, Pushchino, Russia

E-mail: trub@fibch.serpukhov.su

Humic substances (HS) contain a large portion of the total organic carbon in terrestrial and aquatic environments. Increasing interest has been given to HS in the past 25 years as they serve as an effective carbon sink reducing gas emission and greenhouse effect and solar energy absorbent. Due to absorption of solar radiations HS initiate a number of photochemical processes, producing radicals and/or other chemical species able to promote the transformation of organic chemicals (pesticides and other organic pollutants). However, due to the complexity of HS, it still remains difficult to elucidate the exact mechanisms of their photochemical properties and clear up which integral components and chromophores are responsible for those. One way to get a better insight into these properties is to fractionate HS into homogeneous fractions having different physical-chemical properties and/or functional activity.

The aim of this study was to isolate photochemically active fractions from chernozem soil HS, as more fertilize soil in Russia. For this purpose multiply ultrafiltration procedure on 5 kDa membrane of HS sample dissolved in 7M urea has been used. After 20 repeated UF-runs retentate with nominal molecular size (MS) > 5kDa and ultrafiltrate with MS < 5kDa were dialyzed, lyophilized and analyzed by electrophoresis in polyacrylamide gel according to [1], with further detection of the gel in visible and UV-light (312 nm). It was found that fraction with MS > 5kDa in UV-light did not show fluorescence, while fraction with MS < 5kDa demonstrated very intensive overlapped yellow and blue fluorescence. Analysis of photochemical activity of fractions obtained using trimethylphenol and furfurylic alcohol as a standard photochemical probe demonstrated that all photochemical activity of chernozem HS located in low MS fluorescent fraction < 5 kDa.

Subfractionation of fluorophores from fluorescence fraction was achieved using UF-procedure on 3kDa and 1kDa membranes. 3D-fluorescence analysis demonstrated that fraction with MS 3-5 kDa contained yellow fluorophore ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 260/550\text{nm}$ ), fraction with MS 1-3 kDa contained blue fluorophore ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 260/510\text{nm}$ ) and fraction with MS 1-0,5 kDa contained ultramarine fluorophores and at least three maximums ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/350, 280/400, 265/440\text{nm}$ ).

The data obtained could clear the role of humic macromolecules in natural remediation processes. This is especially important for characterisation of Russian chemically polluted soils and water for selecting the major parameters for monitoring bioremediation.

The work has been supported by grant INTAS N 06-8055.

### References

1. Trubetskaya, O., Trubetskoj, O., Guyot, G., Andreux, F., Richard, C. (2002). Fluorescence of soil humic acids and their fractions obtained by tandem size exclusion chromatography-polyacrylamide gel electrophoresis. *Org. Geochem.* **33**, 213-220.

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ЦЕРЕБРОЛИЗИНА И СЕМАКСА НА МОДЕЛИ ФОКАЛЬНОГО ИНСУЛЬТА У КРЫС CD

*Туховская Е.А., Сухорукова Н.А., Лобанова Н.Н., Мурашев А.Н.*

Филиал Института биорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия

E-mail: tukhovskaya@fibkh.serpukhov.su

Для восстановления нормального функционирования головного мозга после перенесенного инсульта применяют различные по структуре и эффективности препараты. Перспективной и наиболее используемой группой препаратов, обладающих терапевтической активностью в отношении последствий ишемии головного мозга, является группа ноотропных препаратов на основе нейропептидов. К ним относятся церебролизин и семакс. Церебролизин представляет собой гидролизат свиного мозга, в состав которого входят низкомолекулярные биологически активные нейропептиды, семакс – синтетический гептапептид, аналог фрагмента АКТГ 4-10. Целью нашего исследования было изучить и сравнить между собой влияние этих препаратов на морфологию функций головного мозга крыс CD после перенесенного фокального инсульта. Инсульт моделировали внутрисудистой окклюзией средней мозговой артерии под контролем локального мозгового кровотока. Окклюзия длилась 90 минут с последующей реперфузией. Препараты вводили животным в течение 21 дня, церебролизин – внутривентрикулярно в дозе 1,54 мг/кг, семакс – интраназально в дозе 0,165 мг/кг. Дозы были рассчитаны, исходя из терапевтических доз для человека с использованием коэффициента пересчета на крысу. Контролем служили животные с инсультом и введенным физиологическим раствором. Ложнооперированные животные служили отрицательным контролем. В течение 28 дней у животных тестировали моторную координацию (тест на вращающемся стержне) и локомоторную асимметрию (кетамин-индуцированное вращение). На 29 сутки мозг животных перфузировали через правый желудочек сердца 3% раствором параформальдегида. Изготавливали серийные криосрезы головного мозга, окрашивали их крезильным фиолетовым и при помощи 3D-реконструирования рассчитывали объем инфаркта. При тестировании локомоторной асимметрии эффективность проявил препарат семакс, моторной координации – церебролизин. При анализе объемов повреждения головного мозга было обнаружено, что введение церебролизина способствовало достоверно значимому уменьшению объема инфаркта относительно контрольных животных. Таким образом, можно сделать вывод о нейропротекторной активности обоих препаратов в отношении фокального инсульта головного мозга. Однако, более выражены эти свойства в условиях исследования были у церебролизина.



## COMPARATIVE INVESTIGATION OF NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF CEREBROLYSIN AND SEMAX IN RATS CD WITH FOCAL STROKE

*Tukhovskaya E.A., Sukhorukova N.A., Lobanova N.N., Murashev A.N.*

Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino, Russia

E-mail: tukhovskaya@fibkh.serpukhov.su

Stroke treatment is the huge clinical problems. One of the most perspective and applicable group of pharmacological agents having therapeutic activity for brain ischemia treatment – is nootropic drug products on neuropeptide basis, such as cerebrolysin and semax. Cerebrolysin - is hydrolyzate of purified porcine brain proteins, and consists of low-molecular-weight neuropeptides and free amino acids. Semax – is synthetic heptapeptide, analog of ACTH fragment 4-10. The aim of our study was to investigate and compare the effects of this drug products in rats with focal brain stroke. Stroke was initiated by transient intraluminal middle cerebral artery occlusion (MCAO). For the control if ischemia-reperfusion process we registered local blood flow. Occlusion lasted for 90 minutes with following reperfusion. Treatment with drugs lasted for 21 day. Cerebrolysin was intraperitoneally injected in dose 1.54 mg/kg, and semax – applicated intranasal in dose 0.165 mg/kg. Doses were calculated from therapeutic dosed for humans. Controls were sham-operated animals. Animals were tested for 28 days on motor coordination impairment (rotarod) and locomotor asymmetry (ketamine-induced rotation). At 29 day animals were brain-perfused through right hart ventricle with 3% paraform solution. Serial cryoslices were stained with cresyl violet. Brain infarction volume calculated using 3D-reconstruction. Semax was effective in reducing of locomotor asymmetry, and cerebrolysin improved motor coordination performance. Brain infarction analysis showed that cerebrolysin significantly reduced injury volume versus control MCAO-only animals. Therefore, it can be concluded that both drug products have neuroprotective activity concerning focal stroke. But cerebrolysin showed more significant effectiveness in experimental conditions.

## НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОПОРОШКОВ МЕТАЛЛОВ

*Фаткуллина Л.Д., Кривандин А.В., Иваненко Г.Ф., Бурлакова Е.Б., Голощапов А.Н.*

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

E-mail: fatkullina@sky.chph.ras.ru

Факс: (499)137-41-01; тел.: (495)939-71-81

Металлы в нанокристаллическом состоянии являются эффективными препаратами, которые обладают биологическим действием. Нанопорошки имеют низкую токсичность и образуют депо металлов в организме, что обеспечивает пролонгированный характер их действия. Поскольку функциональные свойства наночастиц металлов определяются их химическим и фазовым составами, формой и размерами частиц, мы провели рентгеновское дифракционное исследование структуры порошков, используемых в биологических экспериментах. Обнаружено, что нанокристаллические порошки металлов являются эффективными регуляторами роста при различных способах введения в организм животных и птиц. Внесение порошков в разных концентрациях в премиксы (витаминно-минеральные добавки) кормов для выращивания цыплят-бройлеров повышает продуктивность птиц на 7-15% и снижает затраты корма на единицу прироста живой массы на 3-9% при 100%-ной сохранности поголовья. Наибольший прирост живой массы бройлеров получен при добавлении в премиксы Fe:Zn:Cu в соотношении 12,5:6,0:1,7 г/тону, соответственно, при этом в контроле источником микроэлементов служил естественный уровень элементов корма. Усиление микроэлементного обмена при внесении порошков у птиц происходит за счет повышенного в 1,1-2,3 раза усвоения всех трех металлов из корма, что и приводит к интенсификации роста цыплят. Регистрация сигналов ЭПР органов и тканей мышей методом низкотемпературной ЭПР-спектроскопии показала, что введенный порошок железа активно разносится кровотоком по всему организму, а максимальное его накопление в органах наблюдается через неделю после введения. Обнаружено, что стимулирующее действие нанометаллов на рост птиц и регенерацию тканей животных происходит за счет усиления в 1,5 раза синтеза ДНК и белка в клетках на фоне увеличения количества фосфорсодержащих соединений, участвующих в энергетическом обмене (по данным <sup>31</sup>P-ЯМР спектроскопии). При введении наночастиц металлов изменяются липидный состав, а также параметры пероксидного окисления липидов и структурное состояние липидного бислоя клеточных мембран, которое оценивали методом ЭПР спиновых зондов. Возможно, уникальные свойства нанопорошков металлов, такие как развитая поверхность и геометрические размеры частиц, определяют характер их действия на биологические системы.



## SOME ASPECTS OF THE BIOLOGICAL EFFECTS OF METAL NANOPOWDERS

*Fatkullina L.D., Krivandin A.V., Ivanenko G.F., Burlakova E.B., Goloschapov A.N.*

Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, Russia

E-mail: fatkullina@sky.chph.ras.ru

Fax: (499) 137-41-01; tel.: (495) 939-71-81

Metals in nanocrystalline state are efficient chemicals that have biological activity. Nanopowders possess low toxicity and make metal depots in organism that provides prolonged influence. As far as the functional activity of metal nanoparticles may be dependent on their structure, we carried out X-ray diffraction analysis of the nanopowders used in this study. Nanocrystalline metal powders are efficient growth regulators under different forms of injection to organism animals and birds. Introduction of iron, zinc, copper nanopowders in different concentrations into premixes (vitamin-mineral additions) of food for broilers increases bird's mass by 7-15 percent and reduces feed cost by 3-9 percent without any loss of livestock. The largest augmentation of broiler growth was achieved with iron:zinc:copper supplement ratio 12.5:6.0:1.7 g/ton correspondingly (reference group had food with natural level of the same elements). The improvement in element exchange in organism of poultry is the result of the 1.1-2.3 times increase of absorption of all three metals from food that causes the intensification of poultry mass growth. These data confirm that nanodispersed metals may be used as microelement ingredients. EPR signal registration in organs and tissues by low-temperature EPR spectroscopy showed, that inserted powder is actively floated by blood stream throughout organism and maximal accumulation of ferromagnetic iron in organs is in one week after injection. It is established that in the basis of stimulative mechanism of nanopowders on growth and regeneration underlies the enhancement of DNA and protein synthesis in cells of mice against a background amount increase of phosphorous-containing products (according to  $^{31}\text{P}$ -NMR spectroscopy data), participating in energy exchange. The injection of metal nanopowders changes the lipid composition, lipid peroxide oxidation and structural state of lipid bilayer of cellular membranes which was rated by EPR spectroscopy method with the use of paramagnetic spin probes. Probably, unique behaviour of nanopowders, like developed surface and geometry of particles, determine their effect on biological system.

## ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОЙ ОЛИГОПЕПТИДАЗЫ В ИЗ ПСИХРОТОЛЕРАНТНОГО МИКРООРГАНИЗМА *SERRATIA PROTEAMACULANS*

*Хайруллин Р.Ф., Себякина Т.Ю., Михайлова А.Г., Руми Л.Д.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: bioraf@yahoo.com

Факс: (495) 335-71-03; тел.: (495) 330-63-74

Олигопептидазы В (OpdB) – сравнительно новая группа сериновых протеиназ с трипсиновой специфичностью, способных гидролизовать лишь небольшие (< 4 кДа) пептиды. OpdB обнаружены в грамотрицательных бактериях, одноклеточных эукариотах (лейшмании и трипаномы), а также в некоторых растениях. OpdB трипаносом играют ключевую роль в развитии трипаносомных инфекций. Биологические функции бактериальных OpdB до сих пор точно не установлены, предполагается, что они участвуют в процессинге пептидов клетки. Структура и энзимологические характеристики описаны лишь для небольшого числа бактериальных OpdB.

Из психротолерантного грамотрицательного микроорганизма *Serratia proteamaculans* с помощью ионообменной хроматографии на Q-сефарозе и аффинной хроматографии на ВРТИ-сефарозе была получена новая трипсиноподобная протеиназа (PSP). Препарат PSP, гомогенный по данным электрофореза в ПААГ, обладал молекулярной массой 78 кДа; определена N-концевая аминокислотная последовательность 1-10 и проведен масс-спектрометрический анализ триптических пептидов PSP. Показано, что данный фермент является ранее неизвестной OpdB.

Проведен субстратный и ингибиторный анализы PSP. Показано, что PSP обладает высокой субстратной специфичностью к субстратам с положительно заряженными остатками в P1 и P2 положениях и у нее отсутствует активность в отношении белковых субстратов. Сделано предположение о дополнительном гидрофобном центре, отвечающем за связывание фермента с ароматическими аминокислотными остатками субстратов и ингибиторов. Исследована pH- и температурная зависимость активности и стабильности PSP. Показано, что PSP проявляет свойства психрофильного фермента. Получен рекомбинантный фермент (His<sub>6</sub>-PSP), выявлено, что N-концевая гексагистидиновая последовательность не влияет на специфичность и активность (His<sub>6</sub>-PSP). Обнаружена высокая идентичность последовательности PSP с последовательностями OpdB возбудителей опасных инфекционных заболеваний человека и животных – *Yersinia pestis*, *Salmonella enterica*, *Trypanosoma cruzi* и *Trypanosoma brucei*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №07-04-00569) и ГК № 02.512.11.2208.

**ISOLATION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NOVEL OLIGOPEPTIDASE B FROM PSYCHROTOLLERANT MICROORGANISM *SERRATIA PROTEAMACULANS***

***Khairullin R.F., Sebyakina T.Yu., Mikhailova A.G., Rumsh L.D.***

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: bioraf@yahoo.com

Fax: (495) 335-7103; tel.: (495) 330-63-74

Oligopeptidase B (OpdB) is a relatively novel group of serine peptidases with a trypsin-like specificity that not hydrolyze proteins larger than 4 kDa. OpdB is present in Gram-negative bacteria, unicellular eukaryotes such as trypanosomes and leishmania, and some plants. It was demonstrated that trypanosomal OpdB is implicated in the pathogenesis of trypanosome infections. Physiological role of bacterial oligopeptidase has not been elucidated, but it is proposed that OpdB is a potential processing enzyme of prokaryotes, being very specific for the basic amino acid pairs of polypeptides.

A novel trypsin-like serine protease from the psychrotolerant microorganism *Serratia proteamaculans* was developed using ion-exchange chromatography on Q-Sepharose and affinity chromatography on BPTI-Sepharose. Electrophoretically homogeneous PSP preparation was obtained; the apparent molecular mass of proteinase was 78 kDa. N-Terminal sequence analysis of the first 10 residues and MALDI-MS peptide mass fingerprint analysis allow to establish, that PSP is a novel member of oligopeptidase B group.

Substrate and inhibitor specificity of PSP were investigated. PSP displays extremely high activity towards peptide substrates with basic residues in P1 and P2 positions and does not hydrolyze protein substrates. The existence of a hydrophobic binding site interacting with aromatic amino acids residues and hydrophobic inhibitors was proposed. Effects of temperature and pH on enzyme activity and stability were examined. It was shown that PSP demonstrate properties of psychrophilic enzymes. Recombinant enzymes were obtained, it was demonstrated no effects of polyhistidine tag on the PSP enzymatic activity. The PSP retained a high degree of identity with OpdB from several human and animal pathogens, such as *Yersinia pestis*, *Salmonella enterica*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*.

The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project No. 07-04-00569) and Government contract № 02.512.11.2208.

**НОВЫЕ ОПИОИДНЫЕ ПЕПТИДНЫЕ АГОНИСТЫ С АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЙ И КАРДИОПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

***Хохлова О.Н., Шайхутдинова Э.Р., Мурашев А.Н., Крапф Г.\*,  
Биссесар Э.\*, Боброва И.\****

Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, Россия

\*Eribis AB, Уппсала, Швеция

E-mail: khohlova@fibkh.serpukhov.su

Опиоидные анальгетики широко применяются в составе комбинированной терапии для купирования острой боли при стенокардии, инфарктах миокарда, хирургических операциях. Однако, наркотические анальгетики вызывают ряд побочных эффектов, что делает актуальным разработку новых безопасных препаратов с улучшенными кардиопротективными и анальгетическими свойствами.

Синтезирован ряд аналогов энкефалина, названных P91, P92, P93, P94 и P95, с потенциальными кардиопротективными свойствами методом твердофазной пептидной химии; гомогенность пептидов определена высокоэффективной жидкостной хроматографией; структурная идентификация пептидов выполнена анализом аминокислотной последовательности и масс-спектрометрией.

В данной работе были изучены анальгетические и кардиопротективные свойства новых пептидов в сравнении с опиоидным анальгетиком морфином. Исследование обезболивающей активности пептидов в тесте "горячая пластина" после их внутривенного введения мышам показало дозозависимость эффекта пептидов с соответствующими значениями ED50 (мкмоль/кг) 1.4 (P91), 3.3 (P92), 4.4 (P93), 6.9 (P94) и 1.6 (P95). Для сравнения, значение ED50 анальгетического действия морфина составляет 5.9 мкмоль/кг. Кардиопротективное действие пептидов было изучено *in vivo* на крысиной модели острого инфаркта миокарда после ишемии, вызванной окклюзией коронарной артерии, с последующей реперфузией. Пептиды P91 и P94 при введении перед окклюзией уменьшали размер инфаркта, выраженный как отношение площади инфарктной зоны к площади зоны риска (IS/AAR), на 30% по сравнению с контрольными животными (IS/AAR, 42.9±2.7%) с интервалом эффективных доз 0.5-5 мкг/кг и 0.14-3.5 мкг/кг, соответственно. Пептиды P92, P93 и P95 при введении в дозах 0.1 мкг/кг, 1 мкг/кг, 5 мкг/кг и 10 мкг/кг как перед ишемией, так и в момент начала реперфузии, не влияли на размер инфаркта. Морфин, введенный на 5 мин перед окклюзией в дозе 1 мг/кг, достоверно не изменял размер инфаркта (IS/AAR, 36.1±2.1% относительно 42.9±2.7%), однако, при дробном введении на 15, 10 и 5 мин перед окклюзией уменьшал IS/AAR по сравнению с контролем (33.3±2.7% и 42.9±2.7%, соответственно). Изучение аффинности пептида P94 к *mu*-, *delta*-, и *kappa*-опиоидным рецепторам методом радиолигандного связывания показало высокую агонистическую активность P94 ко всем трем типам изученных рецепторов с максимальной активностью в отношении *mu*-рецепторов. Результаты данной работы выявили высокую анальгетическую активность пептида P94 и его кардиопротективные свойства, проявляющиеся в меньших дозах по сравнению с морфином, что может иметь клиническое применение.

## NOVEL OPIOID PEPTIDE AGONISTS WITH ANALGESIC AND CARDIOPROTECTIVE ACTIVITY

*Khokhlova O.N., Shaikhutdinova E.R., Murashev A.N., Krapf H. \*, Bissessar E. \*, Bobrova I. \**

Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino, Russia

\*Eribis AB, Uppsala, Sweden

E-mail: khokhlova@fibkh.serpukhov.su

Opioid analgesics are the mainstay in the treatment of acute pain from angina, myocardial infarction, surgery etc. Adverse effects commonly associated with the use of narcotic analgesics create the prerequisites to develop new drugs with improved cardioprotective, analgesic and safety profiles.

A series of the enkephalin analogues named as P91, P92, P93, P94 and P95 with potential cardioprotective properties were designed and synthesized by the solid-phase methodology of peptide chemistry. Homogeneity of peptides was assessed by high performance liquid chromatography. Structure identification was achieved by amino acid analysis and mass spectrometry.

The antinociceptive and cardioprotective properties of these novel peptides and exogenous opioid morphine were investigated and compared in this work. The study of antinociception after intravenous administration to mice by the hot-plate test showed that the new peptides increased the effect in a dose-dependent manner with a corresponding ED<sub>50</sub> values of 1.4 (P91), 3.3 (P92), 4.4 (P93), 6.9 (P94) and 1.6 (P95)  $\mu\text{mol/kg}$ . In comparison, morphine increased antinociception in mice with ED<sub>50</sub> value of 5.9  $\mu\text{mol/kg}$ . The cardioprotective effects of peptides were evaluated *in vivo* in a rat model of the ischemia/reperfusion heart injury. The peptides P91 and P94, when applied prior to ischemia, reduced infarct size/area-at-risk (IS/AAR) up to 30% compared to untreated animals (control, IS/AAR, 42.9 $\pm$ 2.7%) with a range of effective doses 0.5-5  $\mu\text{g/kg}$  and 0.14-3.5  $\mu\text{g/kg}$ , respectively. The peptides P92, P93, and P95 administrated at the doses 0.1  $\mu\text{g/kg}$ , 1  $\mu\text{g/kg}$ , 5  $\mu\text{g/kg}$  or 10  $\mu\text{g/kg}$  either 5 min prior to ischemia or at 0 min of reperfusion have not significantly reduced the infarct size of rats. Morphine administrated at 5 min prior of occlusion (1 mg/kg) had no significant effect on infarct size (IS/AAR, 36.1 $\pm$ 2.1% versus 42.9 $\pm$ 2.7%) but significantly reduced the infarct size as compared with control (IS/AAR, 33.3 $\pm$ 2.7% versus 42.9 $\pm$ 2.7%) when administrated preconditionally at 15, 10 and 5 min before occlusion. Peptide P94 was also tested for the *mu*-, *delta*-, and *kappa*-affinity by the opioid receptor radioligand binding assay and displayed agonist activity toward all three types of opioid receptors with more high level of affinity to the *mu*-opioid receptor. These results demonstrated that P94 elicits a similar magnitude of antinociceptive activity in mice as that of morphine and has a cardioprotective activity at the low doses that can have potential for clinical application.

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ И РЕЗУЛЬТАТЫ ХИМИОТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ ЦИСПЛАТИНА ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ

*Хохрин Д.В., Хрунин А.В., Моисеев А.А.*

Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

E-mail: ectecon@mail.ru

Факс: (499) 196-02-21; тел.: (499) 196-02-10

Хорошо известно, что больные по-разному реагируют на одно и то же лечение. Наследственно обусловленные вариации в последовательностях генов, кодирующих ферменты метаболизма и другие молекулы, участвующие в распределении и реализации эффектов лекарств, рассматриваются как важнейшие составляющие индивидуальных различий токсичности и эффективности химиотерапии у пациентов. Учет генетического статуса пациентов может содействовать индивидуализации химиотерапии и оптимизации схем лечения.

В подходе к возможности предсказывать результаты химиотерапии на основе цисплатина у больных раком яичников мы исходили из анализа корреляций между выживаемостью и побочными эффектами лечения и полиморфизмом генов глутатион-S-трансфераз, генов репарации ДНК, а также генов *TP53* и *CYP2E1*, активность белковых продуктов которых соотносится с разными участками метаболизма цисплатина. Всего был проанализирован 21 полиморфизм в 10 генах (*GSTA1*, *GSTM1*, *GSTM3*, *GSTP1*, *GSTT1*, *ERCC1*, *XPD*, *XRCC1*, *TP53*, and *CYP2E1*) у 104 больных раком яичников женщин, получавших цисплатин в сочетании с циклофосфамидом. Обнаружена выраженная взаимосвязь между полиморфизмом *GSTP1* Ile105Val и временем до прогрессирования ( $\chi^2 = 12.116$ ,  $P = 0.0023$ ), интервал которого у больных, гомозиготных по аллелю "Ile", был достоверно больше, чем у больных с одним или двумя аллелями "Val" (log rank test,  $P = 0.0001$ ). Найденная корреляция сохранялась и после исключения из анализа пациентов, у которых химиотерапия проводилась в адьювантном режиме (log-rank test,  $P = 0.005$ ). Ассоциация с общей выживаемостью была отмечена для *GSTA1* -69C>T полиморфизма: пациенты с генотипом T/T имели большую продолжительность жизни по сравнению с обладателями C/C генотипа (log rank test,  $P = 0.044$  для всей выборки, и  $P = 0.025$  для группы без пациентов, получавших лечение в адьювантном режиме). Тромбоцитопения, анемии и нейропатия реже встречались среди пациентов с *GSTM1* 0/0 или *GSTM3* AGG/AGG генотипами. Тяжелая нейтропения была более характерна для обладателей генотипов *TP53* 72 Pro/Pro, *ERCC2* 312 Asp/Asn и *XRCC1* 399 Arg/Arg. Более высокий риск развития нефротоксичности был отмечен у пациентов с гетерозиготными *ERCC1* 19007 T/C и 8092 C/A генотипами. Достоверных ассоциаций между тем или иным генотипом исследованных локусов и частотой полных ремиссий выявлено не было.

## GENETIC POLYMORPHISM AND OUTCOME OF CISPLATIN-BASED CHEMOTHERAPY IN OVARIAN CANCER

*Khokhrin D.V., Khrunin A.V., Moiseev A.A.*

Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow, Russia

E-mail: ectecon@mail.ru

Fax: (499) 196-02-21; tel.: (499) 196-02-10

It is well recognized that different patients respond in different ways to the same medication. Inherited sequence variations in genes encoding drug-metabolizing enzymes and other molecules involved in drug disposition and effects are considered as responsible for much of the interindividual differences in the toxicity and efficacy of many chemotherapy agents. Selecting patients according to key genetic characteristics may help to tailor chemotherapy and optimize the treatment.

In our study we explored the possibility of predicting the outcomes of cisplatin-based treatment in women with ovarian cancer by correlating survival and adverse effects with individual polymorphism in the glutathione S-transferase and DNA repair genes, as well as *TP53* and *CYP2E1* genes, the protein activities of which may be addressed in different aspects of cisplatin metabolism. Totally 21 polymorphisms in 10 genes (*GSTA1*, *GSTM1*, *GSTM3*, *GSTP1*, *GSTT1*, *ERCC1*, *XPD*, *XRCC1*, *TP53*, and *CYP2E1*) were tested for correlations with efficacy and toxicity of cisplatin-cyclophosphamide regimen in 104 ovarian cancer patients. The *GSTP1* Ile105Val polymorphism was strongly associated with progression-free survival (PFS;  $\chi^2 = 12.12$ ,  $P = 0.002$ ): patients with a homozygous Ile/Ile genotype had an increased PFS compared with that of patients with one or two Val alleles (log-rank test,  $P = 0.0001$ ). The association remained significant in a further analysis after the exclusion of patients treated with adjuvant therapy (log-rank test,  $P = 0.005$ ). The allelic status of the *GSTA1* -69 C>T polymorphism correlated with overall survival: patients with T/T genotype survived longer than C/C carriers (log-rank test,  $P = 0.044$  for all patients, and  $P = 0.025$  if patients with adjuvant chemotherapy were excluded). Thrombocytopenia, anemia and neuropathy were less frequent among patients with the *GSTM1*-null or *GSTM3* intron 6 AGG/AGG genotypes. Severe neutropenia was associated with the *TP53* 72 Pro/Pro, *XPD* 312 Asp/Asn and *XRCC1* 399 Arg/Arg genotypes. A higher risk of nephrotoxicity was noted for patients with the heterozygous *ERCC1* 19007 T/C and 8092 C/A genotypes. No correlations were found between genotypes and complete tumor responses.

## СКОРОСТЬ ПРОЯВЛЕНИЯ И РОСТА ПЕРЕВИТОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ИНСУЛИН-ЗАВИСИМОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ У МЫШЕЙ BALB/C

*Хрипкова Н.А., Семушина С.Г., Александровский Я.А. \*, Моисеева Е.В.*

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

\*Группа "Канторфоршунг", Баден-Баден, Германия

E-mail: evmoiseeva@ibch.ru

**Введение.** Данные по механизмам взаимодействия метаболических процессов в условиях совместного протекания рака молочной железы (РМЖ) и сахарного диабета (СД) противоречивы. Большинство авторов склоняется к выводу о связи СД (особенно инсулин-независимого, типа II) с повышенным риском РМЖ. Однако, в ряде работ было показано, что частота РМЖ среди больных СД была сопоставимой или даже ниже, чем в популяции женщин, не больных СД. Данные по связи инсулин-зависимого СД (ИЗСД, тип I) и РМЖ практически отсутствуют. Целью нашей работы было выяснить, сможет ли экспериментальный ИЗСД повлиять на скорость проявления и роста перевитого РМЖ и на выживание мышей-реципиентов.

**Методы.** *Опыт 1.* Сначала у самок мышей BALB/c вызвали ИЗСД путем п.к. однократного введения аллоксана (400 мг/кг, n=40), на день 0. Контрольные мыши (n=19) получили одновременно инъекцию физиологического раствора. Через 2 недели всем реципиентам (n=59) ввели п.к. сингенные опухолевые клетки (ОК) РМЖ. *Опыт 2.* ИЗСД вызвали таким же образом у самок мышей BALB/c (n=36) на 22 день после перевивки им ОК во время латентного периода роста РМЖ. Уровень глюкозы измеряли индивидуально в капле венозной крови из хвостовой вены с помощью прибора Accu-Chek Active, Roche, Германия.

**Результаты.** От половины до трети реципиентов погибали вскоре после введения аллоксана, примерно у 1/2 выживших самок в крови регистрировалась гипергликемия (ГК<sup>+</sup>), и у 1/2 – нет (ГК<sup>-</sup>). Проявление опухоли в *Опыте 1* было простимулировано у ГК<sup>+</sup> мышей (n=11): 82% опухолей пальпировалось на 25-й день после введения аллоксана (против 36 и 26% у ГК<sup>-</sup> (n=11) и контрольных (n=19) групп, соответственно). Однако, скорость роста уже проявившихся опухолевых узелков в условиях ГК была замедлена по сравнению с контролем. В *Опыте 2* скорость и проявления, и роста узелков у ГК<sup>+</sup> мышей (n=10) была засупрессирована и выживали они дольше, чем контрольные (n=10). Опухоли ГК<sup>-</sup> мышей занимали промежуточное положение по скорости проявления и роста опухоли в обоих экспериментах.

**Выводы.** При аллоксановом ИЗСД мышей, вызванном до перевивки опухоли, проявление РМЖ было простимулировано по сравнению с контролем. Однако, ингибирование скорости роста РМЖ в условиях ГК наблюдалось независимо от последовательности событий. Наши результаты, вероятно, проливают свет на противоречия в литературных данных по связи РМЖ и СД у человека. Укороченный латентный период роста РМЖ в условиях ГК может привести к более высокой частоте РМЖ среди пациентов с СД, но ГК во время латентного периода – к замедлению проявления и последующего роста РМЖ. Полученные данные являются основанием для проведения новых исследований на спонтанных мышинных моделях РМЖ.



## TUMOR MANIFESTATION AND GROWTH RATE OF TRANSPLANTED MAMMARY CANCER FOLLOWING INSULIN DEPENDENT DIABETES MELLITUS

*Khripkova N.A., Semushina S.G., Aleksandrovski J.A. \*, Moiseeva E.V.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

\*Kantorforschungsgruppe, Baden-Baden, Germany

E-mail: [evmoiseeva@ibch.ru](mailto:evmoiseeva@ibch.ru)

**Introduction.** Studies concerning the mechanisms of metabolic processes interactions in a combined diabetes mellitus (DM) and breast cancer (BC) condition show controversial results. The majority of authors concluded that DM (especially, DM type 2) is linked to a higher incidence of BC. However, some of investigations demonstrated incidences of BC that were comparable or even lower than those in non-diabetic subjects. Data on insulin-dependent DM (IDDM, type1) and BC is hardly found. Our aim was to study whether untreated experimental DM may affect manifestation time and tumor growth rate of transplanted mouse mammary carcinoma (MC) and recipient survival.

**Methods.** *Experiment 1.* Firstly, alloxan induced DM (AIDM) was established. At day 0 alloxan was injected s.c. to the BALB/c females (400 mg/kg, n=40), control mice were injected with physiologic fluid in the same manner (n=19). Then, two weeks later syngeneic MC cells ( $10^6$  per mouse) were s.c. transplanted to all mice. *Experiment 2.* AIDM was established in the other set of transplanted MC bearing mice (n=36) during the latent period of tumor growth (day 22 *post* transplantation). Tumor manifestation time and growth rates of individual nodules have been compared in  $HG^+$ ,  $HG^-$  and control mice. Glucose level was checked once a week individually in a sample of tail vein blood by Accu-Chek Active, Roche, Germany.

**Results.** In our experiments about one third to half of recipients died early after alloxan injection, about 1/2 of survivors showed and 1/2 did not show signs of hyperglycaemia ( $HG^+$  and  $HG^-$ , respectively). Tumor manifestation in *Experiment 1* was stimulated in hyperglycaemic animals (n=11) since 82% of the nodules were palpable in  $HG^+$  mice at day 25 *post* alloxan injection (versus 36 and 26% in  $HG^-$  (n=11) and control (n=19) group, respectively). However, visible tumor growth rate was significantly suppressed in those  $HG^+$  mice comparing with a control rate; tumors of  $HG^-$  mice demonstrated intermediate growth rate. Both tumor manifestation and growth rates were inhibited in  $HG^-$  mice (n=10) comparing with the control rates (n=10) in *Experiment 2*. Survival of those  $HG^+$  mice was prolonged. Tumors from  $HG^-$  (n=8) mice demonstrated intermediate rate of palpable appearance, visible tumor growth, and survival dynamics.

**Conclusions.** MC emerged earlier in  $HG^+$  mice when AIDM was established *prior* to tumor transplantation. However, inhibition of tumor growth rate was always observed under  $HG^+$  conditions. Our results may shed light on some discrepancies in literature data: reduced latent period of MC under the long lasting HG conditions may point to higher BC incidence among diabetic patients, but HG during latent period of BC may result in postponed tumor manifestation and growth. Obtained data warrant new investigations in spontaneous mouse models of human BC.

## СОЗДАНИЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ МИКРОНОСИТЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ МОЛОЧНОЙ И СОПОЛИМЕРОВ МОЛОЧНОЙ И ГЛИКОЛЕВОЙ КИСЛОТ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

*Цой А.М., Севрин Ш. \*, Грандфис К. \*, Марквичева Е.А.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

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

Факс: (495) 335-10-11; тел.: (495) 336-06-00

\*Центр биоматериалов Университета г. Льеж, Бельгия

Синтетические алифатические полиэфиры молочной кислоты (PLLA) и сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA) находят широкое применение в тканевой инженерии благодаря их механическим свойствам, биосовместимости и биodeградируемости. Эти полимеры могут быть использованы для культивирования клеток *in vitro* с целью их дальнейшего применения в качестве имплантантов для репарации тканей. Создание микроносителей на основе PLLA и PLGA полимеров направлено на улучшение прикрепления и распластывания клеток, их пролиферации и дифференциации. Целью данной работы была оптимизация получения новых PLLA и PLGA микрочастиц с дальнейшей модификацией их поверхности и использования для культивирования клеток *in vitro*.

Для получения PLLA и PLGA микрочастиц в работе был использован метод простой эмульсии типа масло/вода. После очистки и лиофильной сушки микрочастицы были охарактеризованы с помощью Coulter Counter Multisizer и оптического микроскопа. Средний размер PLLA микрочастиц составил 125-250  $\mu\text{m}$ , PLGA микрочастиц – 60-170  $\mu\text{m}$ , что объясняется большей молекулярной массой исходного PLLA полимера и является более подходящим для микроносителей (оптимальный размер микроносителей 150-300  $\mu\text{m}$ ). С помощью сканирующей электронной микроскопии было показано, что поверхность микрочастиц из аморфного PLGA полимера была гладкой и ровной, в то время как PLLA микрочастицы имели нерегулярную структуру, что связано с разной степенью кристалличности полимеров. Для обеспечения прикрепления клеток поверхность PLLA микрочастиц модифицировали путем физической сорбции хитозана и полидиметиламиноэтилметакрилата. Для исследования возможности культивирования клеток на поверхности PLLA микрочастиц были использованы мышинные фибробласты L929. Наблюдались прикрепление, распластывание и пролиферация клеток на поверхности микрочастиц.

Таким образом, PLLA микрочастицы могут быть предложены в качестве микроносителей для культивирования клеток и их дальнейшего применения в тканевой инженерии.



## DEVELOPMENT OF BIODEGRADABLE MICROCARRIERS BASED ON POLY(L-LACTIDE) AND POLY(LACTIDE-CO-GLYCOLIDE) FOR TISSUE ENGINEERING

*Tsoy A.M., Sevrin Ch.\*, Grandfils Ch.\*, Markvicheva E.A.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: tsoyanna@gmail.com

Fax: (495) 335-10-11; tel.: (495) 336-06-00

\*Interfaculty Biomaterial Center (CEIB), University of Liege, Belgium

Synthetic polyesters, such as poly(L-lactide) (PLLA), polyglycolide (PGA) and poly(lactic-co-glycolide) are attractive biomaterials for tissue engineering due to their mechanical properties, biocompatibility and biodegradability. These materials can be customized to be used for cell cultivation *in vitro* with a view to implant them for promoting tissue repair. Microcarriers can be designed to improve cell attachment, spreading, proliferation and differentiation. One of a key parameters promoting cell growth which should be taken into consideration is grafting adhesion moieties on the microcarrier surface. The aim of the study was to prepare and optimize novel PLLA and PLGA microbeads for their further surface modification, in order to promote cell adhesion. Preliminary *in vitro* study on cultivation of animal cells on the obtained microbeads has been also carried out.

To prepare PLLA and PLGA microbeads an oil/water emulsion/evaporation technique was adopted. After purification and drying microbeads were characterized using Coulter Counter Multisizer as well as by optical microscopy combined with image analysis software (Lucia, Nikon). The mean size of PLLA microbeads was biggest (125-250  $\mu\text{m}$ ) compare to the PLGA microbeads (60-170  $\mu\text{m}$ ) due to a highest molecular mass of used PLLA polymer which are more appropriate microcarrier size for cell cultivation (150-300  $\mu\text{m}$ ). The microbead surface morphology was observed by Scanning Electron Microscopy (SEM). In relation to the difference of crystallinity between two polymers, an important contrast in surface roughness between two microcarrier sets was observed. While amorphous PLGA allows to produce smooth microbeads, irregular surface morphologies were observed in the case of microbeads prepared from semi-crystalline PLLA. In order to promote cell attachment to PLLA microbead surface, the microbeads were modified by a physical sorption of chitosan or poly(dimethylaminoethylmethacrylate) (PDMAEMA). Mouse fibroblasts L929 as model animal cells were used to test the obtained modified microbeads as potential microcarriers. The cells were found to attach, to spread and to proliferate on microbead surface. It was shown by SEM that in the case of PDMAEMA surface modification cell attachment and growth was better.

Thus, *in vitro* study showed rather good cell attachment and proliferation on PLLA microbead surface. After further optimization PLLA microbeads could be proposed as cell microcarriers for tissue engineering.

## ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ПРОДУКЦИИ БЫТОВОГО НАЗНАЧЕНИЯ И ТОВАРОВ ДЛЯ ДЕТЕЙ С ПОМОЩЬЮ БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

*Чепкова И.Ф., Ануфриев М.А.*

Тульский государственный университет, Тула, Россия

E-mail: chem@tsu.tula.ru

Факс/тел.: (4872) 35-18-40

В токсикологии наряду с традиционными методами контроля применяют биологическое тестирование. Получаемая с помощью данных методов информация характеризуется интегральным характером восприятия и отражения всех токсических воздействий, обусловленных совместным присутствием токсикантов. Действие ксенобиотиков-токсикантов на микроорганизмы непосредственно связано с потреблением ими кислорода. В зависимости от типа микроорганизмов может наблюдаться увеличение дыхательной активности в присутствии некоторых органических ксенобиотиков или снижение дыхания за счет ингибирующего действия токсикантов.

Исследовалась возможность применения биосенсора на основе "иммобилизованные микроорганизмы – кислородный электрод типа Кларка" для оценки токсичности. Для работы были отобраны образцы обуви, одежды, игрушек с известными результатами токсикологической экспертизы, исследованные в лаборатории ФГУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Тульской области", которые получили неудовлетворительные результаты экспертизы по индексу токсичности на анализаторе изображений АТ-05, запаху, завышенному содержанию фенола, альдегидов, цинка, присутствию производных фталевой кислоты, несоответствию рН. В качестве образцов сравнения выбрали: детскую игрушку и материал, контактирующий с пищевыми продуктами (пластиковую бутылку). Образцы сравнения получили удовлетворительные санитарно-гигиенические заключения.

Для создания рецепторного элемента использовали иммобилизованные клетки различных штаммов микроорганизмов (*Pseudomonas putida* BS3701 (pBS1141)(pBS1142), *P. putida* BS394, *Escherichia coli* K-12, *E. coli* TOP10, *Hansenula polymorpha* NCYC 945 ln), принадлежащих ИБФМ РАН в Пушкино и ФГУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Тульской области". Иммобилизацию микроорганизмов осуществляли включением биомассы отдельных штаммов в агаровый гель. Сигнал с кислородного электрода регистрировали подключенным к нему потенциостатом.

При добавлении вытяжки из анализируемых объектов в измерительную кювету биосенсора происходит изменение концентрации кислорода, растворенного в приэлектродной водной среде, вызванное воздействием вытяжки на метаболическую активность микроорганизмов. Измеряемым параметром (ответом биосенсора) являлась максимальная скорость изменения выходного сигнала биосенсора при добавлении субстратов. Выходной сигнал – сила тока, обратно пропорциональная концентрации кислорода в приэлектродном пространстве.

Было проанализировано 9 образцов товаров народного потребления относительно холостого опыта по четырем временам экспозиции (1, 6, 24 и 96 часов) с помощью пяти вышеуказанных штаммов микроорганизмов, и получены данные о способности исследуемых штаммов микроорганизмов различать возможную токсичность исследуемых объектов. Ответы биосенсора, выраженные в нА/мин, можно использовать как количественный показатель степени токсичности образцов. Основываясь на оценке токсичности образцов, исследованных с помощью АТ-05 и санитарно-химических методов, проведена корреляция данных исследования образцов с помощью микробных сенсоров на основе штаммов *E. coli* K-12, *P. putida* BS394, *P. putida* BS3701 и токсикологической экспертизы. О возможности применения биосенсора для количественной оценки при исследовании токсичности говорит и тот факт, что обнаруживается прямая зависимость отклика биосенсора от разведения водных вытяжек. Данный метод целесообразно применять для предварительных исследований однородной продукции, сходных химических соединений, а также в качестве моделей, дополняющих традиционные.

## ESTIMATION OF TOXICITY OF HOUSEHOLD PRODUCTS AND GOODS FOR CHILDREN BY MEANS OF IMMOBILIZED MICROORGANISMS BIOSENSOR

*Chepkova I.E., Anufriev M.A.*

Tula State University, Tula, Russia

E-mail: chem@tsu.tula.ru

Fax/tel.: (4872) 35-18-40

In toxicology alongside with traditional methods of control biological testing is used. The information acquired is characterized by integral nature of perception and by reflection of all toxic effects, conditioned by co-presence of toxicants. The influence of xenobiotics-toxicants on microorganisms is directly connected with their consumption of oxygen. Depending on the type of microorganisms there can be noticed the increase of respiratory activity in presence of some organic xenobiotics or reduction of breathing due to inhibiting effect of toxicants.

The possibility of use of a biosensor based on "immobilized microorganisms - the Clark-type oxygen electrode" for toxicity estimation was studied. There were chosen some samples of footwear, clothes and toys with the known results of toxicological examination conducted by the laboratory of FSHE "Centre of Hygiene and Epidemiology in Tula Region", which had got unsatisfactory results of the expert operation on the index of toxicity on the analyzer of scents AT-05, scent, excess presence of phenol, aldehydes, zinc, products of phthalic acid, PH level discrepancy. As a sample of comparison there was chosen a toy and some material, contacting with food-stuffs (a plastic bottle). The samples of comparison got satisfactory sanitary-hygienic results.

For making the reception element there have been used the immobilized hutches of different types of microorganism (*Pseudomonas putida* BS3701 (pBS1141)(pBS1142), *P. putida* BS394, *Escherichia coli* K-12, *E. coli* TOP10, *Hansenula polymorpha* NCYC 945 In), belonging to the laboratory of FSHE "Centre of Hygiene and Epidemiology in Tula Region" and Skriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS, Pushchino. The immobilization of microorganisms was conducted by putting the biomass of separate cultures in agar gel. The signal from the oxygen electrode was registered with the help of potentiostat.

At adding the extraction from the object analyzed into the measuring ditch of the biosensor some change in concentration of oxygen dissolved in water close to the electrode, caused by the influence of the extraction on metabolic activity of microorganisms, occurs. The measured parameter (the response of the biosensor) is the maximum speed of the change of the outgoing signal of the biosensor at the adding of substratum. The output signal – amperage, is inversely proportional to concentration of oxygen close to the electrode.

Nine samples of consumer goods were analyzed comparatively to blank test for four phases of exposure (1, 6, 24 and 96 hours) by means of five cultures of microorganisms mentioned above and some data about the diverse capacity of the investigated cultures to distinguish the possible toxicity of studied objects were acquired. The "answers" of the biosensor, expressed in nA/min, can be used as a quantitative indicator of the degree of the sample toxicity. Taking into account the estimation of toxicity of samples, explored by means of AT-05 and sanitary-chemical methods, there has been conducted the correlation of data got by means of microbial sensor based on cultures of *E. coli* K-12, *P. putida* BS394, *P. putida* BS3701 and toxicological examination.

The fact that there is a direct dependence of the biosensor response on the degree of extract dilution proves that the biosensor can be used for quantitative toxicity estimation.

The given method is reasonable to be used for preliminary studies of homogeneous products, similar chemical compounds, as well as models, complementing traditional methods.

## РАСТИТЕЛЬНОЙ ПРЕПАРАТ ИЗ *SILENE SUSSAMYRICA* ДЛЯ БОРЬБЫ С КАЛИФОРНИЙСКИМ ТРИПСОМ

*Черменская Т.Д., Щеникова А.В., Чакаева А.Ш.\**

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

\*Кыргызский НИИ животноводства и пастбищ, Бишкек, Кыргызстан

E-mail: tchermenskaya@yandex.ru

Факс: (812) 470-51-10; тел.: (812) 470-43-84

Исследования последних лет в мире направлены на поиск биологически активных веществ растительного происхождения, которые могли бы применяться для защиты растений в качестве ботанических пестицидов. Большое внимание уделяется биопестицидам, характеризующимся высокой избирательностью действия на целевые объекты и сочетающим в себе несколько типов биологической активности. При изучении инсектицидной активности экстрактов из 123 видов растений Кыргызстана был установлен токсический эффект этанольного экстракта из наземной части растения *Silene sussamyrica* Lazkov (Caryophyllaceae) против калифорнийского трипса *Frankliniella occidentalis* Perg., распространенного вредителя культур защищенного грунта. До настоящего времени не сообщалось о пестицидных свойствах этого растения. В лабораторных условиях при воздействии 1% экстракта смертность личинок на пятые сутки достигала 46,4%. Гибель происходила при линьке и переходе на следующую стадию развития. При изучении влияния 1% раствора препарата из *S. sussamyrica* (препаративная форма: экстракт – 10%, ДМФА – 80%, Твин-60 – 10%) на гетерогенную популяцию калифорнийского трипса в теплице эффективность препарата достигала 77,4% и сохранялась в течение 2-х недель. Препарат также оказывал репеллентное действие средней степени на самок трипса (33%) и приводил к снижению численности потомства на 61,6%. С целью выделения активного начала экстракт *S. sussamyrica* был разделен на фракции путем последовательных переэкстракций с использованием органических растворителей с увеличивающейся полярностью. Четыре фракции из пяти протестированных проявили высокую ларвицидную активность в отношении калифорнийского трипса, биологическая эффективность варьировала в пределах 50-70%. Инсектицидная активность этилацетатной и водной фракций была выше, чем у исходного экстракта. На пятые сутки смертность насекомых достигала 68,0%. Известно, что род *Silene* характеризуется высоким содержанием фитостероидов. Принимая во внимание характер действия фракций, экстракта и литературные данные, можно предположить, что инсектицидная активность связана с присутствием этого класса соединений. Наличие фитостероидов во всех активных фракциях и в исходном экстракте было подтверждено нами методами тонкослойной хроматографии. На основании полученных результатов была разработана схема получения комплекса веществ, эффективного против калифорнийского трипса. Способ основан на экстракции фитостероидов из растительного сырья органическим растворителем (этанолом) с последующей очисткой перераспределением между двумя несмешивающимися растворителями

(гексан-вода) и извлечении их из водной фазы бутанолом. Биологическая эффективность против личинок трипса лабораторного образца препарата превышала 80%, суммарная смертность особей трипса за 5 дней составила 85,2%. Полученный препарат характеризуется не только прямым токсическим действием на личинки вредителя, но и способен влиять на процессы, происходящие внутри насекомого, оказывая негативное воздействие на последующие стадии развития. В отличие от многих биопестицидов растительного происхождения, препарат из *S. sussamyrica* проявлял избирательность действия, влияя только на калифорнийского трипса.

## PLANT PREPARATION FROM *SILENE SUSSAMYRICA* AGAINST WESTERN FLOWER THRIPS

*Chermenskaja T.D., Shchenikova A.V., Chakaeva A.Sh. \**

All-Russia Institute of Plant Protection, St.-Petersburg, Pushkin, Russia

\*Kyrgyz Scientific Research Institute of Livestock Breeding and Pastures,

Bishkek, Kyrgyzstan

E-mail: tchermenskaya@yandex.ru

Fax: (812)470-51-10; tel.: (812)470-43-84

Researches of last years in the world are directed on search of biologically active substances of plant origin which could be applied to protection of plants as botanical pesticides. The big attention is given the biopesticides with high selectivity action on target objects, and combining some types of biological activity. During investigation of insecticidal activity of extracts from 123 species of plants from Kyrgyzstan the toxic effect of ethanol extract from an aerial part of plant *Silene sussamyrica* Lazkov (Caryophyllaceae) against western flower thrips (WFT) *Frankliniella occidentalis* Perg., the widespread pest of the greenhouse plants has been determined. The pesticidal properties of this plant were not described to present time. In laboratory bioassays mortality of larvae was 46,4% at the 1% concentration of extract and was the result of moulting on the following stage of development. During research of influence of 1% solution of formulation from *S. sussamyrica* (extract – 10%, DMFA – 80%, the Tween-60 – 10%) on a heterogeneous population thrips in greenhouse, efficiency was 77,4% and kept during 2 weeks. The formulation had the repellent effect of an average degree to thrips female (33%) and reduced the numbers of offspring on 61,6%. For isolation of active substances the extract of *S. sussamyrica* has been divided into fractions by consecutive extractions with organic solvents with increasing polarity. Four fractions of five tested have shown high larvicidal activity to WFT, biological efficiency varied within 50-70 %. Insecticidal activities of ethylacetate and water fractions were higher, than at an initial extract. On the fifth day death rate of insects reached 68,0%. It is known, that plant genus *Silene* is characterized by the high content of phytoecdysteroids. Considering character of action of fractions and an extract and the literature data, it is possible to assume, that insecticidal activity is concerned with presence of this class of compounds. Presence of phytoecdysone in all active fractions and in crude extract has been confirmed by us by thin-layer chromatography. On the basis of the received results the scheme to obtain the complex of substances, effective against WFT has been developed. The method is based on extraction of phytoecdysone from plant material by organic solvent (ethanol) with the subsequent clearing by redistribution between two not mixing up solvents (hexane-water) and extraction from the water phase by butanol. Biological efficiency a laboratory sample of preparation against thrips larvae exceeded 80 %, total mortality of individuals for 5 days was 85,2%. The received preparation is characterized not only direct toxic action on larvae of pest, but is capable to influence the processes occurring inside an insect also, rendering negative influence on the subsequent stages of development. In contrast to many botanical pesticides, the preparation from *S. sussamyrica* showed selectivity of action, influencing only on western flower thrips.

## ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА АУТОУБИКВИТИЛИРОВАНИЯ БЕЛКА Ubc13 (UBE2N) С ПОМОЩЬЮ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

*Чернорудский А.Л.<sup>1</sup>, Кондратьева Е.В.<sup>1</sup>, Жаберева А.С.<sup>1</sup>, Згода В.Г.<sup>2</sup>, Гайнуллин М.Р.<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>НИИ прикладной и фундаментальной медицины, Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup>НИИ биомедицинской химии РАМН, Москва, Россия

<sup>3</sup>IBILI, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal

E-mail: chalbio@mail.ru

Факс/тел.: (831) 465-42-81

Убиквитилирование представляет собой процесс ковалентного присоединения небольшого белка убиквитина к остатку лизина на поверхности белка-мишени. Такая пост-трансляционная модификация регулирует время жизни и функциональную активность большого числа клеточных белков. Белок Ubc13 (UBE2N) – представитель обширного класса убиквитин-конъюгирующих ферментов. Он играет важную роль в процессах иммунного ответа и регуляции активности факторов транскрипции NFκаррaВ и p53. Комплекс Ubc13 с адаптерным белком Mms2 или Uev1A синтезирует мультиубиквитиновые цепи, что обуславливает его участие в процессах репарации ДНК. Интересно, что в случае отсутствия адаптерных белков, Ubc13 катализирует реакцию переноса убиквитина на собственные остатки лизинов, т.е. аутоубиквитируется. Механизмы и физиологическое значение данного феномена остаются плохо изученными.

Целью нашего исследования была идентификация сайтов аутоубиквитилирования в молекуле Ubc13. После проведения реакции аутомодификации *in vitro* убиквитилирование Ubc13 было подтверждено с помощью метода иммуноблоттинга. После оптимизации условий реакции *in vitro* продукты реакции разделялись с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и после окраски Coomassie G250 подвергались трипсинолизу в геле. Полученные в результате пептиды анализировались с помощью метода tandemной масс-спектрометрии (LC-MS/MS). В результате анализа полученных спектров для Ubc13 удалось идентифицировать ряд специфических пептидов, один из которых содержит сайт убиквитилирования – Lys92. Расположение данного сайта вблизи каталитического центра белка Ubc13 указывает на регуляторную роль, которую играет процесс аутомодификации. Кроме того, анализ спектров показал присутствие среди продуктов реакции *in vitro* мультиубиквитиновых цепей различной архитектуры. Таким образом, нами впервые установлено, что Ubc13 может синтезировать мультиубиквитиновые цепи даже в отсутствие адаптерных белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 08-04-01816-а и 08-04-97107-р\_поволжье\_а).



## PROBING THE MECHANISM OF AUTOUBIQUITYLATION OF UBC13 (UBE2N) PROTEIN USING MASS SPECTROMETRY

Chernorudskiy A.L.<sup>1</sup>, Kondratieva E.V.<sup>1</sup>, Zhabereva A.S.<sup>1</sup>, Zgoda V.G.<sup>2</sup>, Gainullin M.R.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Applied and Fundamental Medicine, Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russia

<sup>2</sup>Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Moscow, Russia

<sup>3</sup>IBILI, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

E-mail: chalbio@mail.ru

Fax/tel.: (831) 465-42-81

Ubiquitylation is a process of covalent attachment of small protein ubiquitin to a lysine residue on a surface of target protein. This post-translational modification regulates lifetime and functional activity of many cellular proteins. Ubc13 protein is a member of a large class of ubiquitin-conjugating proteins. Ubc13 plays an important role in immune response processes and regulation of activity of transcription factors NFκB and p53. Complex of Ubc13 with Mms2 or Uev1a adapter protein synthesizes multiubiquitin chains that act in processes of DNA repair. In the case of absence of adapter proteins, Ubc13 catalyzes transfer of ubiquitin to enzyme's own lysine residues, i.e. autoubiquitylation. Mechanisms and physiological significance of this phenomenon remain poorly understood.

The present research aimed to identify particular autoubiquitylation sites in Ubc13 molecule. An *in vitro* automodification reaction was carried out and Ubc13 ubiquitylation was confirmed by Western blotting. The reaction conditions were then optimized. The reaction products were separated by polyacrilamide gel electrophoresis, stained by Coomassie G250 and subjected to in-gel trypsinolysis. The resulting peptides were analyzed by tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The analysis of obtained spectra allowed identification of specific Ubc13 peptides, including one containing ubiquitylation site - Lys92. Location of this residue near the catalytic site of Ubc13 points to a regulatory role of automodification process. Moreover, spectra analysis revealed multiubiquitin chains of various structures among products of *in vitro* reaction. Thus, it was shown for the first time that Ubc13 can synthesize multiubiquitin chains even in the absence of adapter proteins.

This work was supported by Russian Foundation for Basic Research grants 08-04-01816 and 08-04-97107.

## АЛЬТЕРНАТИВНАЯ ИНИЦИАЦИЯ ТРАНЛЯЦИИ ГЕНА *speA*, СУПРЕССИРУЮЩЕГО ПАТОГЕННОСТЬ *ERWINIA CAROTOVORA*

Чернышов С.В., Гороховатский А.Ю., Бурьянов Я.И.

Филиал Института биоорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия

E-mail: svch2@rambler.ru

Плазмида pAM28 при ее введении в клетки *Erwinia carotovora* супрессирует патогенность этих бактерий. На плазмиде локализованы два гена: *rep*, кодирующий белок из 302 аминокислот и, предположительно, ответственный за репликацию плазмиды, и *speA*, обеспечивающий функцию супрессии патогенности. Структурная часть гена *speA* представляет собой протяженную открытую рамку считывания (ОРС), состоящую из 368 аминокислот. В пределах данной ОРС имеются 6 кодонов АТГ, потенциально претендующих на роль иницирующих. Перед тремя из них (start 2, start 4 и start 6) располагаются пурин-богатые участки, в большей или меньшей степени обладающие гомологией с последовательностью Шайна-Дальгарно (SD1, SD2 и SD3, соответственно). Три других кодона (start 1, start 3 и start 5) лишены SD последовательностей.

Для тестирования возможных участков инициации трансляции как изолированно, так и в нативном генетическом окружении плазмиды pAM28 была разработана схема их клонирования под промотором РСН. В качестве репортерного использовали ген *egfp*. Был получен ряд конструкций, которыми трансформировали *E. coli* с целью проверки функциональной активности *in vivo* различных последовательностей SD. По флуоресценции трансформированных клеток было показано, что эффективная трансляция репортерного гена происходила лишь тогда, когда перед ним располагались последовательности SD2 или SD3. Присутствие перед геном *egfp* последовательности SD1 приводило к слабой его трансляции и свечению бактериальных клеток, заметно лишь под флуоресцентным микроскопом. Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о различной функциональной активности всех трех исследованных структур. Для ответа на вопрос: какая же из трех последовательностей SD гена *speA* предпочтительно используется в клетке и, соответственно, с какого из потенциальных стартовых кодонов начинается трансляция мРНК гена, было решено определить размер GFP-содержащего химерного белка. Белок такой природы может синтезироваться в клетках, трансформированных плазмидой РСН-start6. В данной генетической конструкции перед ОРС гена *egfp* располагается часть ОРС гена *speA*, содержащая все три последовательности SD. В результате Вестерн-блот анализа, проведенного с применением поликлональных антител к GFP, было показано, что помимо мажорного белка размером 32 кДа имеется ряд минорных сигналов, соответствующих белкам с молекулярными массами 44, 48 и 58 кДа. При сопоставлении численных значений теоретически рассчитанных молекулярных масс химерных GFP-содержащих белков, которые могут синтезироваться с использованием



различных иницирующих кодонов, с полученными в эксперименте величинами, мы пришли к выводу об одновременном, но неравнозначном участии в инициации трансляции всех трех последовательностей SD. Результаты проведенных исследований свидетельствуют также об инициации трансляции и со стартовой точки 1. Причем для этого необходимо, по всей вероятности, присутствие нуклеотидной последовательности, расположенной между стартовыми точками 1 и 2, поскольку клонирование гена *egfp* непосредственно под стартовую точку 1 не приводит к его экспрессии. Таким образом, полученные данные позволяют говорить об одновременной инициации трансляции с использованием нескольких стартовых точек гена *egfp*, имеющего в своем составе 3'-концевую последовательность гена *speA*. При этом происходит синтез белковых молекул, различающихся между собой протяженностью и аминокислотной последовательностью N-концевой части.

## ALTERNATIVE TRANSLATION INITIATION OF *speA* GENE SUPPRESSING *ERWINIA CAROTOVORA* PATHOGENICITY

*Chernyshov S.V., Gorokhovatsky A.Yu., Buryanov Ya.I.*

Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino, Russia

E-mail: svch2@rambler.ru

pAM28 plasmid suppresses *Erwinia carotovora* pathogenicity being introduced into *E. carotovora* cells. Two genes are localized on the plasmid: *rep* gene coding 302 amino acid protein which presumably respond to plasmid replication and *speA* gene which provide pathogenicity suppression. The structural part of *speA* gene is a long open reading frame (ORF) which consists of 368 amino acid residues. Six potential initiative ATG codons are along this ORF. Purine-rich motifs (SD1, SD2 и SD3) with different homology to Shine - Dalgarno sequence are located upstream three of this six ATGs (start 2, start 4 и start 6). The upstream regions of three other ATGs (start 1, start 3 и start 5) have no homology with SD.

For testing of its functional activity cloning of putative translation initiation signals was designed using *egfp* gene as reporter. A range of genetic constructions had been created and these plasmids were used for functional analysis of various SDs *in vivo*. Transformed cells fluorescence revealed that effective translation of reporter gene occurred only when SD2 and SD3 controlled *egfp* gene while SD1 provided just weak translation and poor fluorescence, which was detectable only under fluorescent microscope. Thus our data confirm different functional activity of this three SDs. We decided to determine GFP-fused protein size to define which SD sequence does work in cells presumably. Such a protein could be synthesized in cells transformed with pPCH-start6 plasmid. In this plasmid 3'-end of *speA* gene contained all three SDs (SD1, SD2, SD3) was fused with *egfp* gene. Western-blot analysis with anti-EGFP antibodies showed major 32 kDa protein along with several minor proteins of 44, 48 and 58 kDa size. Comparing theoretically predicted GFP-fused protein size with our data we revealed simultaneous but non-equal contribution of all three SDs to translation initiation. To our surprise translation had been initiated from start 1 also; however this required presence of the sequence located between start 1 and start 2 points. Moreover, direct positioning of *egfp* gene under start 1 control resulted in no expression of *egfp*. Thereby our data shows simultaneous translation initiation from several ATGs of 3'-*speA* gene region and we observe synthesis of several proteins of different length with distinct N-end sequences.

## КОНЬЮГАТЫ ХЛОРИНА $e_6$ С БОР-СОДЕРЖАЩИМИ ПОЛИЭДРАМИ КАК ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МОДУЛЬНЫЕ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ, БОР-НЕЙТРОНОЗАХВАТНОЙ И ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ РАКА

*Честнова А.В.<sup>1,2</sup>, Игнатова А.А.<sup>1,3</sup>, Грин М.А.<sup>2</sup>, Миронов А.Ф.<sup>2</sup>, Сиваев И.Б.<sup>4</sup>, Брегадзе В.И.<sup>4</sup>, Феофанов А.В.<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>3</sup>Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>4</sup>Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва Россия

E-mail: chestnova86@rambler.ru

Для современной медицины поиск эффективных способов лечения онкологических заболеваний является одной из приоритетных задач. В дополнение к традиционным подходам, основанным на достижениях хирургии, химио- и радиотерапии, в последнее время ведутся интенсивные разработки методов фотодинамической и бор-нейтронозахватной терапии рака (соответственно ФДТ и БНЗТ). ФДТ использует свойство фотосенсибилизаторов (ФС) разрушать раковые клетки активными формами кислорода, образующимися под действием света. БНЗТ основана на высоком сечении взаимодействия стабильных изотопов  $^{10}\text{B}$  с потоком эпителиальных нейтронов. В результате ядерной реакции нейтронов с  $^{10}\text{B}$  происходит большое выделение энергии, вызывающее гибель раковых клеток. Эффективность ФДТ и БНЗТ в значительной мере зависит от способности ФС и соединений, несущих  $^{10}\text{B}$ , проникать, накапливаться и удерживаться в раковых клетках.

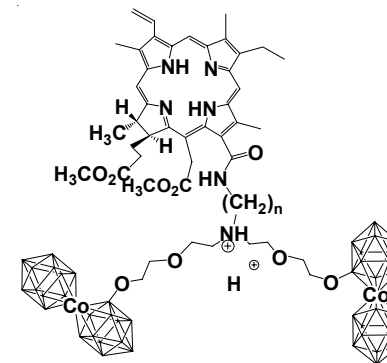
В данной работе мы докладываем о свойствах полифункциональных модульных конструкций **1-3** (рис. 1), состоящих из хлорина  $e_6$ , бор-содержащего кластера (бис(дикарболлидного) комплекса кобальта) и соединяющего их спейсера, а также от зависимости этих свойств от длины алкильного участка спейсера. Хлорин  $e_6$  является ФС, способным, как показано ранее, накапливаться в раковых клетках, и, следовательно, облегчать проникновение конструкций **1-3** в клетки. Хлорин  $e_6$  флуоресцирует, что облегчает анализ локализации и распределения конструкций **1-3** в клетках и живых организмах. Бис(дикарболлидный) комплекс кобальта обеспечивает транспортировку 36 атомов  $^{10}\text{B}$  в составе каждой конструкции. Спейсер не только объединяет хлорин  $e_6$  и бор-содержащий модуль в единую конструкцию, но и, как обсуждается ниже, влияет на способность конструкции проникать в клетки.

Проведенные исследования показали, что конструкции **1-3** способны проникать в клетки аденокарциномы легкого человека A549 и эффективно

накапливаться в цитоплазме. В цитоплазме **1-3** имеют сходное распределение: диффузно окрашивают цитоплазму и концентрируются в гранулярных структурах размером менее 1 мкм. В клеточном ядре конструкции **1-3** не обнаруживаются. Установлено, что

эффективность проникновения конструкций **1-3** в клетки возрастает при увеличении длины алкильного фрагмента спейсера. Коэффициенты внутриклеточного накопления (максимальное отношение внутриклеточной концентрации соединения к его концентрации во внешней среде) конструкций **1, 2 и 3**, измеренные методом конфокальной микроскопии и реконструкции спектральных изображений, составляют, соответственно, 24, 52 и 80. Внутриклеточная концентрация  $\sim 10^9$  атомов бора на клетку, необходимая для эффективной БНЗТ, достигается при концентрации **1, 2 и 3** во внешней среде, соответственно, 1,6, 0,7 и 0,5 мкмоль/л. Показано, что конструкции **1-3** сохраняют способность хлорина  $e_6$  к фотоиндуцированной генерации синглетного кислорода и вызывают фотоиндуцированную гибель клеток A549 при субмикромольных концентрациях. В соответствии с относительным внутриклеточным накоплением фотоиндуцированная цитотоксичность возрастает в ряду **1 < 2 < 3**.

Таким образом, из исследованных конструкций соединение **3** является наиболее перспективным полифункциональным агентом для БНЗТ, ФДТ, подходов, требующих комбинированного применения обоих видов терапии, а также для флуоресцентной диагностики при определении локализации и границ опухолевых образований.



1: n=2; 2: n=4; 3: n=6

Рис. 1. Структурные формулы соединений.

**CONJUGATES OF CHLORIN  $e_6$  WITH BORON-CONTAINING POLYHEDRONS AS MULTIFUNCTIONAL MODULAR CONSTRUCTIONS FOR FLUORESCENT DIAGNOSTICS, ANTICANCER BORON NEUTRON CAPTURE AND PHOTODYNAMIC THERAPY**

*Chestnova A.V.<sup>1,2</sup>, Ignatova A.A.<sup>1,3</sup>, Grin M.A.<sup>2</sup>, Mironov A.F.<sup>2</sup>, Sivaev I.B.<sup>4</sup>, Bregadze V.I.<sup>4</sup>, Feofanov A.V.<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

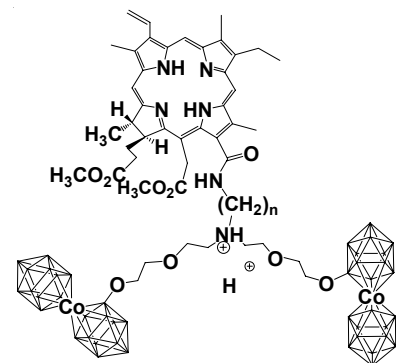
<sup>4</sup>Nesmeyanov Institute of Elementoorganic Compounds RAS, Moscow, Russia

E-mail: chestnova86@rambler.ru

Search for effective ways of treatment of oncological diseases is one of the priority problems for modern medicine. In addition to the traditional approaches based on achievements of surgery, chemo- and radio-therapy, the methods of anticancer photodynamic and boron neutron capture therapy (PDT and BNCT, respectively) are currently under intensive development. PDT utilizes a property of photosensitizers (PS) to disrupt cancer cells by active oxygen species formed during irradiation with light. BNCT is based on a high cross-section of interaction of stable  $^{10}\text{B}$  isotopes with low-energy neutrons. Nuclear reaction of neutrons with

$^{10}\text{B}$  leads to the release of much energy causing destruction of cancer cells. The efficiency of PDT and BNCT depends considerably on ability of PS and the substance bearing  $^{10}\text{B}$  to penetrate, accumulate and be retained in cancer cells.

In the present work we report on the properties of multifunctional modular constructions **1-3** (Fig. 1), consisting of chlorin  $e_6$ , a boron-containing cluster, namely, cobalt bis(dicarbollide) and linker as well as on the dependence of these properties on an alkyl moiety length of the linker. Chlorin  $e_6$  is PS that is known to be capable to accumulate in cancer cells. Hence, chlorin  $e_6$  moiety can promote penetration of **1-3** in cells.



1: n=2; 2: n=4; 3: n=6

Fig. 1. The structures of compounds.

Chlorin  $e_6$  fluoresces, that facilitates the analysis of localization and distribution of **1-3** in cells and living organisms. The cobalt bis(dicarbollide) as a module of **1-3** provides transportation of 36 atoms of  $^{10}\text{B}$ . The linker unites chlorin  $e_6$  and a boron-containing module in a uniform construction, and in addition, it affects an ability of the construction to penetrate into cells (see below).

Our studies revealed that **1-3** penetrate into A549 human lung adenocarcinoma cells and accumulate efficiently in cytoplasm. They demonstrate similar distribution in cytoplasm: diffuse staining and accumulation in small (less than  $1\mu\text{m}$  in diameter) vesicular structures. There is no penetration of **1-3** in a nucleus. It is found that an increase in alkyl moiety length of the linker leads to an increase in intracellular accumulation of a construction. Coefficients of intracellular accumulation (maximal ratio of intracellular to extracellular concentration) of **1**, **2** and **3** are 24, 52 and 80, respectively, as measured with the confocal spectral imaging technique. Intracellular concentration of  $\sim 10^9$  atoms of a boron per cell that is necessary for efficient BNCT is reached at the following extracellular concentration of **1**, **2** and **3**: 1.6, 0.7 and  $0.5\mu\text{M}$ , respectively. It is shown, that photoinduced generation of singlet oxygen by chlorin moiety is preserved for **1-3**, and **1-3** cause photoinduced death of A549 cells at submicromolar concentration. In accordance with the relative intracellular accumulation of **1-3** the photoinduced cytotoxicity increases in the range **1**<**2**<**3**.

Thus, among the studied constructions compound **3** is the most perspective multifunctional agent for BNCT, PDT, combined application of both types of therapy and fluorescent diagnostics of tumor localization and dissemination.

**БЕТА-СПИРАЛЬНЫЙ ДОМЕН БАКТЕРИОФАГА Т4 И ПЕПТИДИЛ-ПРОЛИЛ ИЗОМЕРАЗА УПРАВЛЯЮТ УКЛАДКОЙ ФРАГМЕНТА ДЛИННЫХ ХВОСТОВЫХ ФИБРИЛЛ В СОСТАВЕ ХИМЕРНОГО БЕЛКА**

***Чупров-Неточин Р.Н., Шнейдер М.М., Сыкилинда Н.Н., Мирошников К.А.***

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: kmi@ibch.ru

Факс: (495) 336-60-22; тел.: (495) 335-55-88

Ключевой момент инфекции клетки *Escherichia coli* бактериофагом Т4 – связывание с поверхностью клетки-хозяина - определяется специфичностью белков длинных хвостовых фибрилл фага, в частности, gp37. В природных условиях сборка и олигомеризация этого белка требуют участия, по крайней мере, двух дополнительных белковых факторов – gp57A и gp38, что сильно затрудняет получение рекомбинантной формы gp37.

Для преодоления этого препятствия была применена одна из современных белково-инженерных стратегий – создание химерного белка, имеющего в своем составе "белок-носитель", направляющий правильную сборку целевого белка. В этом качестве были использованы тримерный бета-спиральный домен другого белка фага Т4 – gp5 и белок *E. coli* пептидил-пролил изомеразы SlyD. На основании КД-спектров и физиологических тестов было выяснено, что полученные химерные белки обладают нативной конформацией и биологической активностью.

**BACTERIOPHAGE T4 BETA-HELICAL DOMAIN AND PEPTIDYL-PROLYL ISOMERASE DRIVES THE FOLDING OF THE LONG TAIL FIBER FRAGMENT INTO A FUNCTIONAL CHIMERIC PROTEIN**

***Chuprov-Netochin R.N., Shneider M.M., Sykilinda N.N., Miroshnikov K.A.***

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: kmi@ibch.ru

Fax: (495) 336-60-22; tel.: (495) 335-55-88

The key moment of *Escherichia coli* infection of bacteriophages T4 – binding to the surface of host cell – is determined by the specificity of protein of long tail phage fibrils, in particular, gp37. In natural conditions, assembly and oligomerization of this protein requires the participation of at least two additional protein factors – gp57A and gp38, and because it is highly difficult to obtain recombinant forms of gp37.

To overcome this obstacle, was applied one of the modern protein-engineering strategies – creating chimeric proteins, which has in its composition "protein carrier", guiding the correct assembly of the target protein. In this capacity, were used trimeric beta-helical domain of another protein of bacteriophage T4 – gp5 protein and *E. coli* peptidyl-prolyl isomerase SlyD. On the basis of CD spectra and physiological tests, it was found that the obtained chimerical proteins possess native structure and biological activity.

## ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ СОЗРЕВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ ЭМБРИОНОВ ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ

*Чурочкина О.А., Шестибратов К.А.*

Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, Россия  
E-mail: cholga-13@rambler.ru  
Тел.: (4967) 33-09-66

Процесс соматического эмбриогенеза на примере ели европейской можно разделить на четыре основные стадии: инициация эмбрионного каллуса, пролиферация, созревание эмбрионов, прорастание эмбрионов. Наиболее проблемной стадией является стадия созревания. Ее успешность зависит как от условий культивирования на данном этапе, генотипических особенностей растительного материала, так и от условий культивирования на предыдущих стадиях эмбриогенеза.

В рамках данной работы исследовано три способа подготовки эмбрионного каллуса с использованием пяти каллусных линий (75/1, 75/6, 84/1, 84/2, 84/7) с последующим созреванием соматических эмбрионов. В первом варианте выбран подход прекультивации каллусных групп на твердой безгормональной питательной среде в течение 7 дней. Во втором варианте после этапа пролиферации проводилась прекультивация эмбрионного каллуса на питательной среде с десятикратной редукцией регуляторов роста в течение 7 дней. В третьем варианте (контроль) этап предобработки исключался, и эмбрионный каллус переносился непосредственно на среду для созревания соматических эмбрионов. Каллусные группы после этапа безгормональной прекультивации отличались быстрым старением на среде для созревания – 1/2 NS III, 6% сахарозы, 40 мМ АБК, 2% PEG и 0,8% Gellan Gum. Различий между пятью линиями в скорости побурения и последующего некроза обнаружено не было. На каллусных группах с симптомами побурения и некроза соматические эмбрионы не развивались. Лучшие результаты получены во втором варианте созревания, при десятикратной редукции концентрации регуляторов роста на стадии прекультивации. Эта модификация не влияла на скорость роста эмбрионного каллуса, но значительно повышала его жизнеспособность при переходе к стадии созревания. Формирование зрелых семядольных эмбрионов происходило только в данном варианте опыта. По-видимому, высокие концентрации ауксинов в питательной среде на стадии пролиферации приводят к избыточному накоплению их в клетках эмбрионного каллуса, что, в свою очередь, ингибирует созревание эмбрионов под действием абсцизовой кислоты. В контрольном варианте формирования зрелых соматических эмбрионов не происходило.

## SOMATIC EMBRYOGENESIS IN PICEA ABIES: OPTIMIZATION OF MATURATION CONDITIONS

*Churochkina O.A., Schestibratov K.A.*

Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino, Russia  
E-mail: cholga-13@rambler.ru  
Tel.: (4967) 33-09-66

Process of the somatic embryogenesis in *Picea abies* can be divided on four main stages: embryogenic callus initiation, proliferation, embryo maturation, embryo germination. The most problem stage is maturation. The success of this stage depends on both cultivation conditions on present and previous stages and genotypic features of plant source.

In our work three methods of embryogenic callus preparation with following maturation of somatic embryos using five callus lines (75/1, 75/6, 84/1, 84/2, 84/7) were investigated. In the first variant we used callus precultivation on solid hormone-free medium within 7 days. In the second variant precultivation of embryogenic callus on medium with tenfold reduction of growth regulators within 7 days after proliferation was carried out. In the third variant (control) the precultivation stage was excluded and embryogenic callus was transferred immediately on the medium for the maturation of somatic embryos. Calluses after precultivation on hormone-free medium demonstrated rapid senescence on maturation medium containing 1/2 salts NS III, 6% sucrose, 40 μM ABA, 2% PEG and 0,8% Gellan Gum. The difference between five callus lines in browning development and the next necrosis was not observed. Somatic embryos did not developed on callus with browning and necrosis. The best results were obtained on the second variant of embryo maturation. Tenfold reduction of growth regulators during the precultivation stage did not affect on growth of embryogenic callus but significantly improved its viability on the maturation stage. Formation of mature cotyledonary embryos was observed only in this variant. Apparently high concentrations of auxins in medium on the proliferation stage lead to its surplus accumulation in embryogenic callus cells what inhibits maturation of the embryos upon the effect of abscisic acid. In control variant formation of mature somatic embryos was not occurred.



## АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ ИЗ ЛЕЙКОЦИТОВ РУССКОГО ОСЕТРА *ACIPENCER GUELLENSTADTI*

Шамова О.В., Овчинникова Т.В.\*, Тагаев А.А.\*, Леонова Ю.Ф.\*, Орлов Д.С., Кокряков В.Н.

НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия  
\*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: oshamova@yandex.ru  
Факс: (812) 234-94-93; тел.: (812) 234-07-64

Антимикробные пептиды (АМП) играют важную роль в функционировании системы врожденного иммунитета. В литературе имеются данные о АМП из кожных покровов, кишечника и других органов и тканей рыб, но практически отсутствует информация о АМП из лейкоцитов животных этого класса, хотя известно, что система врожденного иммунитета играет ключевую роль в противоифекционной защите у рыб и, таким образом, можно предположить наличие эффективных антимикробных соединений в лейкоцитах этих животных. Мы выделили шесть антимикробных пептидов из лейкоцитов русского осетра *Acipenser guldentadti*: три основные фракции составляли пептиды с молекулярными массами 5336 Да, 3804 Да и 2742 Да и три минорные фракции – 5174 Да, 5449 Да, 4778 Да. Структурный анализ полученных пептидов показал, что пять из них представляют собой ацетилированные N-концевые фрагменты гистона H2A, в то время как пептид с молекулярной массой 2742 Да является фрагментом из срединной части молекулы того же гистона. Мы исследовали биологическую активность трех мажорных фракций пептидов. Пептиды с молекулярными массами 5336 Да и 3804 Да проявляли высокую антимикробную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий в среде с низким содержанием NaCl (метод радиальной диффузии), в то время как пептид 2742 Да был эффективен только против *E. coli*. При наличии в среде 100 мМ NaCl активность пептидов 3804 Да и 5336 Да против *E. coli* не изменялась, тогда как их активность в отношении других микроорганизмов снижалась. Способность АМП влиять на проницаемость внешней и внутренней мембран *E. coli* ML35p изучали с помощью фотометрического метода в реальном времени: все три пептида не влияли на проницаемость цитоплазматической мембраны *E. coli*, что позволило предположить, что мембрана бактерии не является основной мишенью антимикробного действия АМП осетра. Все три пептида не вызывали гемолиза эритроцитов человека и не оказывали токсического действия на культивируемые клетки млекопитающих (максимальная исследуемая концентрация пептидов – 40 мкМ). В настоящему времени в литературе описано несколько АМП, являющихся производными гистона H2A, например, хипозин из слизи атлантического палтуса, буфорин из кожи амфибии. Полученные нами данные свидетельствуют в пользу предположения, что пептиды-производные гистонов могут служить факторами противоифекционной защиты у рыб и амфибий.

Работа поддержана грантами РФФИ № 07-04-01759; 09-04-01655 и Гос. контрактом 02.512.11.2234.

## ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM LEUKOCYTES OF THE RUSSIAN STURGEON *ACIPENCER GUELLENSTADTI*

Shamova O.V., Ovchinnikova T.V.\*, Tagaev A.A.\*, Leonova Yu.F.\*, Orlov D.S., Kokryakov V.N.

Institute of Experimental Medicine RAMS, St.-Petersburg, Russia  
\*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia  
E-mail: oshamova@yandex.ru  
Fax: (812) 234-94-93; tel.: (812) 234-07-64

Antimicrobial peptides (AMP) play important roles in the host innate defense mechanisms. Despite the fact that there are several reports devoted to AMPs isolated from skin, skin mucus, intestine and other organs and tissues of different species of fish, there is a paucity of information available on AMPs purified from fish leukocytes, although it is known that the innate immune system plays a key role in the host defense of fish, and hence, it is reasonable to expect that fish leukocytes consist of potent antimicrobial compounds. We isolated six antimicrobial peptides from leukocytes of the Russian sturgeon *Acipenser guldentadti*: three major fractions of the peptides were represented by the peptides with molecular masses of 5336 Da, 3804 Da and 2742 Da; and three minor fractions were the peptides with Mm of 5174 Da, 5449, 4778 Da. Structural analysis revealed that five of isolated AMPs comprised acetylated N-terminal fragments of H2A histone while the peptide 2742 Da was defined as a fragment of a middle part of H2A molecule. We investigated the biological activity of three major peptides. The peptides with molecular masses of 5336 Da, 3804 Da exerted potent antimicrobial activity towards Gram-positive and Gram-negative bacteria upon low salt conditions in the radial diffusion assay, whereas the peptide 2742 Da was effective only against *E. coli*. The presence in a medium of 100 mM NaCl did not impair microbicidal activities of either 3804 Da or 5336 Da peptides against *E. coli*, but decreased their efficacy against other microbes. The ability of AMPs to permeabilize the inner and outer membranes of *E. coli* ML35p was studied in real time by a photometric procedure: all of three investigated peptides did not affect the permeability of the inner membrane of *E. coli*. The obtained data indicate that the bacterial membrane was not the main target of the antimicrobial action of the sturgeon AMPs. All three sturgeon peptides did not cause appreciable hemolytic effect on human erythrocytes up to 40 µM concentration of the peptides. The toxicity of the sturgeon peptides toward eukaryotic mammalian cells was also insignificant. By the date several AMPs derived from histone H2A have been described in literature – hipposin from the mucus of Atlantic halibut and buforin from amphibian skin. Our findings support the idea that histone-derived peptides may serve as an important source of host defense molecules in both fish and amphibians.

This work was supported by the RFBR grants No 07-04-01759; 09-04-01655 and State contract 02.512.11.2234.

## ОСОБЕННОСТИ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЛЕЙКОЗАХ

*Вологжанникова А.А., Шевчук Т.В.\*, Исмаилов Р.Г., Вишницова Е.Н.,  
Маринич Д.В.\*\*, Дьяченко О.В.\*, Бурьянов Я.И.\**

Пушкинский государственный университет, Пушкино, Россия

\*Филиал Института биоорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, Россия

\*\*Республиканский научно-практический центр гематологии и

трансфузиологии, Минск, Беларусь

E-mail: shevchuk@fibkh.serpukhov.su

Эпигенетические изменения, возникающие при развитии лейкоемий, затрагивают регуляцию экспрессии множества генов. Исследование роли энзиматического метилирования ДНК в процессе злокачественной трансформации клеток и опухолевой прогрессии важно для понимания молекулярно-генетической природы рака и может найти практическое применение в прогнозировании и диагностике канцерогенных заболеваний.

Проанализирован уровень метилирования генома человека при развитии лейкозов различной этиологии. Получены данные об особенностях метилирования отдельных генов (ген кальцитонина человека, ген множественной лекарственной устойчивости MDR-1, p21) и генома в целом у больных различными формами лейкоемий. Показано наличие обратной корреляции между уровнем метилирования гена MDR-1 и степенью прогрессии хронического миелоидного лейкоза. Установлено повышение уровня метилирования 5'-области гена кальцитонина на фоне гипометилирования 5'-области гена MDR-1 при прогрессии заболевания. Показано гиперметилирование сайтов CCGG гена p21 при остром миелобластном лейкозе. Обнаружено, что при лейкозных заболеваниях уровень метилирования последовательностей CCGG (W – А или Т) 5'-области гена MDR-1 снижается, в то время как CCGG-метилирование 5'-области гена кальцитонина остается неизменным. Формирование фенотипа лекарственной устойчивости опухолевых клеток более характерно для хронических лейкозов, чем для острых. Указанный фенотип множественной лекарственной устойчивости, обусловленный мембранным Р-гликопротеином, в настоящее время считается одним из важнейших факторов, препятствующих эффективной химиотерапии злокачественных заболеваний крови.

Полученные данные могут найти применение при совокупной оценке прогноза лейкоемий, мониторинге заболеваний, а также в изучении механизмов прогрессии опухолевого процесса при различных формах лейкозов.

Работа выполнена при поддержке грантами РФФИ № 08-04-90034 и № 09-04-00889.

## PECULIARITIES OF HUMAN GENOME SITE-SPECIFIC METHYLATION DURING LEUKAEMIA

*Vologjannikova A.A., Shevchuk T.V.\*, Ismailov R.G., Vshyvceva E.N.,  
Marinich D.V.\*\*, Dyachenko O.V.\*, Buryanov Ya.I.\**

Pushchino State University, Pushchino, Russia

\*Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,

Pushchino, Russia

\*\*Republican Theoretical and Practical Center of Hematology and

Transfusiology, Minsk, Belarus

E-mail: shevchuk@fibkh.serpukhov.su

Changes in epigenetic state caused by leukaemia progression does affect expression of numerous genes. Understanding the role of enzymatic DNA methylation in the process of malignant cell transformation and cancer progression is necessary for purposes of cancer progression diagnosis, prognosis, and chemotherapy. Human genome methylation level during progression of different aetiology leukaemia had been studied. Data on methylation peculiarities of several distinct genes (calcitonine gene, multi-drug resistance gene MDR-1, p21) and of the whole genome were obtained for patients with different types of leukaemia. Reciprocal correlation of MDR-1 gene methylation level and chronic myeloid leukaemia progression has been shown. Increase of methylation level of calcitonine gene 5'-region was observed, while MDR-1 gene 5'-region was hypomethylated during disease progression. Hypermethylation of CCGG's in p21 gene was shown for acute myeloblastic leukaemia. It has been revealed that during leukaemia CCGG (W = A or T) sites in the MDR-1 gene 5'-region reduce methylation level, while methylation of CCGG sites of calcitonine gene 5'-region remain unchanged.

This work had been supported by grants from RFBR: N 08-04-90034 and N 09-04-00889.

## **RHO ГТФаза Chr/Wrch2 ИНДУЦИРУЕТ АПОПТОЗ КЛЕТОК PC12, СОПРОВОЖДАЮЩИЙСЯ АКТИВАЦИЕЙ JNK И СУПРЕССИЕЙ AKT**

***Шепелев М.В., Чернофф Д. \*, Коробко И.В.***

Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

\*Онкологический центр Фокс Чейз, Филадельфия, США

E-mail: mshepelev@mail.ru

Факс: (499) 135-41-05; тел.: (499) 135-99-70

Белки семейства Rho ГТФаз посредством взаимодействия с белками-мишенями, называемыми эффекторами, участвуют в регуляции таких клеточных процессов, как перестройки актинового цитоскелета, прогрессия клеточного цикла, апоптоз и многих других. Семейство Rho ГТФаз у человека насчитывает 20 белков, разделяемых на восемь подсемейств. Так называемая "атипичная" Rho ГТФаза Chr/Wrch-2/RhoV вместе с белком Wrch-1/RhoU относится к подсемейству RhoU/V и является малоизученным белком, чьи клеточные функции большей частью остаются неизвестными. Было показано, что Chr вызывает формирование ламеллиподий и фокальных контактов, злокачественную трансформацию фибробластов мыши, активирует протеинкиназы JNK и Pak1, а также индуцирует убиквитин-зависимую деградацию Pak1. У лягушек *X. laevis* Chr/RhoV является одним из наиболее ранних экспрессируемых маркеров нервного гребня и играет важную роль в дифференцировке его клеток. У млекопитающих транскрипт гена *RHOV* обнаруживается в головном мозге взрослых особей и эмбрионов, однако, функции белка Chr в нервной системе остаются неизвестными.

Для выявления клеточных процессов, на которые может влиять Chr в клетках, обладающих способностью дифференцироваться в нейроны, были получены клеточные линии PC12TetOn с тетрациклин-регулируемой экспрессией ГТФазы Chr с N-концевым FLAG эпитопом (PC12wt5), а также её конститутивно активной формы, ChrG40V (PC12gv7). Оценка влияния экспрессии ГТФазы Chr на жизнеспособность клеток показала, что экспрессия Chr вызывает снижение жизнеспособности клеток PC12wt5 и gv7. Анализ активности каспаз-3/7 показал, что экспрессия Chr приводит к активации каспаз-3/7, что указывает на апоптотическую гибель клеток PC12TetOn. При этом было выявлено, что обе формы белка Chr вызывают активацию протеинкиназы JNK, которая играет важную роль при апоптозе клеток PC12. Более того, при транзиторной экспрессии в клетках НЕК293 белков GFP-Chr и GFP-ChrG40V, но не белка GFP-ChrG40V с удалённым C-концевым доменом, критически важным для ассоциации Chr с мембранами, наблюдались активация JNK, фосфорилирование белка c-Jun и активация AP-1-зависимой транскрипции. Помимо влияния на JNK-сигнальный каскад было обнаружено, что в клетках PC12TetOn белок Chr дикого типа, но не ChrG40V, вызывал двукратное снижение активности протеинкиназы Akt и драматическое снижение уровня фосфорилирования протеинкиназы GSK3β по сайту Ser9, являющегося мишенью Akt.

Таким образом, нами впервые показано, что ГТФаза Chr вызывает

апоптоз недифференцированных клеток PC12, сопровождающийся активацией каспаз-3/7. Chr активирует JNK-зависимый сигнальный путь, который играет важную роль в развитии апоптоза в клетках PC12. Экспрессия Chr также вызывала инактивацию протеинкиназы Akt и сопутствующую активацию субстрата Akt, GSK3β. Активация GSK3β за счет устранения ингибиторного фосфорилирования со стороны Akt также может вносить вклад в апоптотическую гибель клеток PC12. Полученные результаты открывают дальнейшие перспективы изучения роли Chr в нервной системе млекопитающих в свете выявленной нами способности ГТФазы Chr оказывать влияние на жизнеспособность клеток и ее возможную роль в регуляции JNK-зависимого апоптоза клеток PC12.

**RHO FAMILY GTPase CHP/WRCH2 INDUCES PC12 APOPTOTIC CELL DEATH ACCOMPANIED BY JNK ACTIVATION AND SUPPRESSION OF AKT**

*Shepelev M.V., Chernoff J.\*, Korobko I.V.*

Institute of Gene Biology RAS, Moscow, Russia  
\*Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA  
E-mail: mshepelev@mail.ru  
Fax: (499) 135-41-05; tel.: (499) 135-99-70

Rho family GTPases act through interaction with protein targets called effectors and regulate wide variety of cellular processes including dynamics of actin cytoskeleton, cell cycle progression, apoptosis, and many others. The family of Rho GTPases in human consists of 20 members and can be subdivided into 8 subfamilies. The so-called "atypical" Rho GTPases Wrch-1/RhoU and Chp/Wrch-2/RhoV compose the RhoU/V subfamily. Chp is a poorly characterized protein which functions remain largely unknown. It has been shown that Chp induces formation of lamellipodia, assembly of focal adhesions, activation of JNK and oncogenic transformation of mouse fibroblasts. Chp also induces activation of serine/threonine protein kinase Pak1 and simultaneously targets Pak1 to ubiquitin-dependent degradation. Recently it was shown that Chp/RhoV is one of the earliest expressed neural crest markers in *X. laevis* embryos and that Chp plays an important role in differentiation of neural crest cells. In mammals *RHOV* transcript encoding Chp is found both in fetal and adult brain but the function of Chp in the nervous system of mammals remains to be elucidated.

To identify cellular processes affected by Chp GTPase in cells that have a capacity to differentiate into neurons, we established PC12TetOn cell lines with tetracycline-regulated expression of N-terminally FLAG-tagged Chp (PC12wt5) and its constitutively active form, ChpG40V (PC12gv7). Using these cell lines we showed that expression of Chp compromises viability of PC12wt5 and gv7 cells. We found that Chp activates caspases-3/7 indicating that Chp induces apoptosis in PC12TetOn cells. Both wild type Chp and ChpG40V activated JNK protein kinase which plays an essential role in apoptosis of PC12 cells. Transient expression of GFP-Chp and GFP-ChpG40V proteins in HEK293 cells but not of its mutant lacking C-terminal domain that is critical for the membrane association of Chp, has lead to the activation of JNK, c-Jun phosphorylation and stimulation of AP-1-dependent transcriptional activity. Besides its action on JNK-dependent signaling pathway we found that in PC12TetOn cells wild type Chp, but not ChpG40V induced two-fold reduction in Akt activity and dramatic reduction in Akt-directed phosphorylation of Ser9 in GSK3 $\beta$ .

In summary, we showed for the first time that expression of Chp induces apoptotic cell death in undifferentiated PC12 cells that is accompanied by caspases-3/7 activation. Chp activates JNK signaling pathway which is important for apoptosis of PC12 cells. We also found that Chp expression results in downregulation of pro-survival Akt activity and relieve of the inhibitory phosphorylation of Akt's substrate GSK3 $\beta$  which might also contribute to apoptotic death of PC12 cells. Thus our results revealed a role of Chp in regulation of cell viability and highlight Chp as a putative regulator of JNK-dependent apoptosis in PC12 cells challenging for further studies of Chp functions in nervous system of mammals.

**ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ СУБСТАНЦИИ ИНСУЛИНА И ПРЕПАРАТОВ ИНСУРАНА Р И ИНСУРАНА НПХ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ИХ КАЧЕСТВА НА ОПЫТНОМ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ ИБХ РАН**

*Шибанова Е.Д., Шепель Е.Н., Пальченкова Н.Б., Сизова Н.В., Гусаров Д.А., Баирамашвили Д.И.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
E-mail: shib@kou.ibch.ru

Изучение стабильности лекарственных препаратов проводится для получения информации об изменении их качества с течением времени под влиянием факторов окружающей среды (температуры, влажности, освещения). Долгосрочные испытания в реальном времени осуществляются для установления и подтверждения сроков годности препаратов. Однако мы полагаем, что на основании данных по стабильности препарата можно судить и о том, насколько стандартно проходит весь технологический цикл приготовления лекарственного средства. Именно поэтому на опытном биотехнологическом производстве ИБХ РАН проводятся долгосрочные испытания стабильности всех выпускаемых серий субстанции генно-инженерного инсулина и готовых лекарственных форм – Инсурана Р и Инсурана НПХ. За 5 лет работы производства была исследована стабильность при хранении 6-ти серий субстанции инсулина, 9 серий Инсурана Р 100 МЕ/мл и 40 МЕ/мл и 8 серий Инсурана НПХ, 100 МЕ/мл и 40 МЕ/мл.

Проведен анализ факторов, оказывающих влияние на стабильность показателей качества препаратов инсулина при хранении, связанных с качеством исходных основных (для субстанции) и вспомогательных компонентов в составе готовых лекарственных форм (ГЛФ) и технологией их приготовления.

Анализ полученных результатов подтвердил высокое качество и стабильность субстанции Инсурана Р и Инсурана НПХ на протяжении всего срока годности, что позволило сделать вывод о том, что практически все виды работ на производстве в рамках системы качества создают достаточную уверенность в качестве конечного продукта. Именно это и определяет эффективность данной системы на фармацевтическом производстве.



**RESEARCH OF INSULIN ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENT (API) AND PHARMACEUTICALS INSURAN R AND INSURAN NPH STABILITY FOR GUARANTEEING QUALITY AT THE EXPERIMENTAL BIOTECHNOLOGY PRODUCTION (EBP) OF THE INSTITUTE OF BIOORGANIC CHEMISTRY**

***Shibanova E.D., Shepel E.N., Palchenkova N.B., Sizova N.V., Gusarov D.A., Bairamashvili D.I.***

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: shib@kou.ibch.ru

The study of pharmaceutical stability means obtaining information about changes in their quality with the course of time under the influence of environmental factors (temperature, humidity, exposure to light). Long-term tests in real-time mode are carried out in order to determine and to confirm the expiration date. However we believe that it's possible to draw a conclusion about the degree of conventionality and validity of the technological cycle of medicinal product from drug stability data. For this very reason long-term tests for all produced batches of gene-engineered insulin and finished product Insuran R and Insuran NPH are carried out at the place of Experimental biotechnology production of IBCh RAS. During 5 years of production the stability in storage for 6 batches of insulin API, 9 series of Insuran P 100 IU/ml and 40 IU/ml, and 8 series of Insuran NPH, 100 IU/ml and 40 IU/ml was tested.

Parameters which influence the stability of insulin drugs quality data in storage that are connected with the quality of API and raw materials in the formula of medicinal product and the technology of their preparation were analyzed.

Data analysis confirmed the high quality and the stability of the API, Insuran P and Insuran NPH during the whole period of validity. It allowed effectuating a conclusion that almost all types of activity at the manufacture as a part of the quality system ensure the quality of a target product. This very fact determines the efficiency of the quality system at the place of pharmaceutical production.

**ПРЕПАРАТИВНАЯ ОЧИСТКА БАКТЕРИОФАГОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ**

***Шкатула С.В., Куликов Е.Е. \*, Сыкилинда Н.Н., Мирошников К.А.***

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

E-mail: kmi@ibch.ru

\*Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва, Россия

Способность вирусов бактерий (бактериофагов) уничтожать бактериальные клетки в ходе инфекционного цикла – основа идеи использования их в качестве терапевтических агентов. В современных условиях постоянного роста количества штаммов патогенных бактерий, обладающих множественной устойчивостью к антибиотикам различных классов, интерес к фаговой терапии возрождается. В настоящее время в экспериментальных и производимых малыми сериями препаратах бактериофагов (фаговых коктейлях) обычно используются фильтрованные лизаты бактериальных клеток. Перспективным направлением для широкомасштабного получения фаговых препаратов является разработка хроматографических методов, позволяющих сходным образом очищать различные по свойствам бактериофаги. В представленной работе демонстрируются успешные приложения комбинации хроматографии через стекло с контролируемым размером пор (СПГ) и адсорбционной хроматографии (ИЕС, НИС) для эффективной очистки ряда бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa*.



**PREPARATIVE CHROMATOGRAPHIC PURIFICATION OF  
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BACTERIOPHAGES**

***Shkatula S.V., Kulikov E.E. \*, Sykilinda N.N., Miroshnikov K.A.***

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow,  
Russia

E-mail: kmi@ibch.ru

\*Vinogradsky Institute of Microbiology RAS, Moscow, Russia

An ability of bacterial viruses (bacteriophages) to destroy microbial cells during their infection cycle is a basis for bacteriophages' employment as antibacterial agents. Current continuous increase of antibiotic-resistant strains of pathogenic bacteria stimulates an interest to phage therapy. Experimental and small-scale production bacteriophage preparations (phage cocktails) consist of filtered phage lysates. Development of chromatographic methods that can be repeatedly applied for purification of different bacteriophages is a prospective direction for large scale production of therapeutic phages. In the present work we demonstrate successful application of a combination of controlled-pore glass (CPG) penetration chromatography, and adsorption chromatography (IEC, HIC) for effective purification of several *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages.

**ВЕНОМИКА ПАУКА *MISUMENA VATIA***

***Шляпников Ю.М., Козлов С.А., Гришин Е.В.***

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

E-mail: shlyapnikov@online.stack.net

Тел.: (495) 336-65-40

Веномика – это новое динамично развивающееся направление, изучающее компонентный состав природных ядов. Нами были изучены качественный и количественный составы ядов, полученных от индивидуальных особей паука *Misumena vatia*. Были проанализированы смесевой яд, полученный от нескольких десятков особей паука *M. vatia*, а также яд каждого из 20 пауков этого же вида из одного географического ареала обитания. Для идентификации пептидных компонентов образцы ядов разделяли на фракции с помощью ВЭЖХ с последующим масс-спектрометрическим анализом. Указанным способом в составе смесового яда паука *M. vatia* было идентифицировано 116 компонентов. В то же время, в составе ядов, полученных от отдельных особей, было обнаружено существенно меньшее число компонентов – от 80 до 99. Была выявлена группа из 73 компонентов, присутствующих во всех проанализированных образцах, и показано, что наличие остальных компонентов в составе яда варьирует от особи к особи. Эти данные согласуются с результатами, полученными при аналогичном исследовании ядов паука *Agelena orientalis*. Для 31 пептидного компонента яда паука *M. vatia* была установлена первичная структура.

## VENOMICS OF *MISUMENA VATIA* SPIDER

*Shlyapnikov Y.M., Kozlov S.A., Grishin E.V.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: shlyapnikov@online.stack.net

Тел.: (495) 336-65-40

Venomomics is new dynamically emerging field exploring the composition of natural venoms. We have studied the qualitative and quantitative composition of venoms obtained from individual *Misumena vatia* spider specimens. The mixture venom obtained from several dozens of *M. vatia* specimens and also the venom of each of 20 spiders of this species from the same natural habitat was analyzed. For the polypeptide components identification, the venom samples were separated by HPLC followed by mass-spectral analysis. 116 components were identified in the *M. vatia* mixture venom composition in this way. At the same time, significantly smaller number of components – 80 to 99 – was detected in the venoms obtained from individual specimens. The group of 73 components present in all analyzed samples was revealed, and the presence of other components in venom composition was shown to vary between single specimens. This data is in agreement with the results obtained in the similar study of *Agelena orientalis* spider venoms. For the 31 polypeptide components of *M.vatia* venom the primary structure was determined.

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ НАРУШЕНИЙ В ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ К ГОРМОНАМ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИСТЕМЕ В ТКАНЯХ ДИАБЕТИЧЕСКИХ КРЫС С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ, ПРОИЗВОДНЫХ СИГНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ

*Шпаков А.О., Бондарева В.М., Шпакова Е.А. \*, Тарасенко И.И. \*, Деркач К.В., Кузнецова Л.А., Власов Г.П. \*, Перцева М.Н.*

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

\*Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: alex\_shpakov@list.ru

Факс: (812) 552-30-12; тел.: (812) 552-31-17

Сахарный диабет 1-го типа (СД1) вызывает многочисленные нарушения в репродуктивной и нервной системах человека и экспериментальных животных. Как показано нами ранее, при СД1 меняется чувствительность к гормонам аденилатциклазной (АЦ) сигнальной системы. Цель работы состояла в идентификации нарушений в регулируемой гормонами АЦ системе в репродуктивных и нервной тканях крыс со стрептозотоциновым СД1 с помощью синтетических пептидов, производных сигнальных белков, компонентов этой системы. Были применены пептиды ARERKATKTL<sup>255-264</sup>KA, KHSRKALKASL<sup>258-268</sup>KA и EIRNQVKK(E)ILAKR<sup>615-629</sup>, производные третьей цитоплазматической петли серотониновых рецепторов 1В-го и 6-го типов и релаксина рецептора 1-го типа, соответственно, и пептиды RMHLRQYELL<sup>385-394</sup> и KNNLKDCGLF<sup>346-355</sup>, соответствующие С-концевым сегментам  $\alpha_5$ - и  $\alpha_{12}$ -субъединиц G-белков. Обнаружено, что в матке и тестикулах диабетических крыс стимулирующие эффекты серотонина и релаксина на активность АЦ и ГТФ-связывание G-белков снижаются. Основываясь на экспериментах с синтетическими пептидами, мы показали, что нарушения в передаче сигнала через АЦ систему локализованы на уровне рецептора и его сопряжения с G<sub>s</sub>-белком. Во всех исследованных тканях при СД1 в значительной степени ослабевало ингибирующее влияние серотонина и соматостатина на АЦ систему. Используя комбинации синтетических пептидов, мы установили, что в этом случае нарушения локализованы на уровне G<sub>i</sub>-белка, который сопряжен с серотониновыми рецепторами 1-го типа и соматостатиновыми рецепторами. Высказано предположение, что выявленные нами нарушения в передаче сигнала через гормоночувствительную АЦ систему ответственны за развитие патологических изменений в репродуктивной и нервной системах при СД1.

Работа поддержана РФФИ (грант № 09-04-00746а) и Программой "Фундаментальные науки – медицине" (2009 г.).

**IDENTIFICATION OF THE DISTURBANCES IN HORMONE-SENSITIVE ADENYLYL CYCLASE SYSTEM IN THE TISSUES OF DIABETIC RATS USING SYNTHETIC PEPTIDES, THE DERIVATIVES OF SIGNAL PROTEINS**

*Shpakov A.O., Bondareva V.M., Shpakova E.A.\* , Tarasenko I.I.\* , Derkach K.V., Kuznetsova L.A., Vlasov G.P.\* , Pertseva M.N.*

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St.-Petersburg, Russia

\*Institute of Macromolecular Compounds RAS, St.-Petersburg, Russia

E-mail: alex\_shpakov@list.ru

Fax: (812) 552-30-12; tel.: (812) 552-31-17

Diabetes mellitus of the type 1 (DM1) induces numerous disturbances in reproductive and nervous systems of human and experimental animals. As shown by us earlier the sensitivity of the adenylyl cyclase (AC) signaling system to hormones is changed in the condition of the DM1. The aim of the present work is the identification of the disturbances in hormone-regulated AC system in nervous and reproductive tissues of the rats with streptozotocin-induced DM1 using synthetic peptides, the derivatives of signal proteins, the components of this system. The peptides ARERKATKTL<sup>255-264</sup>KA, KHSRKALKASL<sup>258-268</sup>KA and EIRNQVKKE(Nle)ILAKR<sup>615-629</sup>, the derivatives of the third intracellular loops of serotonin receptors of the type 1B and 6 and relaxin receptor of the type 1, respectively, and the peptides RMHLRQYELL<sup>385-394</sup> and KNNLKDCGLF<sup>346-355</sup>, corresponding to C-terminal regions of G-protein  $\alpha_s$ - and  $\alpha_{12}$ -subunits, were used. It was shown that in the uterus and testis of diabetic rats the stimulatory effects of serotonin and relaxin on AC activity and G protein GTP-binding are decreased. Based on the experiments with synthetic peptides we showed that the disturbances in signal transduction via AC system are localized in the level of the receptor and it's coupling with G<sub>s</sub>-protein. In all investigated tissues in the condition of DM1 the inhibitory influence of serotonin and somatostatin on AC system was significantly reduced. Using combinations of the synthetic peptides we founded that the disturbances in this case are localized on the level of G<sub>i</sub>-protein coupled with serotonin receptors of the type 1 and somatostatin receptors. We supposed that identified by us disturbances in signal transduction via hormone-sensitive AC system are responsible for the development of pathological changes in reproductive and nervous systems in the condition of DM1.

The work is supported RFBI (Grant № 09-04-00746a) and Program "Fundamental sciences – medicine" (2009).

**ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ, ПРОИЗВОДНЫХ ТРЕТЬЕЙ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ ПЕТЛИ СЕРОТОНИНОВОГО РЕЦЕПТОРА 6-ГО ТИПА, НА АКТИВНОСТЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ К СЕРОТОНИНУ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ**

*Шпакова Е.А., Тарасенко И.И., Власов Г.П., Шпаков А.О.\**

Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

\*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова

РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: eshpakova@mail.ru

Факс: (812) 328-68-69; тел.: (812) 323-10-50

Одной из актуальных проблем молекулярной эндокринологии является поиск высокоселективных регуляторов гормональных сигнальных систем. Наиболее перспективными из них являются синтетические пептиды, соответствующие участкам цитоплазматических петель (ЦП) рецепторов, которые взаимодействуют с гетеротримерными G-белками. Цель работы состояла в синтезе пептидов, производных С-концевого участка 258-268 третьей ЦП серотонинового рецептора 6-го типа (СР<sub>6</sub>), который сопряжен с аденилатциклазой (АЦ), и изучению их влияния на чувствительную к серотонину аденилатциклизную сигнальную систему в мозге крыс. Были впервые синтезированы три пептида (СР<sub>6</sub>-пептида) – КНСРКALKASL<sup>258-268</sup>КА-амид (I), соответствующий С-концевому участку третьей ЦП СР<sub>6</sub>-го типа, его пальмитоилированный аналог КНСРКALKASL<sup>258-268</sup>К(Palm)А-амид (II) и димер (КНСРКALKASL<sup>258-268</sup>КG)КА (III). Все СР<sub>6</sub>-пептиды стимулировали базальную активность АЦ и базальный уровень ГТФ-связывания во фракции мембран мозга крыс, наиболее эффективным был пептид II. Действие СР<sub>6</sub>-пептидов было селективным в отношении СР<sub>6</sub>. В их присутствии отчетливо снижались стимулирующие АЦ и ГТФ-связывающие эффекты серотонина и в значительной степени блокировались эффекты EMDT, селективного агониста СР<sub>6</sub>, но практически не менялись эффекты 5-карбоксамидотриптамина и 8-ОН-DPAT, которые активируют СР<sub>6</sub>, отличные от СР<sub>6</sub>. Наряду с этим, пептид II ингибирал стимулирующие эффекты серотонина, сниженные в присутствии антагонистов цианопиндолола и кетансерина, которые практически не действуют на СР<sub>6</sub>, но не влиял на эффекты серотонина, сниженные в присутствии антагонистов SB-271046 и метиопетина, которые препятствуют передаче сигнала через СР<sub>6</sub>. Таким образом, СР<sub>6</sub>-пептиды активируют компоненты аденилатциклизной сигнальной системы в мозге крыс и селективно нарушают передачу гормонального сигнала через СР<sub>6</sub>, не затрагивая другие типы СР.

Работа поддержана РФФИ (грант № 09-04-00746a) и Программой "Фундаментальные науки – медицине" (2009 г.).

**INFLUENCE OF THE PEPTIDES, DERIVATIVES OF THE THIRD INTRACELLULAR LOOP OF SEROTONIN RECEPTOR OF THE TYPE 6, ON ACTIVITY OF SEROTONIN-SENSITIVE ADENYLYL CYCLASE SIGNALING SYSTEM**

*Shpakova E.A., Tarasenko I.I., Vlasov G.P., Shpakov A.O.\**

Institute of Macromolecular Compounds RAS, St.-Petersburg, Russia  
\*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS,  
St.-Petersburg, Russia  
E-mail: eshpakova@mail.ru  
Fax: (812) 328-68-69; tel.: (812) 323-10-50

The search of highly selective regulators of hormonal signaling systems is a one of actual problems of molecular endocrinology. The most perspective regulators are the synthetic peptides, corresponding to the regions of intracellular loops (ICL) of the receptors that interact with heterotrimeric G proteins. The aim of this work are the synthesis of the peptides, derivatives of C-terminal region 258-268 of the third ICL of the serotonin receptor of the type 6 (5-HTR<sub>6</sub>) coupled with adenylyl cyclase (AC) in a stimulatory manner, and the study of influence of these peptides on serotonin-sensitive adenylyl cyclase signaling system in rat brain. In the first time three peptides (5-HTR<sub>6</sub>-peptides) were synthesized: KHSRKALKASL<sup>258-268</sup>KA-amide (I), corresponding C-terminal region of the third ICL of 5-HTR<sub>6</sub>, its palmitoylated analog KHSRKALKASL<sup>258-268</sup>K(Palm)A-amide (II) and dimer (KHSRKALKASL<sup>258-268</sup>KG)<sub>2</sub>KA (III). All 5-HTR<sub>6</sub>-peptides stimulated basal activity of AC and basal level of GTP-binding in membrane fraction of rat brain. The most effective was peptide II. The action of the 5-HTR<sub>6</sub>-peptides was selective to 5-HTR<sub>6</sub>. In the presence of the peptides AC and GTP-binding stimulatory effects of serotonin were decreased and the effects of EMDT, a selective agonist of 5-HTR<sub>6</sub>, were blocked, while the effects of 5-carboxyamidotryptamine and 8-OH-DPAT that activate the other type of 5-HTR were preserved. The peptide II inhibited stimulatory effects of serotonin decreasing in the presence of antagonists cyanopindolol and ketanserin that practically not act on 5-HTR<sub>6</sub>, but the peptide not influence on serotonin effects decreasing in the presence of antagonists SB-271046 and methiothepine that blocked the signal transduction via 5-HTR<sub>6</sub>. Summing up, 5-HTR<sub>6</sub>-peptides activate the components of adenylyl cyclase signaling system in rat brain and selectively disturb the transduction of hormonal signal via 5-HTR<sub>6</sub> and not interact with 5-HTR of the other types.

The work is supported RFBI (Grant № 09-04-00746a) and Program "Fundamental sciences – medicine" (2009).

**ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИАНИЛИНСОДЕРЖАЩИХ СОРБЕНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИСУЛЬФОКИСЛОТНЫХ МАТРИЦ**

*Ягудеева Е.Ю., Капустин Д.В., Букина Я.А., Тверской В.А.\*, Рязанцев Д.Ю., Завериев С.К., Zubov В.П.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия  
\*Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия  
E-mail: zubov@ibch.ru  
Факс (495) 335-10-11; тел.: (495) 336-06-00

Ранее было показано, что сорбент на основе кремнезема, модифицированного полианилином (ПАНИ), селективен при разделении нуклеиновых кислот и белков, а также ДНК и РНК. Однако, процесс получения ПАНИ-содержащих композиционных сорбентов сопровождается образованием в объеме реакционной смеси слабозакрепленных на поверхности носителя частиц ПАНИ, что значительно затрудняет процедуру последующей очистки сорбентов и снижает эффективность их применения для выделения биополимеров, в частности, нуклеиновых кислот (НК) и белков.

В качестве одного из способов локализации процесса роста макромолекулы ПАНИ на поверхности носителя было предложено проводить окислительную полимеризацию анилина на поверхности силанированного кремнезема, дополнительно модифицированного полисульфокислотой. При этом использовали коммерчески доступную поли-(2-акриламидо-2-метил-1-пропан)сульфоновую кислоту (ПАМПСК, Мм 2000000), а также синтезированные нами полистиролсульфокислоты (ПССК) различной молекулярной массы.

Показано, что полученные предложенным способом ПАНИ-содержащие сорбенты эффективны при выделении и очистке ДНК из сложных смесей (например, бактериальных лизатов). Однако, присутствие ПАМПСК в составе ПАНИ-содержащего сорбента приводит к деградации макромолекулы ДНК при хранении полученных ДНК-содержащих элюатов. По-видимому, этот эффект обусловлен экспонированием в раствор не связанных с носителем боковых активных сульфогрупп высокомолекулярной полисульфокислоты, инициирующих гидролиз НК.

Для устранения указанного эффекта в качестве полимерного сомодификатора при получении сорбентов мы использовали предварительно синтезированные в различных средах полистиролсульфокислоты с меньшей молекулярной массой (от 70000 до 500000). Показано, что полученные ПСС-ПАНИ-содержащие сорбенты селективны к парам НК-белок и ДНК-РНК и их использование не приводит к разрушению ДНК при хранении.

Таким образом, предложенный подход значительно упрощает технологию получения ПАНИ-модифицированных сорбентов, поскольку при полимеризации анилина в присутствии полистиролсульфокислоты не образуется взвеси частиц ПАНИ в объеме реакционной смеси, кроме того, появляется возможность использовать в качестве модификаторов поверхности носителя предварительно полученные поликомплексы ПССК-ПАНИ.

Работа поддержана грантом ЕС № 037212 (LSHB-CT-2007-037212) DIAGNOSIS.



## PREPARATION OF A POLYANILINE ADSORBENTS ON THE POLY(SULFONIC ACID) MATRIX

*Yagudaeva E.Yu., Bukina Ya.A., Kapustin D.V., Tverskoy V.A. \*, Ryazantsev D.Yu., Zavriev S.K., Zubov V.P.*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

\*Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow, Russia

E-mail: zubov@ibch.ru

Fax. (495) 335-10-11; tel.: (495) 336-06-00

It was shown earlier, that the adsorbents based on silica modified with polyaniline (PANI) was selective when the separation of nucleic acids and proteins as well as DNA and RNA was carried out. However, the synthesis of PANI-containing composite adsorbents results in the formation of a significant amount of PANI particles weakly attached to the support surface in the bulk of the reaction mixture. This circumstance significantly complicates further purification of adsorbents and decreases efficiency of their use for separation of nucleic acids (NA) and proteins.

We suggested to carry out the aniline polymerization on the surface of silaminated silica additionally modified with polysulfonic acid as one of the methods of polymerization localization. At that the commercially available poly-2-(acrilamid-2-methyl-1-propane) sulfonic acid (PAMPSA, Mm 2000000) and also synthesized by us poly(4-styrenesulfonic acids) with different molecular mass were used.

It was shown, that the adsorbents obtained through the suggested method were effective for DNA isolation and purification from the complex mixtures (i.e. from the bacterial lysates). However the presence of PAMPSA in the content of adsorbent results in DNA degradation under the storage of the DNA-containing eluates. This effect is probably caused by the presence of unconnected with the support active side-chain sulfo groups of high molecular polysulfonic acid which initiate the nucleic acid hydrolysis.

To avoid the described effect used poly(styrenesulfonic acids) preliminary synthesized in the different media with lower molecular mass (from 70000 to 500000) as a polymer co-modifier.

It was shown that obtained PSSA-PANI adsorbents do not result in DNA degradation and they are selective to the pairs NA-protein and DNA-RNA.

Thus, with the use of matrix polymerization of aniline several problems can be solved. Firstly, the polymerization of aniline in the presence of PSSA is proceeding without formation of a suspension of PANI particles in the bulk of the reaction mixture. In this case, washing of the final adsorbent is significantly simplified and the adsorbent quality is improved. Secondly, the employment of the preformed PSSA-PANI polycomplexes as new polymer modifiers of the support surface makes it possible to simplify the manufacturing of composite adsorbents.

This work was supported by EU grant no. 037212 (LSHB-CT-2007-037212) DIAGNOSIS.

## РЕКОМБИНАНТНОЕ ГУМАНИЗОВАННОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ F1 АНТИГЕНА *YERSINIA PESTIS*

*Ягудин Т.А., Марченко А.Н., Зацепин С.С., Городецкая С.Б. \*, Солопова О.Н. \*, Шемчукова О.Б. \*, Свешников П.Г. \*, Беневоленский С.В.*

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

E-mail: TimYagudin@gmail.com

Факс/тел.: (495) 648-09-12

\*Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва, Россия

E-mail: petersveshnikov@list.ru

Факс/тел.: (499) 613-23-65

Капсульный F1 антиген является главным иммунохимическим компонентом поверхностного антигена *Y. pestis*. Гибридома F19-107, секретирующая моноклональные антитела (мАт) против F1 антигена *Y. pestis*, была получена после иммунизации мыши F1 антигеном. Моноклональные антитела F19 против F1 антигена *Y. pestis* показывают высокую специфическую активность и обладают высокоэффективной протективной способностью. Kd мАт против F1 антигена *Y. pestis* составляет  $5 \times 10^{-9}$  М.

Гены, кодирующие Fab-фрагмент мышиноного мАт против F1 антигена *Y. pestis*, были клонированы с использованием мРНК из соответствующей гибридомы в качестве матрицы и секвенированы. Сконструирован штамм *Pichia pastoris*, продуцирующий рекомбинантный Fab-фрагмент мышиноного мАт против F1 антигена *Y. pestis*. Иммуноферментный анализ связывания рекомбинантного и энзиматически полученного Fab-фрагментов показал, что рекомбинантный Fab высоко специфичен против F1 антигена *Y. pestis*. Kd рекомбинантного Fab против F1 антигена *Y. pestis* составляет  $5 \times 10^{-10}$  М, в то время как Kd энзиматически полученного Fab мАт против F1 антигена *Y. pestis* –  $1 \times 10^{-8}$  М.

Сконструированы гены Fab-фрагмента гуманизованного мАт против F1 антигена *Y. pestis*. Эти гены состоят из гуманизованных последовательностей переменных доменов тяжелой и легкой цепей мАт против F1 антигена *Y. pestis*, слитных в рамках считывания с C<sub>H</sub>1 доменом тяжелой цепи антител человека класса IgG1 и константным доменом легких цепей антител человека класса каппа, соответственно.

В результате трансформации клеток *P. pastoris* экспрессионными кассетами, содержащими гены Fab-фрагмента гуманизованного мАт против F1 антигена *Y. pestis*, был получен штамм *P. pastoris*, продуцирующий Fab гуманизованного мАт против F1 антигена *Y. pestis*. Kd гуманизованного Fab против F1 антигена *Y. pestis* составляет  $8 \times 10^{-8}$  М.



## RECOMBINANT HUMANIZED ANTIBODY AGAINST F1 ANTIGEN *YERSINIA PESTIS*

Yagudin T.A., Marchenko A.N., Zatsepin S.S., Gorodetskaya S.B. \*,  
Solopova O.N. \*, Shemchukova O.B. \*, Sveshnikov P.G. \*, Benevolensky S.V.

Bach Institute of Biochemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: TimYagudin@gmail.com

Fax/tel.: (495) 648-09-12

\*Russian Research Center for Molecular Diagnostics and Therapy, Moscow, Russia

E-mail: petersveshnikov@list.ru

Fax/tel.: (499) 613-23-65

Capsular F1 antigen is a main immunochemical component of *Y. pestis* surface antigen. The hybridoma F19-107 which secretes a monoclonal antibody (mAb) specific for the F1 antigen from *Y. pestis* was produced after immunizing a mouse with the F1 antigen. The mAb F19 against F1 antigen from *Y. pestis* demonstrated high specific activity and appears to be highly effective to protect mice against the challenge by the virulent strain of *Y. pestis* F1 (+). Kd for the mAb to F1 antigen from *Y. pestis* is equal to  $5 \times 10^{-9}$  M.

Genes encoding Fab fragment of mouse mAb against the F1 antigen of *Y. pestis* were cloned using mRNA from appropriate cell line as a template and sequenced. *Pichia pastoris* strain producing recombinant Fab fragment of mouse mAb against F1 antigen *Y. pestis* was constructed. Analysis of recombinant and natural mouse Fab's binding using ELISA has shown that recombinant Fab is highly specific against F1 antigen from *Y. pestis*. Kd for the recombinant Fab against F1 antigen from *Y. pestis* is equal to  $5 \times 10^{-10}$  M whereas Kd for the enzymatically processed Fab of mouse mAb F19 against F1 antigen from *Y. pestis* is equal to  $1 \times 10^{-8}$  M.

Genes coding for Fab of humanized mAb against F1 antigen from *Y. pestis* were constructed. These genes contain humanized sequences of mouse mAb F19 heavy and light chains variable regions fused with C<sub>H</sub>1 domain of heavy chain of human immunoglobulin IgG1 and constant domain CL of light chain of human immunoglobulin kappa correspondingly. Introduction of these genes in appropriate expression plasmid into *P. pastoris* cells results in obtaining *P. pastoris* strain producing recombinant Fab fragment of humanized mAb F19. Kd for humanized Fab against F1 antigen from *Y. pestis* was determined in two-stage ELISA equal to  $8 \times 10^{-8}$  M.

## АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ДВУХ ПРОЛИН-БОГАТЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ЛЕЙКОЦИТОВ КОЗЫ

Ямщикова Е.В., Шамова О.В., Овчинникова Т.В. \*, Орлов Д.С.,  
Кокряков В.Н.

НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

\*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: kokryak@yandex.ru

Факс: (812) 234-94-93; тел.: (812) 234-07-64

Антимикробные пептиды (АМП) системы врожденного иммунитета животных и растений обеспечивают первую линию противоинойфекционной защиты живых организмов. Пролин-богатые пептиды (ПБП) составляют группу АМП с выраженной антимикробной активностью, преимущественно в отношении грамотрицательных бактерий. Антимикробное действие ПБП, в отличие от такового у большинства других АМП, как предполагается, осуществляется не за счет повреждения мембран микроорганизмов, а направлено на нарушение различных внутриклеточных процессов. Мы исследовали антимикробные эффекты двух ПБП, выделенных нами ранее из лейкоцитов козы – Вас 2,8 и Вас 2,9. Эти пептиды являются N-концевыми фрагментами пептида Вас 7,5 козы, структура которого описана в литературе и была установлена в результате клонирования генов кателин-содержащих предшественников АМП козы, хотя белковый продукт к настоящему времени не был выделен из лейкоцитов и биологическая активность его не изучена. Оба исследуемых пептида, Вас 2,8 и Вас 2,9, как и другой ПБП козы – Вас5, демонстрируют высокую антимикробную активность в отношении широкого спектра микроорганизмов (метод радиальной диффузии) в средах с низкой концентрацией хлорида натрия; минимальные концентрации пептидов, ингибирующие рост микроорганизмов, составляют 0,5-2,5 мкМ для большинства исследованных нами штаммов. В средах, содержащих NaCl в концентрации 0,15 мМ, активность этих пептидов в отношении *Escherichia coli* и *Listeria monocytogenes* существенно не менялась, в то время как их антимикробное действие в отношении *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* в этих условиях оказалась сниженной. Оба пептида обладали высокой антимикробной активностью в отношении антибиотико-резистентных клинических изолятов *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*, независимо от концентрации соли в среде. Исследуемые ПБП в концентрациях до 100 мкМ не проявляли гемолитической активности в отношении эритроцитов человека, а также не обладали цитотоксическим действием на опухолевые и нормальные клетки млекопитающих. Таким образом, изученные нами ПБП, имеющие высокую антимикробную активность и низкую токсичность в отношении клеток человека, могут служить моделями для создания новых антибиотических лекарственных препаратов.

Работа поддержана грантами РФФИ № 07-04-01759; 09-04-01655 и Гос. контрактом 02.512.11.2234.

## ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF TWO PROLINE-RICH PEPTIDES FROM GOAT LEUKOCYTES

*Yamschikova E.V., Shamova O.V., Ovchinnikova T.V.\*, Orlov D.S., Kokryakov V.N.*

Institute of Experimental Medicine RAMS, St.-Petersburg, Russia

\*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: kokryakov@yandex.ru

Fax: (812) 234-94-93; tel.: (812) 234-07-64

Antimicrobial peptides (AMPs) from the innate immune system of animals and plants provide a first line of anti-infective defense in the living kingdom. Proline-rich peptides (PRP) constitute a group of AMP with distinct antimicrobial activity predominantly towards Gram-negative bacteria. Their antimicrobial action, in contrast with most of other AMPs, is believed to occur via non-lytic mechanism and directed to intracellular targets. We investigated antimicrobial activity of two PRP which we recently isolated from goat leukocytes – Bac 2.8 and Bac 2.9. Both peptides are defined as N-terminal fragments of caprine Bac 7.5 whose structure has been previously deduced from cDNA of goat cathelicidins, while the whole molecule of this peptide was never isolated from goat blood cells and its biological activity has not been investigated. Similarly to caprine Bac 5, both Bac 2.8 and 2.9 exhibited potent, broad-spectrum antimicrobial activity in the radial diffusion assay under low salt conditions with minimum inhibitory concentrations in the range of 0.5-2.5  $\mu\text{M}$  for most strains. While the peptides remained active against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in the presence of physiological concentration of NaCl (0.15 mM), they lost activity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* under these conditions. Both peptides exerted potent salt insensitive antimicrobial activity towards drug-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. The peptides showed no hemolytic activity even at high dose levels (up to 100  $\mu\text{M}$ ) in human erythrocytes. Both PRP also exerted low cytotoxic activity towards tested normal and tumor mammalian cells *in vitro*. Thus, these two PRP with potent antibiotic activity and low toxicity for host cells may be considered as templates for design of new therapeutics with antimicrobial action.

This work was supported by the RFBR grants No 07-04-01759; 09-04-01655 and State contract 02.512.11.2234.

## АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Аббасова С.Г.	105, 339	Безуглов В.В.	57
Абдувахабов А.А.	376	Белевская Р.Г.	197
Абдухаликова М.А.	286	Белжеларская С.Н.	95
Аваков А.Э.	202	Беликов Н.Е.	184
Авшалумов А.Ш.	107	Белозерская Т.А.	188
Агапкина Ю.Ю.	154	Белоусов В.В.	284
Акимкин Т.М.	374	Беневоленский С.В.	433
Акимов М.Г.	57	Бинюков В.И.	113
Аксюк А.А.	262	Биссесар Э.	387
Албантова А.А.	113	Бичучер А.М.	202
Алекперов Э.А.	350	Бобров М.Ю.	57
Александровский Я.А.	391	Боброва И.	387
Алексеева А.С.	111	Бобрусин А.И.	137
Алексеева Л.Г.	176	Бовин В.Н.	212
Алексеева О.М.	113	Бовин Н.В.	39, 62
Аллилуев А.П.	202	Богатова О.В.	312
Андреев Я.А.	115, 245	Богатырёва Н.С.	53
Андрианова А.Г.	363	Богачева Е.Н.	139
Андропова Т.М.	78, 176	Богачук А.П.	271
Антипова Н.В.	117, 314	Богданов А.А.	10
Ануфриев М.А.	395	Богданов А.М.	279
Арапиди Г.П.	119	Боженко В.К.	264
Арсеньев А.С.	143, 164, 169, 173, 298, 304, 329, 347	Бозиев Х.М.	266
Артамонов А.А.	121	Бойко А.А.	238, 350
Артемова Н.В.	123	Болдырев И.А.	111, 190
Артюхов А.А.	367	Болдырева Е.Ф.	325
Баженова М.В.	250	Большунова Е.А.	141
Базалий А.В.	125	Бондарева В.М.	427
Баирамашвили Д.И.	127, 137, 178, 231, 421	Борисова О.Ф.	225
Байрамов А.В.	129	Бочаров Э.В.	143, 298
Баландин С.В.	365	Бочарова О.В.	298
Балашова Т.А.	304	Брегадзе В.И.	406
Барабанщикова В.С.	296	Бровко Ф.А.	266
Баранник А.П.	131	Бубуненко М.Г.	250, 254
Баратова Л.А.	139	Бугайчук О.В.	146
Баринов Н.А.	304	Буздин А.А.	91, 135
Барсуков Л.И.	365	Букина Я.А.	431
Баскаев К.К.	135	Булатова И.В.	150
Безбородова О.А.	292	Бумагина З.М.	123
		Бурлакова Е.Б.	113, 200, 383
		Бурьянов Я.И.	216, 218, 341, 372, 403, 416

Бызова Н.А.	152	Грандфис К.	393	Ефремов Р.Г.	143	Каложный Д.Н.	225
Валуева Т.А.	335	Грецкая Н.М.	57	Жаберева А.С.	401	Камаева А.Г.	258
Валякина Т.И.	281	Гречихина М.В.	238	Жамсаранова С.Д.	141	Каманин С.А.	233
Ванцева С.И.	154	Грин М.А.	406	Жердев А.В.	152	Канарский А.В.	150
Варфоломеев С.Д.	184	Гришин А.С.	186	Жигачева И.В.	200	Кандыба А.Г.	62
Василевский А.А.	245, 304	Гришин Е.В.	12, 115, 245, 304, 339, 425	Жигис Л.С.	202	Каневский Л.М.	238
Васильева Е.А.	357	Грищенко В.В.	186	Жмак М.Н.	365	Капустин Д.В.	431
Васильева Е.Л.	357	Гроза Н.В.	188	Жумабеков Е.Ж.	204	Карашук Г.Н.	227
Васьковский Б.В.	154	Гузов И.И.	131	Забодалова Л.А.	180	Карпенко В.В.	10
Векшин Н.Л.	156	Гуасова Е.А.	231	Заболотнева А.А.	316	Карягина Т.Б.	231
Вертиев Ю.В.	339	Гурвиц Б.Я.	123	Завалова Л.Л.	117, 314	Кашеверов И.Е.	247
Верюгин Б.В.	158	Гуревич Я.М.	367	Завриев С.К.	431	Кашин А.С.	374
Ветчинкина Е.П.	160	Гурская Н.Г.	275	Зайцев С.Ю.	206	Кесслер Ю.В.	296
Виноградова И.И.	339	Гурьянова С.В.	176	Зайцева Ю.В.	208, 210	Кибанов М.В.	307
Винокуров М.Г.	150	Гусаров Д.А.	178, 421	Зайцева-Зотова Д.С.	212	Кирилина Е.А.	197
Вихрева П.Н.	162, 229	Данилов И.М.	180	Замолодчикова Т.С.	214	Кирпичников М.П.	164, 169, 173, 247, 300, 312, 325, 329, 347
Владимирина Н.М.	277	Деев И.Е.	182, 327	Зарайский А.Г.	129, 193	Китова А.Е.	233
Власов Г.П.	427, 429	Деев С.М.	37, 50, 158	Захарченко Н.С.	216, 218, 372	Кладницкая Г.В.	335
Водовозова Е.Л.	62	Дементьева Д.В.	353	Защепин С.С.	433	Клинкова А.В.	350
Вологжанникова А.А.	416	Демин А.В.	137	Защепина О.В.	119, 258	Клинов Д.В.	235
Вольнский П.Е.	143	Демин В.Д.	378	Зверева Е.А.	152	Кнорре Д.Г.	87
Вольпина О.М.	277	Демина О.В.	184	Згода В.Г.	401	Коваленко Е.И.	238
Воронцова О.В.	164, 245	Деркач К.В.	427	Земцов Р.В.	184	Коваленко Т.Ф.	240
Вшивцева Е.Н.	372, 416	Дзантиев Б.Б.	152	Зиганшин Р.Х.	119	Ковалицкая Ю.А.	243
Гаенко Г.П.	62	Долгих Д.А.	247, 312, 325	Зимин А.А.	357	Козлов А.В.	296
Гайибов У.Г.	167	Долгова Т.Г.	186	Зинченко А.А.	300	Козлов И.Г.	78
Гайнуллин М.Р.	401	Дородникова Е.А.	188	Зинченко Г.Н.	57	Козлов Л.В.	202
Галзитская О.В.	53	Дубовский П.В.	190	Зубов В.П.	50, 431	Козлов М.В.	95
Галкина Т.Г.	137	Дьяченко О.В.	372, 416	Зуева В.С.	202	Козлов С.А.	115, 245, 425
Гарбер М.Б.	250, 254, 302	Евгеньев М.Б.	310	Иваненко Г.Ф.	383	Кокряков В.Н.	414, 435
Гарбузинский С.А.	53	Егоров Ц.А.	192, 304	Иванков Д.Н.	53	Колтунова А.А.	131
Гвоздев В.А.	307	Егорова К.С.	307	Иванов А.В.	95	Кондратьева Е.В.	401
Гвоздева Е.Л.	335	Елякова Л.А.	154	Иванов В.Т.	78	Коновалов А.И.	113
Генералова А.Н.	50	Ермаков В.И.	121	Иванова М.А.	220	Кононова Н.В.	137
Генкин Д.	178	Ермакова Г.В.	129	Игнатова А.А.	222, 406	Копанцева Е.Е.	275
Гесслер Н.Н.	188	Ермолина Л.В.	193	Ильинский Н.С.	225	Копейна Г.С.	247
Говорун В.М.	74	Ермолук Я.С.	169, 173	Ильницкая Е.В.	333	Корепанов А.П.	250, 254
Голощاپов А.Н.	383	Ерохина Т.Н.	195	Иоффе С.Л.	355	Коробейникова А.В.	250, 254
Гонгадзе Г.М.	250	Ерошкин Ф.М.	129	Исмаилов Р.Г.	416	Коробко Е.В.	162
Гончарук М.В.	143, 169	Ефимов В.А.	89	Какуев Д.Л.	227	Коробко И.В.	162, 229, 418
Гончарук С.А.	169, 173	Ефремов Е.С.	292, 367	Каленик Т.К.	186	Коршунова Г.А.	10
Городецкая С.Б.	433	Ефремов М.А.	197	Калининченко С.В.	229		
Гороховатский А.Ю.	403						

Косарев С.	178	Любавина И.А.	281	Недоспасов С.А.	48	Прошкин С.А.	67
Костанян И.А.	227, 271, 337	Люкманова Е.Н.	247	Некрасов А.Н.	300, 312, 325	Прошкина Г.М.	67
Костарева О.С.	302	Майзель М.Л.	143	Некрасова В.К.	273	Прудченко И.А.	292, 367
Котельникова О.В.	202	Маринич Д.В.	416	Немцова Е.Р.	292	Пустовалова Ю.Е.	169, 329
Кочетков С.Н.	95	Марквичева Е.А.	212, 367, 393	Несмеянов В.А.	78, 266, 339	Пучков И.А.	137
Кравченко О.В.	260	Марквичёва К.Н.	284	Нефедова Н.В.	296	Радциг М.А.	331
Крапф Г.	387	Мартынов В.И.	323	Никитина В.Е.	160	Радченко В.В.	333, 337
Красильщикова М.С.	119, 258	Мартынова Н.Ю.	129, 193	Никонов С.В.	302	Разгуляева О.А.	202
Кривандин А.В.	383	Марченко А.Н.	433	Никонова Е.Ю.	302	Ракитина Д.В.	195
Кричковская Л.В.	260	Маслов М.А.	111	Новиков П.С.	150	Рахимова Ш.Х.	286
Круговов Д.А.	146	Маслова А.С.	222	Ножевникова А.Н.	273	Ревина А.А.	121
Крюкова Е.А.	325	Межлумян Л.Г.	286	Нольде С.Б.	304	Ревина Т.А.	335
Кузнецова Л.А.	427	Мельников Э.Э.	363	Овчинникова Т.В.	365, 414, 435	Решетилов А.Н.	233
Кузнецова Н.Р.	62	Месянжинов В.В.	262, 287	Одинцова Т.И.	192	Рогожин Е.А.	304
Куликов Е.Е.	423	Мещерякова Е.А.	176	Озолина Л.А.	131	Родионов И.Л.	271
Курочкина Л.П.	262	Миль Е.М.	113	Олейников В.А.	50	Родионова А.С.	337
Куханова М.К.	95	Минеев К.С.	143	Оленина Л.В.	307	Россманн М.Г.	262
Кучина М.Н.	264	Минкевич И.Г.	319	Оленкина О.М.	307	Ротанова Т.В.	363
Кушлинский Н.Е.	105	Мироненко Л.С.	260	Онопrienко Л.В.	292	Руденко Н.В.	339
Лазарев В.Ф.	296	Миронов А.Ф.	406	Орлов Д.С.	414, 435	Рукавцова Е.Б.	341
Ламажапова Г.П.	141	Мирошников А.И.	369	Остров В.Ф.	310	Румш Л.Д.	202, 385
Ламан А.Г.	266	Мирошников К.А.	220, 287, 410, 423	Островерхова Т.В.	312	Рымарь С.Е.	125
Лаптев А.В.	184	Михайлова А.А.	197	Островский М.А.	29	Рязанцев Д.Ю.	431
Ласман В.	178	Михайлова А.Г.	385	Павлоков М.С.	314	Савинов Г.В.	266
Лебедев В.Г.	269	Михалев И.И.	289	Пагаев Р.М.	227	Сагдиев Н.Ж.	345
Лебедев Ю.Б.	91	Михалева И.И.	292	Пальченкова Н.Б.	421	Сагдуллаев Б.Т.	286
Леонова Ю.Ф.	414	Мишина Н.М.	284	Панкеев Н.Н.	245	Садовников В.Б.	243
Лесив А.В.	355	Моисеев А.А.	389	Панова И.Г.	374	Сайтмуратова О.Х.	343, 345
Лещинер А.Д.	195	Моисеева Е.В.	62, 264, 296, 391	Парфенов И.А.	335	Салахутдинов Б.А.	167
Липасова В.А.	208	Молотковский Ю.Г.	62	Патрушев Л.И.	131, 240, 316, 319	Самсонова О.В.	347
Липкин В.М.	105, 227, 271, 333, 337	Момот В.И.	260	Патрушева Н.Л.	316	Сапожников А.М.	238, 350
Литти Ю.В.	273	Морозов С.Ю.	195	Пахомов А.А.	323	Свердлов Е.Д.	91
Лицзюань Чжан	275	Москаленко Е.А.	357	Пепелина Т.Ю.	312	Свешников П.Г.	433
Лобанова Н.В.	277	Мошковский С.А.	302	Перцева М.Н.	427	Свешникова Е.В.	137
Лобанова Н.Н.	381	Мурашев А.Н.	271, 310, 381, 387	Петренко А.Г.	82, 182, 327	Свищевская Е.В.	353
Лукаш С.В.	158	Мягкова Г.И.	188	Петрова Е.Э.	281	Себякина Т.Ю.	385
Лукин А.Ю.	184	Наволоцкая Е.В.	243	Петровская Л.Е.	325	Северин Е.С.	100
Лукьянов К.А.	275, 279	Надеждин К.Д.	298	Пиголева С.В.	216	Севрин Ш.	393
Лукьянов С.А.	284	Назаров Т.А.	343	Поздеев В.И.	227	Селина О.Е.	212
Луцан Н.И.	350	Невская Н.А.	302	Попова Н.В.	182, 327	Семакин А.Н.	355
Луценко Г.В.	238			Потапенко Н.А.	277	Семенов В.Ф.	238
Лысенко А.А.	353			Проخورов А.В.	353	Семёнов А.М.	220
						Семущина С.Г.	264, 296, 391

Серебрякова М.В.	129	Урусов А.Е.	152	Шевчук Т.В.	372, 416	Шпаковский Г.В.	67
Серова О.В.	182	Фаткуллина Л.Д.	383	Шематорова Е.К.	67	Шпаковский Д.Г.	67
Сиваев И.Б.	406	Фаттахов С.Г.	113	Шемчукова О.Б.	433	Шпрингер М.	254
Сизова Н.В.	421	Феофанов А.В.	164, 222, 347, 406	Шенкарев З.О.	247	Штильман М.И.	367
Сизова С.В.	50	Феофанов С.А.	369	Шепелев М.В.	418	Шуваева Т.М.	333
Скальный А.В.	264	Фильчиков М.В.	287	Шепель Е.Н.	421	Шувалова О.П.	339
Скворцова Н.Н.	180	Финкельштейн А.В.	53	Шепеляковская А.О.	266	Шулепко М.А.	247
Скобликов Н.Э.	357	Формичка-Цеппенцауер Г.	178	Шестаков С.А.	250	Шульга А.А.	169, 173, 329
Скулачев В.П.	43	Хайруллин Р.Ф.	385	Шестибратов К.А.	150, 269, 412	Щеникова А.В.	398
Соловьев А.Г.	195	Хмель И.А.	208, 210, 331	Шибанова Е.Д.	421	Юлдашев П.Х.	286
Соловьева Е.А.	129	Ходонов А.А.	184	Шингарова Л.Н.	325	Юхманова А.А.	218
Солопова О.Н.	433	Хорошилова Н.И.	154	Шишкина А.В.	10	Ягудаева Е.Ю.	202, 431
Сонькина С.Н.	167	Хохлова О.Н.	387	Шишков А.В.	139	Ягудин Т.А.	433
Сорокань А.В.	361	Хохрин Д.В.	389	Шкатула С.В.	423	Якимов С.А.	325
Спирин А.С.	8	Хрипкина Н.А.	391	Шляпников Ю.М.	425	Якубовская Р.И.	292
Степнов А.А.	363	Хрунин А.В.	389	Шнейдер М.М.	220, 410	Ямщикова Е.В.	435
Сторожева З.И.	271, 333	Цетлин В.В.	121	Шпаков А.О.	427, 429		
Сумбатян Н.В.	10	Цетлин В.И.	17, 247	Шпакова Е.А.	427, 429		
Сурина Е.А.	271, 337	Цой А.М.	393				
Суханов С.В.	365	Чакаева А.Ш.	398				
Суханова Т.В.	367	Чащинова Д.В.	363				
Сухоруков А.Ю.	355	Чеботарева Е.Н.	341				
Сухорукова Н.А.	381	Чепкова И.Ф.	395				
Сыкилинда Н.Н.	287, 410, 423	Черепанова Е.А.	361				
Сычева А.М.	302	Черменская Т.Д.	398				
Тагаев А.А.	414	Чернорудский А.Л.	401				
Таран С.А.	369	Чернофф Д.	418				
Тарасенко И.И.	427, 429	Чернышов С.В.	403				
Тарлачков С.В.	372	Черткова Р.В.	312				
Татиколов А.С.	374	Чертов О.Ю.	84				
Тверской В.А.	431	Честнова А.В.	406				
Тиялябаев З.	376	Чизмаджев Ю.А.	24				
Тиялябаев К.З.	167	Чикин Л.Д.	292, 367				
Тихонов Р.В.	173	Чупин В.В.	190				
Тищенко С.В.	302	Чупров-Неточин Р.Н.	220, 410				
Ткач Е.Н.	169, 329	Чурочкина О.А.	412				
Ткачук В.А.	26	Шаденова Е.А.	204				
Третьяков В.Е.	333	Шайхутдинова Э.Р.	387				
Трубецкая О.Е.	378	Шалойко Л.А.	378				
Трубецкой О.А.	378	Шамова О.В.	414, 435				
Туницкая В.Л.	95	Шахпаронов М.И.	117, 314				
Туховская Е.А.	381						



## AUTHOR INDEX

Abbasova S.G.	106, 340	Bazalii A.V.	126	Bumagina Z.M.	124	Dorodnikova E.A.	189
Abdulaev N.G.	31	Bazhenova M.V.	252	Burkhead J.	55	Dubovskii P.V.	191
Abdovakhabov A.A.	377	Belevskaya R.G.	198	Burlakova E.B.	114, 201, 384	Dyachenko O.V.	373, 417
Agapkina Ju. Yu.	155	Belikov N.E.	185	Buryanov Ya.I.	217, 219, 342, 373, 405, 417	Dzantiev B.B.	153
Akimkin T.M.	375	Belin S.	72	Buzdin A.A.	93, 136	Efimov V.A.	90
Akimov M.G.	59	Belousov V.V.	285	Byzova N.A.	153	Efremov E.S.	294, 368
Aksyuk A.A.	263	Belozerskaya T.A.	189	Carafoli E.	7	Efremov M.A.	198
Albantova A.A.	114	Belzhelarskaya S.N.	96	Cartet G.	72	Efremov R.G.	145, 199
Albaret M.A.	72	Benevolensky S.V.	434	Chakaeva A.Sh.	400	Egorov T.A.	305
Alekperov E.A.	352	Bezborodova O.A.	294	Chaschinova S.V.	364	Egorova K.S.	309
Aleksandrovski J.A.	392	Bezuglov V.V.	59	Chebotareva E.N.	342	Elyakova L.A.	155
Alekseeva A.S.	112	Bichucher A.M.	203	Chepkova I.F.	397	Ermakov V.I.	122
Alekseeva O.M.	114	Binyukov V.I.	114	Cherepanova E.A.	362	Ermakova G.V.	130
Alliluev A.P.	203	Bissessar E.	388	Chermenskaja T.D.	400	Ermolina L.V.	194
Alvarado J.	28	Bobrov M. Yu.	59	Chernoff J.	420	Ermolyuk Ya.S.	171, 175
Andreev Ya.A.	116, 246	Bobrova I.	388	Chernorudskiy A.L.	402	Erokhina T.N.	196
Andrianova A.G.	364	Bobruskin A.I.	138	Chernyshov S.V.	405	Eroshkin F.M.	130
Andronova T.M.	80, 177	Bocharov E.V.	145, 299	Chertkova R.V.	313	Evgen'ev M.B.	311
Antipova N.V.	118, 315	Bocharova O.V.	299	Chertov O. Yu.	85	Fatkullina L.D.	384
Anufriev M.A.	397	Bogacheva E.N.	140	Chertova E.N.	97	Fattahov S.G.	114
Arapidi G.P.	120	Bogachuk A.P.	272	Chestnova A.V.	408	Feofanov A.V.	166, 224, 349, 408
Arseniev A.S.	145, 166, 171, 175, 299, 305, 330, 349	Bogatova O.V.	313	Chikin L.D.	294, 368	Feofanov S.A.	371
Artamonov A.A.	122	Bogatyeva N.S.	54	Chizmadzhev Yu.A.	25	Filchikov M.V.	288
Artemova N.V.	124	Bogdanov A.A.	11	Chugunov A.O.	199	Finder V.H.	306
Artyukhov A.A.	368	Bogdanov A.M.	280	Chupin V.V.	191	Finkelstein A.V.	54
Avakov A.E.	203	Bojenko V.K.	265	Chuprov-Netochin R.N.	221, 411	Formicka-Zeppenauer G.	179
Avshalumov A.S.	109	Boldyrev I.A.	112, 191	Churochkina O.A.	413	Franke M.	98
Azzi A.	102	Boldyreva E.F.	326	Ciechanover A.	42	Frobert E.	72
Bairamashvili D.I.	128, 138, 179, 232, 422	Bolshunova E.A.	142	Cortijo M.	28	Gabibov A.G.	34
Balandin S.V.	366	Bondareva V.M.	428	Couderc C.	72	Gaenko G.P.	64
Balashova T.A.	305	Borisova O.F.	226	Coute Y.	72	Gainullin M.R.	402
Barabanshchikova V.S.	297	Borson-Chazot F.	72	Danilov I.M.	181	Galkina T.G.	138
Barannik A.P.	133	Bovin N.V.	41, 64	Dementyeva D.V.	354	Galzitskaya O.V.	54
Baratova L.A.	140	Bovin V.N.	213	Demin A.V.	138	Garber M.B.	252, 256, 303
Barinov N.A.	305	Boyko A.A.	239, 352	Demin D.V.	380	Garbuzinsky S.A.	54
Barnstable C.J.	22	Boziev Kh.M.	268	Demina O.V.	185	Gayibov U.G.	168
Barsukov L.I.	366	Bregadze V.I.	408	Derkach K.V.	428	Generalova A.N.	51
Baskaev K.K.	136	Brovko F.A.	268	Deyev I.E.	183, 328	Genkin D.	179
Bayramov A.V.	130	Bubunenko M.G.	252, 256	Deyev S.M.	38, 51	Gessler N.N.	189
		Bugaychuk O.V.	148	Diaz J.-J.	72	Glockshuber R.	15, 306
		Bukina Ya.A.	432	Dolgikh D.A.	249, 313, 326	Goloschapov A.N.	384
		Bulatova I.V.	151	Dolgoval T.G.	187	Goncharuk M.V.	145, 171

Goncharuk S.A.	171, 175	Kaluzhny D.N.	226	Korshunova G.A.	11	Lobanova N.N.	382
Gongadze G.M.	252	Kamaeva A.G.	259	Kosarev S.	179	Lobanova N.V.	278
Gorodetskaya S.B.	434	Kamanin S.A.	234	Kostanyan I.A.	228, 272, 338	Lukin A.Yu.	185
Gorokhovatsky A. Yu.	405	Kanarskiy A.V.	151	Kostareva O.S.	303	Lukyanov K.A.	276, 280
Govorun V.M.	76	Kandyba A.G.	64	Kotelnikova O.V.	203	Lukyanov S.A.	285
Grandfils Ch.	394	Kanevski L.M.	239	Kovalenko E.I.	239	Lutsan N.I.	352
Grechikhina M.V.	239	Kapustin D.V.	432	Kovalenko T.F.	242	Lutsenko S.V.	55
Gretskaya N.M.	59	Karaschuk G.N.	228	Kovalitskaya Yu.A.	244	Lutsenko G.V.	239
Grin M.A.	408	Karpenko V.V.	11	Kozlov A.V.	297	Lysenko A.A.	354
Grischenko V.V.	187	Karyagina T.B.	232	Kozlov I.G.	80	Lyukmanova E.N.	249
Grishin A.S.	187	Kasheverov I.E.	249	Kozlov L.V.	203	Magron A.	72
Grishin E.V.	13, 116, 246, 305, 340, 426	Kashin A.S.	375	Kozlov M.V.	96	Marchenko A.N.	434
Groza N.V.	189	Kessler Yu.V.	297	Kozlov S.A.	116, 246, 426	Marinich D.V.	417
Gukasova E.A.	232	Khairullin R.F.	386	Krapf H.	388	Markvicheva E.A.	213, 368, 394
Gurevich Y.M.	368	Khmel I.A.	209, 211, 332	Krasilshchikova M.S.	120, 259	Markvicheva K.N.	285
Gurskaya N.G.	276	Khodonov A.A.	185	Kravchenko O.V.	261	Martynov V.I.	324
Gurvits B. Ya.	124	Khokhlova O.N.	388	Krichkovskaya L.V.	261	Martynova N. Yu.	130, 194
Guryanova S.V.	177	Khokhrin D.V.	390	Krivandin A.V.	384	Maslov M.A.	112
Gusarov D.A.	179, 422	Khoroshilova N.I.	155	Krugovov D.A.	148	Maslova A.S.	224
Guzov I.I.	133	Khripkova N.A.	392	Kryukova E.A.	326	Mayzel M.L.	145
Gvozdev V.A.	309	Khrunin A.V.	390	Kuchina M.N.	265	Melnikov E.E.	364
Gvozdeva E.L.	336	Kibanov M.V.	309	Kukhanova M.K.	96	Meshcheryakova E.A.	177
Hacot S.	72	Kirilina E.A.	198	Kulikov E.E.	424	Mesyanzhinov V.V.	263, 288
Haertle Th.	86	Kirpichnikov M.P.	166, 171, 175, 249, 301, 313, 326, 330, 349	Kurochkina L.P.	263	Miagkova G.I.	189
Hucho F.	16	Kitova A.E.	234	Kushlinskii N.E.	106	Mikhailova A.A.	198
Huster D.	55	Kladnitskaya G.V.	336	Kuznetsova L.A.	428	Mikhailova A.G.	386
Ignatova A.A.	224, 408	Klinkova A.V.	352	Kuznetsova N.R.	64	Mikhaleva I.I.	294
Ilinsky N.S.	226	Klinov D.V.	237	Laman A.G.	268	Mikhalyov I.I.	291
Ilnitskaya E.V.	334	Knorre D.G.	88	Lamazhapova G.P.	142	Mil E.M.	114
Ioffe S.L.	356	Kochetkov S.N.	96	Laptev A.V.	185	Mineev K.S.	145
Ismailov R.G.	417	Kokryakov V.N.	415, 436	Lasman V.	179	Minkevich I.G.	321
Ivanenko G.F.	384	Koltunova A.A.	133	Lazarev V.F.	297	Mironenko L.S.	261
Ivanov D.N.	54	Kondratieva E.V.	402	Lebedev V.G.	270	Mironov A.F.	408
Ivanov A.V.	96	Kononova N.V.	138	Lebedev Yu.B.	93	Miroshnikov A.I.	371
Ivanov V.T.	80	Kononov A.I.	114	Leonova Yu.F.	415	Miroshnikov K.A.	221, 288, 411, 424
Ivanova M.A.	221	Kopanceva E.E.	276	Leschiner A.D.	196	Mishina N.M.	285
Johansson L.B.-A.	61	Kopeina G.S.	249	Lesiv A.V.	356	Modyanov N.N.	6
Josset L.	72	Korepanov A.P.	252, 256	Lijuan Zhang	276	Moiseev A.A.	390
Kakuev D.L.	228	Korobeinikova A.V.	252, 256	Lipasova V.A.	209	Moiseeva E.V.	64, 265, 297, 392
Kalenik T.K.	187	Korobko E.V.	163	Lipkin V.M.	106, 228, 272, 334, 338	Molotkovsky J.G.	64
Kalinichenko S.V.	230	Korobko I.V.	163, 230, 420	Litty Y.V.	274	Momot V.I.	261
				Ljubavina I.A.	283		

Morozov S.Yu.	196	Patrusheva N.L.	318	Sadovnikov V.B.	244	Shlyapnikov Y.M.	426
Moshkovskii S.A.	303	Pavlyukov M.S.	315	Sagdiev N.J.	346	Shneider M.M.	221, 411
Moskalenko E.A.	359	Pepelina T.Y.	313	Sahl H.-G.	47	Shpakov A.O.	428, 430
Murashev A.N.	272, 311, 382, 388	Pertseva M.N.	428	Saitmuratova O.H.	344, 346	Shpakova E.A.	428, 430
Mussbach F.	98	Petrenko A.G.	83, 183, 328	Salakhutdinov B.A.	168	Shpakovski D.G.	69
Nadezhdin K.D.	299	Petrova E.E.	283	Samsonova O.V.	349	Shpakovski G.V.	69
Navolotskaya E.V.	244	Petrovskaya L.E.	326	Sanchez J.-C.	72	Shtilman M.I.	368
Nazarov T.N.	344	Petrukhin K.	56	Santisteban C.	28	Shulepko M.A.	249
Nedospasov S.A.	49	Pietrucha R.	98	Sapozhnikov A.M.	239, 352	Shuvaeva T.M.	334
Nefedova N.V.	297	Pigoleva S.V.	217	Savinov G.V.	268	Shuvalova O.P.	340
Nekrasov A.N.	301, 313, 326	Popova N.V.	183, 328	Schestibratov K.A.	151, 270, 413	Sivaev I.B.	408
Nekrasova V.K.	274	Potapenko N.A.	278	Schulga A.A.	171, 175, 330	Sizova N.V.	422
Nemtsova E.P.	294	Pourpe S.	72	Schafer B.	98	Sizova S.V.	51
Nesmeyanov V.A.	80, 268, 340	Pozdeev V.I.	228	Scoazec J.-Y.	72	Skalny A.V.	265
Nevskaya N.A.	303	Prokhorov A.V.	354	Sebyakina T.Yu.	386	Skoblikov N.E.	359
Nikitina V.E.	161	Proshkin S.A.	69	Sela M.	32	Skulachev V.P.	45
Nikonov S.V.	303	Proshkina G.M.	69	Selina O.E.	213	Skvortsova N.N.	181
Nikonova E.Yu.	303	Prudchenko I.A.	294, 368	Semakin A.N.	356	Solopova O.N.	434
Nitsch R.M.	306	Puchkov I.A.	138	Semenkov V.F.	239	Solovieva E.A.	130
Nolde S.B.	305	Pustovalova Yu.E.	171, 330	Semenov A.M.	221	Solovyev A.G.	196
Novikov P.S.	151	Pyrkov T.V.	199	Semushina S.G.	297, 392	Sonkina S.N.	168
Nozhevnikova A.N.	274	Radchenko V.V.	334, 338	Serebryakova M.V.	130	Sorokan A.V.	362
Oleinikov V.A.	51	Radzig M.A.	332	Serova O.V.	183	Spirin A.S.	9
Olenina L.V.	309	Rakitina D.V.	196	Severin E.S.	101	Springer M.	256
Olenkina O.M.	309	Ralle M.	55	Sevrin Ch.	394	Stepnov A.A.	364
Onoprienko L.V.	294	Razgulyaeva O.A.	203	Shahparonov M.I.	118, 315	Storozheva Z.I.	272, 334
Orlov D.S.	415, 436	Reissmann S.	98	Shaikhutdinova E.R.	388	Sukhanov S.V.	366
Ostrov V.F.	311	Reshetilov A.N.	234	Shaloiko L.A.	380	Sukhanova T.V.	368
Ostroverkhova T.V.	313	Revina A.A.	122	Shamova O.V.	415, 436	Sukhorukov A.Yu.	356
Ostrovsky M.A.	30	Revina T.A.	336	Shchenikova A.V.	400	Sukhorukova N.A.	382
Ovchinnikova O.Yu.	306	Roche C.	72	Shematorova E.K.	69	Sumbatyan N.V.	11
Ovchinnikova T.V.	366, 415, 436	Rodionov I.L.	272	Shemchukova O.B.	434	Surina E.A.	272, 338
Ozolinya L.A.	133	Rodionova A.S.	338	Shenkarev Z.O.	249	Sverdllov E.D.	93
Pagaev R.M.	228	Rogozhin E.A.	305	Shepel E.N.	422	Sveshnikov P.G.	434
Pakhomov A.A.	324	Rosa-Calatrava M.	72	Shepelev M.V.	420	Sveshnikova E.V.	138
Palchenkova N.B.	422	Rossmann M.G.	263	Shepelyakovskaya A.O.	268	Svirshchevskaya E.V.	354
Pankeev N.N.	246	Rotanova T.V.	364	Shestakov S.A.	252	Sycheva A.M.	303
Panova I.G.	375	Rudenko N.V.	340	Shevchuk T.V.	373, 417	Sykilinda N.N.	288, 411, 424
Papa S.	14	Rukavtsova E.B.	342	Shibanova E.D.	422	Tagaev A.A.	415
Parfenov I.A.	336	Rumsh L.D.	203, 386	Shingarova L.N.	326	Taran S.A.	371
Patrushev L.I.	133, 242, 318, 321	Ryazantsev D.Yu.	432	Shishkina A.V.	11	Tarasenko I.I.	428, 430
		Rymar S.E.	126	Shishkov A.V.	140	Tarlachkov S.V.	373
				Shkatula S.V.	424	Tatkolov A.S.	375

Tikhonov R.V.	175	Walker J.E.	5
Tilyabaev K.Z.	168	Wentworth P.	36
Tilyabaev Z.	377	Wuthrich K.	23
Tishchenko S.V.	303	Yagudaeva E.Yu.	203, 432
Tkach E.N.	171, 330	Yagudin T.A.	434
Tkachuk V.A.	27	Yakimov S.A.	326
Tombran-Tink J.	21	Yakubovskaya R.I.	294
Tossi A.	77	Yamschikova E.V.	436
Tretyakov V.E.	334	Yukhmanova A.A.	219
Trubetskaya O.E.	380	Zabodalova L.A.	181
Trubetskoj O.A.	380	Zabolotneva A.A.	318
Tsetlin V.I.	19, 249	Zaitsev S.Yu.	207
Tsetlin V.V.	122	Zaitseva J.V.	209, 211
Tsoy A.M.	394	Zakharchenko N.S.	217, 219, 373
Tukhovskaya E.A.	382	Zamolodchikova T.S.	215
Tunitskaya V.L.	96	Zaraisky A.G.	130, 194
Tverskoy V.A.	432	Zatsepin S.S.	434
Urusov A.E.	153	Zatsepina O.V.	120, 259
Valueva T.A.	336	Zavalova L.L.	118, 315
Valyakina T.I.	283	Zavriev S.K.	432
Vantseva S.I.	155	Zaytseva-Zotova D.S.	213
Varfolomeev S.D.	185	Zemtsov R.V.	185
Vasilyeva E.A.	359	Zgoda V.G.	402
Vasilyeva E.L.	359	Zhabereva A.S.	402
Vaskovsky B.V.	155	Zhamsaranova S.D.	142
Vassilevski A.A.	246, 305	Zherdev A.V.	153
Vekshin N.L.	157	Zhigacheva I.V.	201
Vertiev Yu.V.	340	Zhigis L.S.	203
Vetchinkina E.P.	161	Zhmak M.N.	366
Vigneron M.	71	Ziganshin R.H.	120
Vikhreva P.N.	163, 230	Zimin A.A.	359
Vinogradova I.I.	340	Zinchenko A.A.	301
Vinokurov M.G.	151	Zinchenko G.N.	59
Vinson Ch.	66	Zoch A.	98
Vladimirova N.M.	278	Zubov V.P.	51, 432
Vlasov G.P.	428, 430	Zueva V.S.	203
Vodopivec I.	306	Zvereva E.A.	153
Vodovozova E.L.	64		
Vologjannikova A.A.	417		
Volpina O.M.	278		
Volynsky P.E.	145		
Vorontsova O.V.	166, 246		
Vshyvceva E.N.	373, 417		

## СОДЕРЖАНИЕ

## CONTENTS

## ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

## ABSTRACTS OF ORAL PRESENTATIONS

HOW ATP IS MADE	
<i>Walker J.E.</i> .....	5
BetaM – AN ENIGMATIC MEMBER OF NA,K-ATPase $\beta$ -SUBUNIT FAMILY	
<i>Modyanov N.N.</i> .....	6
CALCIUM SIGNALING: A MEETING POINT FOR CELLULAR AND STRUCTURAL BIOCHEMISTRY	
<i>Carafoli E.</i> .....	7
БЕЛОК-СИНТЕЗИРУЮЩАЯ МАШИНА КЛЕТКИ	
<i>Спирин А.С.</i> .....	8
PROTEIN-SYNTHESIZING MACHINE OF THE CELL	
<i>Spirin A.S.</i> .....	9
РОЛЬ РИБОСОМНОГО ТУННЕЛЯ В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ: СТРУКТУРНЫЕ АСПЕКТЫ	
<i>Богданов А.А., Сумбатян Н.В., Шишкина А.В., Карпенко В.В., Кориунова Г.А.</i> .....	10
CONTRIBUTION OF THE RIBOSOMAL TUNNEL IN REGULATION OF TRANSLATION: THE STRUCTURAL INSIGHT	
<i>Bogdanov A.A., Sumbatyan N.V., Shishkina A.V., Karpenko V.V., Korshunova G.A.</i> .....	11
СТРУКТУРНОЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПРИРОДНЫХ ЯДОВ	
<i>Гришин Е.В.</i> .....	12
STRUCTURAL AND FUNCTIONAL DIVERSITY OF NATURAL VENOMS	
<i>Grishin E.V.</i> .....	13
MOLECULAR MECHANISMS IN ENERGY TRANSFER RESPIRATORY PROTEINS: FROM PROTEIN ALLOSTERIC COOPERATIVITY TO POST- TRANSLATIONAL MODIFICATION	
<i>Papa S.</i> .....	14
ASSEMBLY OF ADHESIVE TYPE 1 PILI FROM <i>ESCHERICHIA COLI</i>	
<i>Glockshuber R.</i> .....	15
25 YEARS OF RECEPTOR RESEARCH, 25 YEARS OF COOPERATION	
<i>Hucho F.</i> .....	16
ПЕПТИДНО-БЕЛКОВЫЕ НЕЙРОТОКСИНЫ В ИССЛЕДОВАНИЯХ НИКОТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ	
<i>Цетлин В.И.</i> .....	17

PEPTIDE AND PROTEIN NEUROTOXINS IN STUDIES ON NICOTINIC RECEPTORS <i>Tsetlin V.I.</i> .....	19
PDF DETERMINES RISK IN RETINAL NEURODEGENERATIVE DISEASES <i>Tombran-Tink J.</i> .....	21
SIGNAL PATHWAYS THAT REGULATE BOTH NEURAL DEVELOPMENT AND DEGENERATION <i>Barnstable C.J.</i> .....	22
FROM STRUCTURAL BIOLOGY TO STRUCTURAL GENOMICS: THE EXPANDING PROTEIN UNIVERSE <i>Wuthrich K.</i> .....	23
НАНОДОМЕНЫ (РАФТЫ) В МОДЕЛЬНЫХ И КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАНАХ: ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ <i>Чизмаджев Ю.А.</i> .....	24
NANODOMAINS (RAFTS) IN MODEL AND CELL MEMBRANES: THEORETICAL STUDY <i>Chizmadzhev Yu.A.</i> .....	25
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РОСТА И РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ <i>Ткачук В.А.</i> .....	26
MOLECULAR MECHANISMS OF BLOOD VESSELS GROWTH AND REMODELLING <i>Tkachuk V.A.</i> .....	27
THE ROLE OF THE ROSTRAL ANTERIOR CINGULATE IN THE DETECTION OF NOVEL CONFLICTS <i>Cortijo M., Santisteban C. and Alvarado J.</i> .....	28
ОСОБЕННОСТИ ПЕРВОЙ И ПОСЛЕДНЕЙ СТАДИЙ ФОТОЛИЗА ЗРИТЕЛЬНОГО ПИГМЕНТА РОДОПСИНА <i>Островский М.А.</i> .....	29
PECULIARITIES OF THE FIRST AND LAST STAGES OF VISUAL PIGMENT RHODOPSIN PHOTOLYSIS <i>Ostrovsky M.A.</i> .....	30
DIRECT OBSERVATION OF STRUCTURAL COUPLING BETWEEN RHODOPSIN AND TRANSDUCIN <i>Abdulaev N.G.</i> .....	31
TOWARDS THERAPEUTIC VACCINES AGAINST AUTOIMMUNE DISEASES AND CANCER <i>Sela M.</i> .....	32
ARTIFICIAL ENZYMES AND CATALYTIC VACCINES <i>Gabibov A.G.</i> .....	34

THE ANTIBODY-CATALYZED WATER-OXIDATION PATHWAY <i>Wentworth P.</i> .....	36
РЕКОМБИНАНТНЫЕ ПРОТИВОРАКОВЫЕ ИММУНОТОКСИНЫ <i>Деев С.М.</i> .....	37
RECOMBINANT ANTICANCER IMMUNOTOXINS <i>Deyev S.M.</i> .....	38
ЕСТЕСТВЕННЫЕ АНТИТЕЛА К ГЛИКАНАМ: ФАКТЫ И ГИПОТЕЗЫ <i>Бовин Н.В.</i> .....	39
NATURAL ANTIBODIES AGAINST GLYCANS: FACTS AND HYPOTHESES <i>Bovin N.V.</i> .....	41
THE UBIQUITIN PROTEOLYTIC SYSTEM: FROM BASIC MECHANISMS THROUGH HUMAN DISEASES AND ONTO DRUG TARGETING <i>Ciechanover A.</i> .....	42
ПРОИЗВОДНОЕ ПЛАСТОКИНОНА, АДРЕСОВАННОЕ В МИТОХОНДРИИ, КАК СРЕДСТВО, БЛОКИРУЮЩЕЕ ПРОГРАММУ СТАРЕНИЯ ОРГАНИЗМА <i>Скулачев В.П.</i> .....	43
MITOCHONDRIA-TARGETED PLASTOQUINONE DERIVATIVE AS A TOOL TO INTERRUPT SENESENCE PROGRAM OF ORGANISM <i>Skulachev V.P.</i> .....	45
CATIONIC HOST DEFENCE PEPTIDES – HOW DO THEY KILL MICROBES? <i>Sahl H.-G.</i> .....	47
МЕДИАТОРЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА <i>Недоспасов С.А.</i> .....	48
MEDIATORS OF INNATE IMMUNITY <i>Nedospasov S.A.</i> .....	49
БИОАНАЛИТИЧЕСКИЕ РЕАГЕНТЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРНО-КАПСУЛИРОВАННЫХ (CdSe)ZnS НАНОКРИСТАЛЛОВ <i>Зубов В.П., Генералова А.Н., Сизова С.В., Деев С.М., Олейников В.А.</i> ...	50
BIOANALYTICAL REAGENTS BASED ON POLYMER-ENCAPSULATED FLUORESCENT SEMICONDUCTOR CdSe(ZnS) NANOCRYSTALS <i>Zubov V.P., Generalova A.N., Sizova S.V., Deyev S.M., Oleinikov V.A.</i> .....	51
СВОРАЧИВАНИЕ БЕЛКА: ЗАВИСИМОСТЬ ОТ ЕГО РАЗМЕРОВ, ФОРМЫ, СТРУКТУРЫ И СТАБИЛЬНОСТИ <i>Финкельштейн А.В., Иванков Д.Н., Богатырёва Н.С., Гарбузинский С.А., Галзитская О.В.</i> .....	53
PROTEIN FOLDING: DEPENDENCE ON SIZE, SHAPE, STRUCTURE AND STABILITY OF THE PROTEIN <i>Finkelstein A.V., Ivankov D.N., Bogatyreva N.S., Garbuzinsky S.A., Galzitskaya O.V.</i> .....	54



UNDERSTANDING LIVER PATHOLOGY USING BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS TOOLKIT <i>Lutsenko S.V., Burkhead J., Ralle M., Huster D.</i> .....	55
FIGHTING BLINDNESS: FROM GENE DISCOVERIES TO DRUG DEVELOPMENT <i>Petrukhin K.</i> .....	56
N-АЦИЛДОФАМИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ЛИПИДНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ <i>Акимов М.Г., Бобров М.Ю., Грецкая Н.М., Зинченко Г.Н., Безуглов В.В.</i> .	57
N-ACYLDOPAMINES AS MULTIFUNCTIONAL LIPID REGULATORS <i>Akimov M.G., Bobrov M.Yu., Gretskaia N.M., Zinchenko G.N., Bezuglov V.V.</i> .	59
ELECTRONIC ENERGY TRANSFER/MIGRATION AND BIOMACROMOLECULAR STRUCTURE <i>Johansson L.B.-A.</i> .....	61
ЭФЕКТИВНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ЛИПОСОМЫ С ЛИПОФИЛЬНЫМИ ПРОЛЕКАРСТВАМИ И УГЛЕВОДНЫМИ ЛИГАНДАМИ <i>Кузнецова Н.Р., Кандыба А.Г., Гаенко Г.П., Бовин Н.В., Моисеева Е.В., Молотковский Ю.Г., Водовозова Е.Л.</i> .....	62
EFFECTIVE ANTICANCER LIPOSOMES BEARING LIPOPHILIC PRODRUGS AND CARBOHYDRATE LIGANDS <i>Kuznetsova N.R., Kandyba A.G., Gaenko G.P., Bovin N.V., Moiseeva E.V., Molotkovsky J.G., Vodovozova E.L.</i> .....	64
METHYL CpG AND DIFFERENTIATION <i>Vinson Ch.</i> .....	66
ГЕННЫЕ СЕМЕЙСТВА <i>POLR2J</i> И <i>PMS2</i> КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ЭВОЛЮЦИИ ВЫСШИХ ПРИМАТОВ <i>Шематорова Е.К., Шпаковский Д.Г., Прошкин С.А., Прошкина Г.М., Шпаковский Г.В.</i> .....	67
<i>POLR2J</i> AND <i>PMS2</i> GENE FAMILIES AS MOLECULAR MARKERS OF HIGHER PRIMATES EVOLUTION <i>Shematorova E.K., Shpakovski D.G., Proshkin S.A., Proshkina G.M., Shpakovski G.V.</i> .....	69
RNA POLYMERASES IN PARASITIC PROTOZOAN <i>Vigneron M.</i> .....	71
A PROTEOMIC VIEW OF VIRAL INFECTION AND TUMOR PROGRESSION: THE RIBOSOME, A KEY PLAYER? <i>Belin S., Rosa-Calatrava M., Coute Y., Couderc C., Hacot S., Pourpe S., Magron A., Borson-Chazot F., Frobert E., Josset L., Cartet G., Albaret M.A., Roche C., Scoazec J.-Y., Sanchez J.-C., Diaz J.-J.</i> .....	72
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ПРОТЕОМИКА МИКОПЛАЗМ <i>Говорун В.М.</i> .....	74

COMPARATIVE PROTEOMICS OF MYCOPLASMS <i>Govorun V.M.</i> .....	76
HELICAL ANTIMICROBIAL AND HOST DEFENCE PEPTIDES – LESSONS FROM DESIGN AND EVOLUTION <i>Tossi A.</i> .....	77
ИСТОРИЯ ГМДП: ОТ ИДЕЙ И.И. МЕЧНИКОВА ДО ЛИГАНДА РЕЦЕПТОРА NOD2 <i>Андропова Т.М., Козлов И.Г., Несмеянов В.А., Иванов В.Т.</i> .....	78
GMDP STORY: FROM MECHNIKOV'S IDEAS TO NOD2 RECEPTOR LIGAND <i>Andronova T.M., Kozlov I.G., Nesmeyanov V.A., Ivanov V.T.</i> .....	80
"СИРОТСКАЯ" РЕЦЕПТОРНАЯ ТИРОЗИНКИНАЗА – СЕНСОР ЩЕЛОЧНОЙ СРЕДЫ <i>Петренко А.Г.</i> .....	82
"ORPHAN" РЕЦЕПТОР-ЛИКЕ TYROSINE KINASE AS AN ALKALI SENSOR <i>Petrenko A.G.</i> .....	83
АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ БЕЛКА В СОВРЕМЕННЫХ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ <i>Чертов О.Ю.</i> .....	84
ANALYTICAL PROTEIN CHEMISTRY IN MODERN BIOMEDICAL RESEARCH <i>Chertov O.Yu.</i> .....	85
MICELLISATION AND IMMUNO REACTIVITIES OF DIMERIC $\beta$ -CASEINS <i>Haertle Th.</i> .....	86
АНТИСМЫСЛОВОЙ ПОДХОД. ИСТОРИЯ И СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ <i>Кнорре Д.Г.</i> .....	87
ANTISENSE APPROACH. HISTORY AND PRESENT STATE <i>Knorre D.G.</i> .....	88
СИНТЕТИЧЕСКИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ, ИХ АНАЛОГИ И КОНЪЮГАТЫ: СИНТЕЗ, СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ <i>Ефимов В.А.</i> .....	89
SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDES, THEIR ANALOGUES AND CONJUGATES: SYNTHESIS, PROPERTIES AND APPLICATIONS <i>Efimov V.A.</i> .....	90
ЧТО ДЕЛАЕТ НАС ЛЮДЬМИ? ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ ЭНДОГЕННЫЕ РЕТРОВИРУСЫ? <i>Свердлов Е.Д., Буздин А.А., Лебедев Ю.Б.</i> .....	91
WHAT MAKES US HUMAN? HUMAN ENDOGENOUS RETROVIRUSES? <i>Sverdlov E.D., Buzdin A.A., Lebedev Yu.B.</i> .....	93
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ ВГС С ВИРУСНЫМИ И КЛЕТОЧНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ <i>Иванов А.В., Белжеларская С.Н., Козлов М.В., Куханова М.К., Туницкая В.Л., Кочетков С.Н.</i> .....	95

INTERACTIONS OF HCV PROTEINS WITH VIRAL AND HOST COMPONENTS <i>Ivanov A.V., Belzhelarskaya S.N., Kozlov M.V., Kukhanova M.K., Tunitskaya V.L., Kochetkov S.N.</i> .....	96
ENVELOPE GLYCOPROTEIN ON HIV AND SIV VIRIONS: BIOCHEMICAL AND ELECTRON TOMOGRAPHY ANALYSIS <i>Chertova E.N.</i> .....	97
HIGH YIELD INTERNALIZATION OF PEPTIDES, PROTEINS AND NUCLEOTIDES INTO DIFFERENT CELLS BY CELL PENETRATING PEPTIDES <i>Mussbach F., Zoch A., Franke M., Pietrucha R., Schafer B., Reissmann S.</i>	98
ПИРИДОКСАЛЬНЫЙ КАТАЛИЗ, cAMP ЗАВИСИМЫЕ ПРОТЕИНИКИНАЗЫ И РЕЦЕПТОРНЫЕ СИСТЕМЫ МЕМБРАН (50 ЛЕТ СОТРУДНИЧЕСТВА) <i>Северин Е.С.</i> .....	100
PYRIDOXAL CATALYSIS, cAMP-DEPENDENT PROTEINKINASE AND MEMBRANE RECEPTOR SYSTEMS (50 YEARS OF COOPERATION) <i>Severin E.S.</i> .....	101
VITAMIN E IS ACTIVATED BY PHOSPHORYLATION TO $\alpha$ -ТОСОПНЕРЫЛ PHOSPHATE <i>Azzi A.</i> .....	102

### ТЕЗИСЫ СТЕНДОВЫХ СООБЩЕНИЙ ABSTRACTS OF POSTER PRESENTATIONS

РАСТВОРИМЫЙ Fas ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ <i>Аббасова С.Г., Липкин В.М., Кушлинский Н.Е.</i> .....	105
SOLUBLE Fas IN ONCOLOGY DISEASES <i>Abbasova S.G., Lipkin V.M., Kushlinskii N.E.</i> .....	106
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОМЕНА УПРАВЛЯЮЩЕГО ДИСТАНЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ <i>Авшалумов А.Ш.</i> .....	107
EXPERIMENTAL STUDY OF REMOTE CONTROL EFFECT ON CELL CULTURES <i>Avshalumov A.S.</i> .....	109
КОНСТРУИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ЛИПИД-ДНК НА ОСНОВЕ КАТИОННОГО ПРОИЗВОДНОГО ХОЛЕСТЕРИНА <i>Алексеева А.С., Маслов М.А., Болдырев И.А.</i> .....	111
DESIGNING OF LIPID-DNA COMPLEXES BASED ON CATIONIC DERIVATIVE OF CHOLESTEROL <i>Alekseeva A.S., Maslov M.A., Boldyrev I.A.</i> .....	112
ВЛИЯНИЕ МЕЛАФЕНА НА СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ P53 И BCL-2 В КЛЕТКАХ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА <i>Албантова А.А., Миль Е.М., Бинюков В.И., Алексеева О.М., Фаттахов С.Г., Коновалов А.И., Бурлакова Е.Б.</i> .....	113

INFLUENCE OF MELAFEN ON THE CONTENT OF P53 AND BCL-2 PROTEINS IN THE EHRLICH ASCETIC CARCINOMA <i>Albantova A.A., Mil E.M., Binyukov V.I., Alekseeva O.M., Fattahov S.G., Konovalov A.I., Burlakova E.B.</i> .....	114
ПОЛИПЕПТИДНЫЕ МОДУЛЯТОРЫ TRPV1 РЕЦЕПТОРА ИЗ МОРСКОЙ АНЕМОНЫ <i>HETERACTIS CRISPA</i> <i>Андреев Я.А., Козлов С.А., Гришин Е.В.</i> .....	115
POLYPEPTIDE MODULATORS OF TRPV1 RECEPTOR FROM SEA ANEMONE <i>HETERACTIS CRISPA</i> <i>Andreev Ya.A., Kozlov S.A., Grishin E.V.</i> .....	116
РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАЛИЧИЯ БЕЛКА СУРВИВИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ <i>Антимова Н.В., Завалова Л.Л., Шапаронов М.И.</i> .....	117
DEVELOPMENT OF DIAGNOSTICUM SYSTEM FOR DETECTION OF PROTEIN SURVIVIN IN BIOLOGICAL SAMPLES <i>Antipova N.V., Zavalova L.L., Shahparonov M.I.</i> .....	118
ПОИСК МАРКЕРОВ АУТОИММУННОГО ПРОЦЕССА У МЫШЕЙ С ПОМОЩЬЮ ПЕПТИДНО-БЕЛКОВОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ СЫВОРОТОК КРОВИ <i>Арапиду Г.П., Красильщикова М.С., Зацепина О.В., Зиганшин Р.Х.</i> .	119
SEARCH FOR MARKERS OF AUTOIMMUNITY IN MICE USING MALDI TOF MS PROFILLING OF SERA <i>Arapidi G.P., Krasilshchikova M.S., Zatsepina O.V., Ziganshin R.H.</i> .....	120
МЕХАНИЗМ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ФИЛЬТР-ЭЛЕМЕНТОВ ИЗ ПОРИСТОГО ПОЛИЭТИЛЕНА, МОДИФИЦИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА <i>Артамонов А.А., Цетлин В.В., Ревина А.А., Ермаков В.И.</i> .....	121
THE MECHANISM OF BIOLOGICAL ACTION OF THE FILTER-ELEMENTS FROM POROUS POLYETHYLENE MODIFIED NANO-PARTICLES SILVER <i>Artamonov A.A., Revina A.A., Tsetlin V.V., Ermakov V.I.</i> .....	122
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТНЫХ ЭФФЕКТОВ ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ПИЩЕВОГО СЫРЬЯ ПРИ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОЙ АГРЕГАЦИИ И ИНАКТИВАЦИИ МОДЕЛЬНЫХ БЕЛКОВЫХ СУБСТРАТОВ <i>Артемова Н.В., Бумагина З.М., Гурвиц Б.Я.</i> .....	123
MOLECULAR MECHANISMS OF PROTECTIVE EFFECTS OF FOOD-DERIVED OPIOID PEPTIDES IN STRESS-INDUCED AGGREGATION AND INACTIVATION OF MODEL PROTEIN SUBSTRATES <i>Artemova N.V., Bumagina Z.M., Gurvits B.Ya.</i> .....	124
ОПТИМИЗАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА LIF (LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR) <i>Базалий А.В., Рымарь С.Е.</i> .....	125

OPTIMIZATION OF EXPRESSION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT PROTEIN LIF (LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR) <i>Bazalii A.V., Ryamar S.E.</i> .....	126
OT НАУЧНОЙ РАЗРАБОТКИ ДО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА <i>Баирамашвили Д.И.</i> .....	127
FROM SCIENTIFIC RESEARCH TO A DRUG PREPARATION <i>Bairamashvili D.I.</i> .....	128
БЕЛОК НОГГИН2 – СЕКРЕТИРУЕМЫЙ ИНГИБИТОР Smad2-ЗАВИСИМОГО TGF-beta СИГНАЛЬНОГО КАСКАДА РЕГУЛИРУЕТ РАННЕЕ РАЗВИТИЕ ПЕРЕДНЕГО МОЗГА <i>Байрамов А.В., Ерошкин Ф.М., Мартынова Н.Ю., Ермакова Г.В., Соловьева Е.А., Серебрякова М.В., Зарайский А.Г.</i> .....	129
NOGGIN2 – SECRETED INHIBITOR OF Smad2 DEPENDENT TGF-beta SIGNALING PATHWAY THAT REGULATES THE EARLY FOREBRAIN DEVELOPMENT <i>Bayramov A.V., Eroshkin F.M., Martynova N.Yu., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Serebryakova M.V., Zaraisky A.G.</i> .....	130
ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРА МУТАЦИОННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ГЕНА 21-ГИДРОКСИЛАЗЫ У ПАЦИЕНТОК С ПРИЗНАКАМИ ГИПЕРАНДРОГЕНИИ <i>Баранник А.П., Колтунова А.А., Озолия Л.А., Гузов И.И., Патрушев Л.И.</i> .....	131
ANALYSIS OF THE MUTATION SPECTRUM OF THE STEROID 21-HYDROXYLASE GENE IN PATIENTS WITH SIGNS OF THE EXCESSIVE ANDROGENS <i>Barannik A.P., Koltunova A.A., Ozoliny L.A., Guzov I.I., Patrushev L.I.</i> .....	133
НОВЫЙ МЕТОД ШИРОКОМАСШТАБНОГО ПОИСКА ГИПОМЕТИЛИРОВАННЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОМА <i>Баскаев К.К., Буздин А.А.</i> .....	135
NEW METOD OF LARGE-SCALE RECOVERY OF HYPOMETHYLATED GENOMIC SEQUENCES <i>Baskaev K.K., Buzdin A.A.</i> .....	136
АНАЛИЗ КАЧЕСТВА РОССИЙСКОГО ПРЕПАРАТА РАСТАН® В СРАВНЕНИИ С ЗАРУБЕЖНЫМИ АНАЛОГАМИ ГЕНОТРОПИН® И ХУМАТРОП® МЕТОДАМИ ЕВРОПЕЙСКОЙ ФАРМАКОПЕИ <i>Кононова Н.В., Пучков И.А., Галкина Т.Г., Свешникова Е.В., Бобрускин А.И., Демин А.В., Баирамашвили Д.И.</i> .....	137
COMPARATIVE QUALITY ANALYSIS OF THE RUSSIAN PREPARATION RASTAN® AND FOREIGN ANALOGUES LIKE GENOTROPIN® AND HUMATROP® <i>Kononova N.V., Puchkov I.A., Galkina T.G., Sveshnikova E.V., Bobruskin A.I., Demin A.V., Bairamashvili D.I.</i> .....	138

ТРИТИЕВАЯ ПЛАНИГРАФИЯ КАК МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАНООБЪЕКТОВ: ВИРУС ГРИППА А <i>Богачева Е.Н., Шишков А.В., Баратова Л.А.</i> .....	139
TRITIUM PLANIGRAPHY AS THE METHOD OF STUDYING OF BIOLOGICAL NANOOBJECTS SPATIAL ORGANIZATION: THE INFLUENZA VIRUS А <i>Bogacheva E.N., Shishkov A.V., Baratova L.A.</i> .....	140
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ЭКСТРАКТА ИЗ ЧЕРНЫХ ЛИСТЬЕВ БАДАНА ТОЛСТОЛИСТНОГО НА ИММУННЫЙ СТАТУС ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ХОЛОДОВОМ СТРЕССЕ <i>Большунова Е.А., Ламажарова Г.П., Жамсаранова С.Д.</i> .....	141
RESEARCH OF INFLUENCE OF LIPOSOMAL FORM OF EXTRACT FROM BLACK LEAVES OF <i>BERGENIA CRASSIFOLIA (L) FRITSCH</i> ON THE IMMUNE STATUS OF LABORATORY ANIMALS AT COLD EXPOSURE <i>Bolshunova E.A., Lamazhapova G.P., Zhamsaranova S.D.</i> .....	142
РАЗНООБРАЗИЕ ДИМЕРНОЙ УПАКОВКИ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ РЕЦЕПТОРНЫХ ТИРОЗИНКИНАЗ НА ПРИМЕРЕ РЕЦЕПТОРОВ ЭФРИНОВ EphA <i>Бочаров Э.В., Майзель М.Л., Минеев К.С., Гончарук М.В., Волинский П.Е., Ефремов Р.Г., Арсеньев А.С.</i> .....	143
DISTINCT DIMERIC CONFORMATIONS OF EphA TRANSMEMBRANE DOMAINS REVEAL DIVERSITY OF TRANSMEMBRANE HELIX PACKING AMONG RECEPTOR TYROSINE KINASES <i>Bocharov E.V., Mayzel M.L., Mineev K.S., Goncharuk M.V., Volynsky P.E., Efremov R.G., Arseniev A.S.</i> .....	145
ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ – РИВАСТИГМИНА НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ЛИПИДОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВИДЫ ХОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ФОСФОЛИПИДОВ В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА <i>Бугайчук О.В., Круговов Д.А.</i> .....	146
INFLUENCE OF ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITOR – RIVASTIGMIN ON OXIDATION POTENTIAL OF LIPIDS AND CONTENTS OF MOLECULAR SPECIES OF CHOLINE CONTAINING PHOSPHOLIPIDS DURING ALZHEIMER'S DISEASE TREATMENT <i>Bugaychuk O.V., Krugovov D.A.</i> .....	148
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ОСИНЫ ГЕНАМИ ГЛУТАМИНСИНТЕТАЗЫ GS1 И ЗЕАМАТИНА <i>Булатова И.В., Новиков П.С., Канарский А.В., Винокуров М.Г., Шестибратов К.А.</i> .....	150
GENETIC TRANSFORMATION OF ASPEN WITH GLUTAMINE SYNTHETASE GS1 AND ZEAMATIN GENES <i>Bulatova I.V., Novikov P.S., Kanarskiy A.V., Vinokurov M.G., Schestibratov K.A.</i> ..	151

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССНОЙ ДЕТЕКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ <i>Бызова Н.А., Жердев А.В., Урусов А.Е., Зверева Е.А., Дзантиев Б.Б.</i> ..	152
IMMUNOCHROMATOGRAPHIC SYSTEMS FOR EXPRESS DETECTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS <i>Byzova N.A., Zherdev A.V., Urusov A.E., Zvereva E.A., Dzantiev B.B.</i> ....	153
ПЕПТИДЫ С РЕДКИМИ АМИНОКИСЛОТАМИ ИЗ МОРСКИХ ЧЕРВЕЙ POLYCHAETE КАК ИНГИБИТОРЫ РЕВЕРТАЗЫ И ИНТЕГРАЗЫ ИЗ HIV-1 <i>Елякова Л.А., Васьковский Б.В., Хорошилова Н.И., Ванцева С.И., Агапкина Ю.Ю.</i> .....	154
PEPTIDES WITH RARE AMINO ACIDS FROM MARINE POLYCHAETE AS INHIBITORS OF HIV-1 REVERTASE AND INTEGRASE <i>Elyakova L.A., Vaskovsky B.V., Khoroshilova N.I., Vantseva S.I., Agapkina Yu.Yu.</i> .....	155
АНТИОПУХОЛЕВЫЕ НУКЛЕОТИД-АКТИНОМИЦИНОВЫЕ ФАРМАКОСОМЫ <i>Векишин Н.Л.</i> .....	156
ANTI-CANCER NUCLEOTIDE-ACTINOMYCIN PHARMACOSOMES <i>Vekshin N.L.</i> .....	157
СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ДОСТАВКА ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ К ОПУХОЛЕВЫМ КЛЕТКАМ ЧЕЛОВЕКА <i>Верюгин Б.В., Лукаш С.В., Деев С.М.</i> .....	158
БЕЛКИ КОРИЧНЕВОЙ МИЦЕЛИАЛЬНОЙ ПЛЕНКИ БАЗИДИОМИЦЕТА <i>LENTINUS EDODES</i> С ФЕНОЛОКСИДАЗНОЙ И ЛЕКТИНОВОЙ АКТИВНОСТЯМИ <i>Ветчинкина Е.П., Никитина В.Е.</i> .....	160
PROTEINS OF THE BROWN MYCELIAL FILM OF THE BASIDIOMYCETE <i>LENTINUS EDODES</i> WITH PHENOL OXIDASE AND LECTIN ACTIVITIES <i>Vetchinkina E.P., Nikitina V.E.</i> .....	161
РОЛЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ ДЕГРАДАЦИИ В СУПРЕССИИ PDCD4 В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ РАКА ЛЕГКИХ И МЕЛАНОМАХ <i>Вихрева П.Н., Коробко Е.В., Коробко И.В.</i> .....	162
ROLE OF PROTEOLYTIC DEGRADATION IN PDCD4 SUPPRESSION IN LUNG CANCER CELLS AND MELANOMAS <i>Vikhreva P.N., Korobko E.V., Korobko I.V.</i> .....	163
ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРМЕАБИЛИЗАЦИИ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЛАТАРЦИНА Ltc2a <i>Воронцова О.В., Арсеньев А.С., Кирпичников М.П., Феофанов А.В.</i> .	164
STUDY ON PERMEABILIZATION OF AN EUKARYOTIC CELLS' PLASMA MEMBRANE BY LATARCIN Ltc2a <i>Vorontsova O.V., Arseniev A.S., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V.</i> .....	166

АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГОССИПОЛА И ЕГО АСИММЕТРИЧНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ <i>Гайибов У.Г., Сонькина С.Н., Тилыбаев К.З., Салахутдинов Б.А.</i> .....	167
ANTIRADICAL ACTIVITY OF GOSSYPOL AND ITS ASYMMETRICAL DERIVATIVES <i>Gayibov U.G., Sonkina S.N., Tilyabaev K.Z., Salakhutdinov B.A.</i> .....	168
БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В МЕМБРАНЕ: ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ФРАГМЕНТОВ РЕЦЕПТОРНЫХ ТИРОЗИНКИНАЗ ДЛЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ <i>Гончарук М.В., Ермолюк Я.С., Шульга А.А., Гончарук С.А., Ткач Е.Н., Пустовалова Ю.Е., Арсеньев А.С., Кирпичников М.П.</i> .....	169
PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS WITHIN THE MEMBRANE: PRODUCTION OF TRANSMEMBRANE FRAGMENTS OF RECEPTOR TYROSINE KINASES FOR STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STUDIES <i>Goncharuk M.V., Ermolyuk Ya.S., Schulga A.A., Goncharuk S.A., Tkach E.N., Pustovalova Yu.E., Arseniev A.S., Kirpichnikov M.P.</i> .....	171
БАКТЕРИАЛЬНЫЙ СИНТЕЗ И ОЧИСТКА МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА KCNE <i>Гончарук С.А., Ермолюк Я.С., Шульга А.А., Тихонов Р.В., Арсеньев А.С., Кирпичников М.П.</i> .....	173
BACTERIAL SYNTHESIS AND PURIFICATION OF KCNE FAMILY OF MEMBRANE PROTEINS <i>Goncharuk S.A., Ermolyuk Ya.S., Schulga A.A., Tikhonov R.V., Arseniev A.S., Kirpichnikov M.P.</i> .....	175
ВЛИЯНИЕ МУРАМИЛПЕПТИДА (ГМДП) НА НОРМАЛИЗАЦИЮ Th1/Th2 БАЛАНСА ПРИ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ <i>Гурьянова С.В., Мецержакова Е.А., Алексеева Л.Г., Андропова Т.М.</i> ..	176
EFFECT OF MURAMYL PEPTIDE GMDP ON NORMALIZATION OF Th1/Th2 BALANCE IN PATIENTS WITH ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA <i>Guryanova S.V., Meshcheryakova E.A., Andronova T.M.</i> .....	177
ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ГИСТОНА H1.3 <i>Гусаров Д., Ласман В., Косарев С., Баирамашвили Д., Генкин Д., Формичка-Цеппенцауер Г.</i> .....	178
TECHNOLOGY OF THE PRODUCTION OF RECOMBINANT HISTONE H1.3 <i>Gusarov D., Lasman V., Kosarev S., Bairamashvili D., Genkin D., Formicka-Zeppenbauer G.</i> .....	179
ПОЛУЧЕНИЕ ПЕПТИДНЫХ ФРАКЦИЙ С ЗАДАННОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ <i>Данилов И.М., Забодалова Л.А., Скворцова Н.Н.</i> .....	180
RECEPTION PEPTIDE FRACTIONS IN THE SET MOLECULAR MASS <i>Danilov I.M., Zabodalova L.A., Skvortsova N.N.</i> .....	181



АКТИВАЦИЯ МЕМБРАННОЙ РЕЦЕПТОРНОЙ ТИРОЗИНКИНАЗЫ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО pH <i>Деев И.Е., Серова О.В., Попова Н.В., Петренко А.Г.</i> .....	182
ACTIVATION OF RECEPTOR TYROSINE KINASES BY EXTRACELLULAR pH <i>Dejev I.E., Serova O.V., Popova N.V., Petrenko A.G.</i> .....	183
ИЗУЧЕНИЕ ФОТОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЗАМЕЩЕННЫХ ИЗОКСАЗОЛОВ, СОДЕРЖАЩИХ ФОТОХРОМНЫЙ ФРАГМЕНТ <i>Демина О.В., Лантев А.В., Беликов Н.Е., Лукин А.Ю., Земцов Р.В., Ходонов А.А., Варфоломеев С.Д.</i> .....	184
STUDY OF PHOTOCHEMICAL PROPERTIES OF SUBSTITUTED ISOXAZOLES CONTAINED PHOTOCROMIC MOIETY <i>Demina O.V., Laptev A.V., Belikov N.E., Lukin A.Yu., Zemtsov R.V., Khodonov A.A., Varfolomeev S.D.</i> .....	185
БИОТЕХНОЛОГИЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ <i>Каленик Т.К., Долгова Т.Г., Грищенко В.В., Гришин А.С.</i> .....	186
BIOTECHNOLOGY OF SPECIALIZED PRODUCTS FROM MARINE HYDROBIONTS <i>Kalenik T.K., Dolgova T.G., Grischenko V.V., Grishin A.S.</i> .....	187
ВЛИЯНИЕ 3-ГИДРОКСИЛИПИНОВ НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ И ЖИЗНЕННО ВАЖНЫЕ ФУНКЦИИ АСКОМИЦЕТОВ <i>Дородникова Е.А., Мягкова Г.И., Белозерская Т.А., Гесслер Н.Н., Гроза Н.В.</i> .....	188
INFLUENCE OF 3-HYDROXYLIPINS ON DIFFERENTIATION AND VITAL FUNCTIONS OF ASCOMYCETES <i>Dorodnikova E.A., Miagkova G.I., Belozerskaya T.A., Gessler N.N., Groza N.V.</i> .....	189
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ ПОЛИМЕРИЗУЕМЫХ ЛИПИДОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ МЕТОДОМ ЯМР <i>Болдырев И.А., Чупин В.В., Дубовский П.В.</i> .....	190
POLYMERIZABLE SHORT-CHAIN PHOSPHOLIPIDS FOR THE INVESTIGATION OF MEMBRANE PROTEINS BY NMR SPECTROSCOPY <i>Boldyrev I.A., Chupin V.V., Dubovskii P.V.</i> .....	191
ЗАЩИТНЫЕ ПЕПТИДЫ РАСТЕНИЙ <i>Егоров Ц.А., Одинцова Т.И.</i> .....	192
ЛОКАЛИЗАЦИЯ ОБЛАСТЕЙ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ LIM-ДОМЕННОГО БЕЛКА ЗИКСИНА И ТРАНСМЕМБРАННОГО РЕЦЕПТОРА PATCHED2 <i>Ермолина Л.В., Мартынова Н.Ю., Зарайский А.Г.</i> .....	193

LOCALIZATION OF THE INTERACTING AREAS OF THE LIM-DOMAIN PROTEIN ZYXIN AND THE HEDGEHOG TRANSMEMBRANE RECEPTOR PATCHED2 <i>Ermolina L.V., Martynova N.Yu., Zaraisky A.G.</i> .....	194
ДИЗАЙН ГЕНОВ МУЛЬТИДОМЕННЫХ БЕЛКОВ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ В РАСТЕНИЯХ НОВЫХ ВАКЦИННЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ТАНДЕМНЫЕ ПОВТОРЫ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ ЭПИТОПОВ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ПТИЧЬЕГО ГРИППА <i>Ерохина Т.Н., Ракитина Д.В., Лецинер А.Д., Соловьев А.Г., Морозов С.Ю.</i> .....	195
DESIGN OF MULTIDOMEN PROTEINS GENES FOR EXPRESSION IN PLANTA NEW VACCINE POLYPEPTIDES CONTANING TANDEM REPEATS OF NEUTRALIZING EPITOPES OF AVIAN INFLUENZA VIRUS HEMAGGLUTININ <i>Erokhina T.N., Rakitina D.V., Leschiner A.D., Solovyev A.G., Morozov S.Yu.</i> .....	196
ВЛИЯНИЕ МИЕЛОПЕПТИДА-4 НА MAP-КИНАЗНЫЕ И Ca <sup>2+</sup> -ПУТИ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ В КЛЕТКАХ HL-60 В ПРОЦЕССЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ <i>Кирилина Е.А., Белевская Р.Г., Ефремов М.А., Михайлова А.А.</i> .....	197
MAP KINASE AND Ca <sup>2+</sup> -SIGNALING IN HL-60 CELLS DURING DIFFERENTIATION BY MYELOPEPTIDE-4 <i>Kirilina E.A., Belevskaya R.G., Efremov M.A., Mikhailova A.A.</i> .....	198
MOLECULAR LIPOPHILICITY IN PROTEIN MODELING AND DRUG DESIGN <i>Efremov R.G., Chugunov A.O., Pyrkov T.V.</i> .....	199
ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИЙ РЕГУЛЯТОР РОСТА РАСТЕНИЙ КАК АДАПТОГЕН К СТРЕССОВЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ <i>Жигачева И.В., Бурлакова Е.Б.</i> .....	200
ORGANOPHOSPHOROUS PLANT GROWTH REGULATOR AS ADAPTOGEN TO STRESS ACTION <i>Zhigacheva I.V., Burlakova E.B.</i> .....	201
ВЫДЕЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ IgA1-ПРОТЕИНАЗЫ ИЗ КУЛЬТУРЫ <i>N. MENINGITIDIS</i> <i>Ягудаева Е.Ю., Жигус Л.С., Разгуляева О.А., Зуева В.С., Козлов Л.В., Бичучер А.М., Котельникова О.В., Аллилуев А.П., Аваков А.Э., Румш Л.Д.</i> .....	202
ISOLATION AND DETERMINATION OF ACTIVITY MENINGOCOCCAL IgA1-PROTEASE <i>Yagudaeva E.Yu., Zhigis L.S., Razgulyaeva O.A., Zueva V.S., Kozlov L.V., Bichucher A.M., Kotelnikova O.V., Alliluev A.P., Avakov A.E., Rumsh L.D.</i> ..	203
РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ОСОБЕННОСТЕЙ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ <i>VIOTA (THUJA) ORIENTALIS ENDL.</i> <i>Жумабеков Е.Ж., Шаденова Е.А.</i> .....	204



МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ КОЛЛОИДНЫЕ СИСТЕМЫ <i>Зайцев С.Ю.</i> .....	206
MULTIFUNCTIONAL BIOCHEMICAL COLLOID SYSTEMS <i>Zaitsev S. Yu.</i> .....	207
QUORUM SENSING СИСТЕМЫ ДВУХ ТИПОВ У <i>SERRATIA</i> <i>PROTEAMACULANS</i> <i>Зайцева Ю.В., Липасова В.А., Хмель И.А.</i> .....	208
QUORUM SENSING SYSTEMS OF TWO TYPES IN <i>SERRATIA</i> <i>PROTEAMACULANS</i> <i>Zaitseva J.V., Lipasova V.A., Khmel I.A.</i> .....	209
ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТОВ НИТРОФУРАНОВОГО РЯДА И ДОНОРОВ NO НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНК У ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ И QUORUM SENSING-БИОСЕНСОРЫ <i>Зайцева Ю.В., Хмель И.А.</i> .....	210
EFFECT OF NITROFURANS AND NO GENERATORS ON BIOFILMS FORMATION BY GRAM-NEGATIVE BACTERIA AND ON QUORUM SENSING BIOSENSORS <i>Zaitseva J.V., Khmel I.A.</i> .....	211
ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ МИКРОКАПСУЛЫ ДЛЯ ВКЛЮЧЕНИЯ В НИХ БИОАКТИВНЫХ МАКРОМОЛЕКУЛ И ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК: ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ <i>Зайцева-Зотова Д.С., Селина О.Е., Бовин В.Н., Марквичева Е.А.</i> .....	212
POLYELECTROLYTE MICROCAPSULES FOR ENTRAPMENT OF BIOACTIVE MOLECULES AND ANIMAL CELLS: OPTIMIZATION OF PREPARATION TECHNIQUES <i>Zaytseva-Zotova D.S., Selina O.E., Bovin V.N., Markvicheva E.A.</i> .....	213
ДУОДЕНАЗА – ПРОТЕИНАЗА С ДОМИНИРУЮЩЕЙ ТРЕТИЧНОЙ (КОНФОРМАЦИОННОЙ) СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ <i>Замолодчикова Т.С.</i> .....	214
DUODENASE – PROTEASE WITH DOMINANT TERTIARY (CONFORMATIONAL) SPECIFICITY <i>Zamolodchikova T.S.</i> .....	215
ПРИМЕНЕНИЕ АССОЦИАТИВНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ФИТОПАТОГЕНАМ И КСЕНОБИОТИКАМ <i>Захарченко Н.С., Пиголева С.В., Бурьянов Я.И.</i> .....	216
APPLICATION OF ASSOCIATIVE MICROORGANISMS FOR ENHANCED RESISTANCE OF PLANTS TO PHYTOPATHOGENS AND XENOBIOTICS <i>Zakharchenko N.S., Pigoleva S.V., Buryanov Ya.I.</i> .....	217

ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ РАПСА МАСЛИЧНОГО И КАЛАНХОЭ ПЕРИСТОГО, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ АНТИМИКРОБНЫЙ ПЕПТИД ЦЕКРОПИН P1 <i>Захарченко Н.С., Юхманова А.А., Бурьянов Я.И.</i> .....	218
OBTAINING AND ANALYSIS OF OILSEED RAPE AND KALANCHOE TRANSGENIC PLANTS EXPRESSING ANTIMICROBIC PEPTIDE CECROPINE P1 <i>Zakharchenko N.S., Yukhmanova A.A., Buryanov Ya.I.</i> .....	219
БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДИЛ-ПРОЛИЛ ИЗОМЕРАЗЫ SlyD ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ РЕЦЕПТОРНЫХ БЕЛКОВ БАКТЕРИОФАГОВ <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> <i>Иванова М.А., Чупров-Неточин Р.Н., Семёнов А.М., Шнейдер М.М., Мирошников К.А.</i> .....	220
PROTEIN ENGINEERING BASED ON SlyD PEPTIDYL-PROLYL ISOMERASE DRIVES THE FOLDING OF RECOMBINANT RECEPTOR PROTEINS OF <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> BACTERIOPHAGES <i>Ivanova M.A., Chuprov-Netochin R.N., Semenov A.M., Shneider M.M., Miroshnikov K.A.</i> .....	221
СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ НАКОПЛЕНИЯ И ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЦИКЛОИМИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХЛОРИНА p <sub>6</sub> В НОРМАЛЬНЫХ И РАКОВЫХ КЛЕТКАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА <i>Игнатова А.А., Маслова А.С., Феофанов А.В.</i> .....	222
COMPARATIVE STUDY OF ACCUMULATION AND PHOTODYNAMIC ACTIVITY OF CYCLOIMIDE DERIVATIVES OF CHLORIN p <sub>6</sub> IN HUMAN NORMAL AND CANCER BLOOD CELLS <i>Ignatova A.A., Maslova A.S., Feofanov A.V.</i> .....	224
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОЛИ НЕСПАРЕННЫХ НУКЛЕОТИДОВ В СТРУКТУРАХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ <i>Ильинский Н.С., Борисова О.Ф., Калужный Д.Н.</i> .....	225
FLUORESCENCE METHOD FOR DETERMINATION OF UNPAIRED NUCLEOTIDES IN NUCLEIC ACIDS STRUCTURES <i>Iilinsky N.S., Borisova O.F., Kaluzhny D.N.</i> .....	226
ПОИСК ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПАРТНЕРОВ НУКЛЕОЗИДДИФОСФАТКИНАЗЫ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА БЫКА <i>Какуев Д.Л., Поздеев В.И., Пагаев Р.М., Карацук Г.Н., Костянян И.А., Липкин В.М.</i> .....	227
TWO-HYBRID INTERACTION PARTNER SCREENING FOR BOVINE RETINA NDP-KINASE <i>Kakuev D.L., Pozdeev V.I., Pagaev R.M., Karaschuk G.N., Kostanyan I.A., Lipkin V.M.</i> .....	228

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТЕИНКИНАЗЫ МАК-V И УБИКВИТИН-ЛИГАЗЫ Nedd4 <i>Калиниченко С.В., Вихрева П.Н., Коробко И.В.</i> .....	229
STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN МАК-V PROTEIN KINASE AND Nedd4 UBIQUITIN LIGASE <i>Kalinichenko S.V., Vikhreva P.N., Korobko I.V.</i> .....	230
КУЛЬТУРА ЛЬНА ЖЕЛТОГО КАК ИСТОЧНИК ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛИГНАНОВ <i>Карягина Т.Б., Гукасова Е.А., Бацрамашвили Д.И.</i> .....	231
YELLOW FLAX BREEDING AS A SOURCE OF ANTI-CANCER LIGNANS <i>Karyagina T.B., Gukasova E.A., Bairamashvili D.I.</i> .....	232
ОЦЕНКА ПРОЦЕССА СПИРТОВОГО БРОЖЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОДНОГО БИОСЕНСОРА, ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО К ГЛЮКОЗЕ И ЭТАНОЛУ <i>Китова А.Е., Каманин С.А., Решетилев А.Н.</i> .....	233
ASSESSMENT OF ALCOHOL FERMENTATION PROCESS WITH THE USE OF GLUCOSE- AND ETHANOL-SENSITIVE BIOSENSOR <i>Kitova A.E., Kamanin S.A., Reshetilov A.N.</i> .....	234
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ НАНОПРОВОЛОКИ НА ОСНОВЕ ДНК И ДНК-ПОДОБНЫХ СТРУКТУР <i>Клинов Д.В.</i> .....	235
MOLECULAR NANOWIRES BASED ON DNA AND DNA-LIKE STRUCTURES <i>Klinov D.V.</i> .....	237
АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА 70 кДа И ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В НЕЙТРОФИЛАХ ДОЛГОЖИТЕЛЕЙ <i>Коваленко Е.И., Бойко А.А., Гречихина М.В., Каневский Л.М., Луценко Г.В., Семенов В.Ф., Сапожников А.М.</i> .....	238
ANALYSIS OF EXPRESSION OF HEAT SHOCK PROTEIN 70 kDa AND REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION IN HUMAN NEUTROPHILS IN ELDERLY AGE <i>Kovalenko E.I., Boyko A.A., Grechikhina M.V., Kanevski L.M., Lutsenko G.V., Semenov V.F., Sapozhnikov A.M.</i> .....	239
ИССЛЕДОВАНИЕ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ ПРОМОТОРА ГЕНА <i>P TEN</i> ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЭНДОМЕТРИЯ И ЯИЧНИКОВ <i>Коваленко Т.Ф., Патрушев Л.И.</i> .....	240
INVESTIGATION OF <i>P TEN</i> GENE PROMOTER METHYLATION PATTERNS IN PATIENTS WITH ENDOMETRIAL AND OVARIAN TUMORS <i>Kovalenko T.F., Patrushev L.I.</i> .....	242
СИНТЕТИЧЕСКИЙ ПЕПТИД ИММУНОРФИН – КАК ИНСТРУМЕНТ ИССЛЕДОВАНИЯ НЕОПИОИДНОГО РЕЦЕПТОРА $\beta$ -ЭНДОРФИНА <i>Ковалицкая Ю.А., Садовников В.Б., Наволоцкая Е.В.</i> .....	243

SYNTHETIC PEPTIDE IMMUNORPHIN LIKE INSTRUMENT OF NON-OPIOID $\beta$ -ENDORPHIN RECEPTOR STUDY <i>Kovalitskaya Yu.A., Sadovnikov V.B., Navolotskaya E.V.</i> .....	244
ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ БЕЛКОВ-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ЛИНЕЙНЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ЯДА ПАУКОВ <i>Козлов С.А., Василевский А.А., Андреев Я.А., Воронцова О.В., Панкеев Н.Н., Гришин Е.В.</i> .....	245
STRUCTURAL PECULIARITY OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE PRECURSORS FROM SPIDER VENOM <i>Kozlov S.A., Vassilevski A.A., Andreev Ya.A., Vorontsova O.V., Pankeev N.N., Grishin E.V.</i> .....	246
БАКТЕРИАЛЬНАЯ И БЕСКЛЕТОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ДОМЕНА НИКОТИНОВОГО АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА <i>Копеева Г.С., Люкманова Е.Н., Шулепко М.А., Шенкарев З.О., Кашеверов И.Е., Цетлин В.И., Долгих Д.А., Кирпичников М.П.</i> .....	247
BACTERIAL AND CELL FREE PRODUCTION OF EXTRACELLULAR DOMAIN OF NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR <i>Kopeina G.S., Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Shenkarev Z.O., Kasheverov I.E., Tsetlin V.I., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P.</i> .....	249
РОЛЬ 5S рРНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ L5 И L25 В СБОРКЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РИБОСОМЫ <i>IN VIVO</i> <i>Корепанов А.П., Коробейникова А.В., Баженова М.В., Шестаков С.А., Бубуненко М.Г., Гарбер М.Б., Гонгадзе Г.М.</i> .....	250
ROLE OF 5S rRNA-BINDING PROTEINS L5 AND L25 IN THE BACTERIAL RIBOSOME ASSEMBLY <i>IN VIVO</i> <i>Korepanov A.P., Korobeinikova A.V., Bazhenova M.V., Shestakov S.A., Bubunenko M.G., Garber M.B., Gongadze G.M.</i> .....	252
ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ S6, S11, S18 И S21 В БИОГЕНЕЗЕ РИБОСОМ <i>ESCHERICHIA COLI</i> И ТРАНСЛЯЦИИ <i>Корепанов А.П., Бубуненко М.Г., Коробейникова А.В., Шпрингер М., Гарбер М.Б.</i> .....	254
STUDYING THE ROLE OF THE RIBOSOMAL PROTEINS S6, S11, S18 AND S21 IN THE RIBOSOME BIOGENESIS AND TRANSLATION IN <i>ESCHERICHIA COLI</i> <i>Korepanov A.P., Bubunenko M.G., Korobeinikova A.V., Springer M., Garber M.B.</i> .....	256
ХЛОРИД РТУТИ ВЫЗЫВАЕТ АУТОИММУННЫЙ ПРОЦЕСС У АУТБРЕДНЫХ МЫШЕЙ <i>Красильщикова М.С., Камаева А.Г., Зацепина О.В.</i> .....	258
HgCl <sub>2</sub> INDUCES AUTOIMMUNITY IN OUTBRED MICE <i>Krasilshchikova M.S., Kamaeva A.G., Zatsepina O.V.</i> .....	259

ПОИСКИ РАЦИОНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАНОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО СЫРЬЯ ПРИ РАЗРАБОТКЕ НОВЫХ ПРОДУКТОВ <i>Кричковская Л.В., Момот В.И., Кравченко О.В., Мироненко Л.С.</i> .....	260
SEARCH OF RATIONAL WAYS IN USING OF NANOTECHNOLOGICAL RAW MATERIAL AT DEVELOPMENT OF NEW PRODUCTS <i>Krichkovskaya L.V., Momot V.I., Kravchenko O.V., Mironenko L.S.</i> .....	261
ТОПОЛОГИЯ ЧЕХОЛЬНЫХ БЕЛКОВ БАКТЕРИОФАГОВ phiKZ И T4 <i>Курочкина Л.П., Аксюк А.А., Россмани М.Г., Месянжинов В.В.</i> .....	262
TOPOLOGY OF BACTERIOPHAGES phiKZ AND T4 SHEATH PROTEINS <i>Kurochkina L.P., Aksyuk A.A., Rossmann M.G., Mesyanzhinov V.V.</i> .....	263
ПАРАМЕТРЫ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОГО И БИОЭЛЕМЕНТНОГО СТАТУСОВ ПРЕДСКАЗЫВАЮТ ПОЯВЛЕНИЕ СПОНТАННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПРЕДРАСПОЛОЖЕННЫХ К РАКУ МЫШЕЙ <i>Кучина М.Н., Семушина С.Г., Скальный А.В., Боженко В.К., Моисеева Е.В.</i> .....	264
PARAMETERS OF HEMATOLOGY AND BIOELEMENT STATUSES PREDICT SPONTANEOUS MOUSE MAMMARY CANCER APPEARANCE IN CANCER PRONE MICE <i>Kuchina M.N., Skalny A.V., Bojenko V.K., Moiseeva E.V.</i> .....	265
ПОИСК ПЕПТИДОМИМЕТИКОВ С ПОМОЩЬЮ КОМБИНАТОРНЫХ ПЕПТИДНЫХ БИБЛИОТЕК В ФОРМАТЕ ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ <i>Ламан А.Г., Шепеляковская А.О., Бозиев Х.М., Савинов Г.В., Бровко Ф.А., Несмеянов В.А.</i> .....	266
DEVELOPING OF PEPTIDOMIMETICS BY USING COMBINATORIAL PHAGE PEPTIDE LIBRARIES <i>Laman A.G., Shepelyakovskaya A.O., Boziev Kh.M., Savinov G.V., Brovko F.A., Nesmeyanov V.A.</i> .....	268
МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ ( <i>PINUS SYLVESTRIS</i> L.) <i>Лебедев В.Г., Шестибратов К.А.</i> .....	269
CLONAL MICROPROPAGATION OF SCOTS PINE ( <i>PINUS SYLVESTRIS</i> L.) <i>Lebedev V.G., Schestibratov K.A.</i> .....	270
ГЕКСАПЕПТИД HLDF-6 – НОВЫЙ ПЕРСПЕКТИВНЫЙ НЕЙРОПРОТЕКТОР <i>Липкин В.М., Сурина Е.А., Сторожева З.И., Родионов И.Л., Мурашев А.Н., Богачук А.П., Костанян И.А.</i> .....	271
HLDF-6 HEXAPEPTIDE – A NEW PROMISING NEUROPROTECTOR <i>Lipkin V.M., Surina E.A., Storozheva Z.I., Rodionov I.L., Murashev A.N., Bogachuk A.P., Kostanyan I.A.</i> .....	272

ОЧИСТКА КОНЦЕНТРИРОВАННЫХ СТОЧНЫХ ВОД КОММЕРЧЕСКИМИ МИКРОБНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ В СОЧЕТАНИИ С АНАЭРОБНЫМИ МИКРОБНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ <i>Литтис Ю.В., Некрасова В.К., Ножевникова А.Н.</i> .....	273
TREATMENT OF CONCENTRATED SEWAGES BY MEANS OF COMMERCIAL MICROBIAL CONSORTIUMS IN AGGREGATE WITH ANAEROBIC MICROBIAL CONSOCIETUMS EXPLOITING <i>Litty Y.V., Nekrasova V.K., Nozhevnikova A.N.</i> .....	274
ОБРАТИМО ФОТОКОНВЕРТИРУЕМЫЙ МОНОМЕРНЫЙ КРАСНЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК <i>Лицзуань Чжан, Гурская Н.Г., Копанцева Е.Е., Лукьянов К.А.</i> .....	275
REVERSIBLY PHOTOCONVERTIBLE MONOMERIC RED FLUORESCENT PROTEIN <i>Lijuan Zhang, Gurskaya N.G., Korpanceva E.E., Lukyanov K.A.</i> .....	276
БЕЛОК B23/НУКЛЕОФОЗМИН КАК ОПУХОЛЕВЫЙ МАРКЕР <i>Лобанова Н.В., Потапенко Н.А., Вольпина О.М., Владимирова Н.М.</i> .....	277
PROTEIN B23/NUCLEOPHOSMIN AS A TUMOR MARKER <i>Lobanova N.V., Potapenko N.A., Volpina O.M., Vladimirova N.M.</i> .....	278
ЗЕЛЕННЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ – СВЕТОИНДУЦИРУЕМЫЕ ДОНОРЫ ЭЛЕКТРОНОВ <i>Лукьянов К.А., Богданов А.М.</i> .....	279
GREEN FLUORESCENT PROTEINS ACT AS A LIGHT-INDUCED ELECTRON DONORS <i>Lukyanov K.A., Bogdanov A.M.</i> .....	280
ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА СОДЕРЖАНИЯ ХОЛЕРНОГО И ДИФТЕРИЙНОГО ТОКСИНОВ <i>Любавина И.А., Петрова Е.Э., Валякина Т.И.</i> .....	281
IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY OF CHOLERA AND DIPHTHERIA TOXINS <i>Ljubavina I.A., Petrova E.E., Valyakina T.I.</i> .....	283
РОЛЬ NADPH ОКСИДАЗЫ В АКТИВАЦИИ МАР КИНАЗНЫХ КАСКАДОВ ПРИ ФАГОЦИТОЗЕ <i>Марквичёва К.Н., Мишина Н.М., Белоусов В.В., Лукьянов С.А.</i> .....	284
THE ROLE OF NADPH OXIDASE IN MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE CASCADES ACTIVATION AT PHAGOCYTOSIS <i>Markvicheva K.N., Mishina N.M., Belousov V.V., Lukyanov S.A.</i> .....	285
ИССЛЕДОВАНИЕ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНАЗ ТЕХНИЧЕСКИХ КУЛЬТУР, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В УЗБЕКИСТАНЕ <i>Межлумян Л.Г., Рахимова Ш.Х., Абдухаликова М.А., Сагдуллаев Б.Т., Юлдашев П.Х.</i> .....	286

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ КАПСИДОВ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ БЕЛКОВ БАКТЕРИОФАГОВ <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ <i>Фильчиков М.В., Сыкилинда Н.Н., Месянжинов В.В., Мирошников К.А.</i>	287
ELECTRON-MICROSCOPIC 3D-CAPSID RECONSTRUCTION AND IDENTIFICATION OF SURFACE PROTEINS OF <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> BACTERIOPHAGES <i>Filchikov M.V., Sykilinda N.N., Mesyanzhinov V.V., Miroshnikov K.A.</i>	288
ПРОИЗВОДНЫЕ НА ОСНОВЕ ГАНГЛИОЗИДОВ КАК УНИВЕРСАЛЬНЫЕ МЕМБРАННЫЕ ЗОНДЫ <i>Михалев И.И.</i>	289
GANGLIOSIDE-BASED DERIVATIVES AS AN UNIVERSAL MOLECULAR PROBES FOR MEMBRANE STUDIES <i>Mikhalyov I.I.</i>	291
ПЕПТИД ДЕЛЬТА-СНА (ДСИП) И ЕГО АНАЛОГИ: ПОИСК СОЕДИНЕНИЙ С ОНКОПРОТЕКТИВНЫМ ДЕЙСТВИЕМ <i>Михалева И.И., Прудченко И.А., Ефремов Е.С., Оноприенко Л.В., Чикин Л.Д., Якубовская Р.И., Немцова Е.Р., Безбородова О.А.</i>	292
DELTA-SLEEP INDUCING PEPTIDE (DSIP) AND ITS ANALOGUES: SEARCH FOR COMPOUNDS WITH ONCO-PROTECTIVE EFFECT <i>Mikhaleva I.I., Prudchenko I.A., Efremov E.S., Onoprienko L.V., Chikin L.D., Yakubovskaya R.I., Nemtsova E.P., Bezborodova O.A.</i>	294
ОРИГИНАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ТЕСТИРОВАНИЮ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ И ПРОТИВООБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВ НА НЕ-СПФ МЫШИНЫХ МОДЕЛЯХ <i>Мусеева Е.В., Семушина С.Г., Кесслер Ю.В., Лазарев В.Ф., Барабанщикова В.С., Козлов А.В., Неведова Н.В.</i>	296
ORIGINAL APPROACHES TO TEST ANTI-CANCER AND ANTI-INFECTIOUS DRUGS IN NON-SPECIFIC PATHOGEN FREE (NON-SPF) MOUSE MODELS <i>Moiseeva E.V., Semushina S.G., Kessler Yu.V., Lazarev V.F., Barabanshchikova V.S., Kozlov A.V., Nefedova N.V.</i>	297
СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДИМЕРА ТРАНСМЕМБРАННОГО ДОМЕНА БЕЛКА-ПРЕДШЕСТВЕННИКА АМИЛОИДА <i>Надеждин К.Д., Боcharова О.В., Боcharов Э.В., Арсеньев А.С.</i>	298
STRUCTURAL INVESTIGATIONS OF DIMERIC TRANSMEMBRANE DOMAIN OF AMYLOID PRECURSOR PROTEIN <i>Nadezhdin K.D., Bocharova O.V., Bocharov E.V., Arseniev A.S.</i>	299
СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКОВ <i>Некрасов А.Н., Зинченко А.А., Кирпичников М.П.</i>	300

STRUCTURAL ORGANIZATION OF THE PROTEINS <i>Nekrasov A.N., Zinchenko A.A., Kirpichnikov M.P.</i>	301
СТРУКТУРНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РИБОСОМНОГО БЕЛКА L1 СО СПЕЦИФИЧЕСКИМИ ФРАГМЕНТАМИ мРНК И рРНК <i>Никонова Е.Ю., Костарева О.С., Тищенко С.В., Сычева А.М., Мошковский С.А., Невская Н.А., Гарбер М.Б., Никонов С.В.</i>	302
STRUCTURAL AND KINETIC ANALYSIS OF INTERACTIONS BETWEEN RIBOSOMAL PROTEIN L1 AND SPECIFIC RNA FRAGMENTS <i>Nikonova E.Yu., Kostareva O.S., Tishchenko S.V., Sycheva A.M., Moshkovskii S.A., Nevskaya N.A., Garber M.B., Nikonov S.V.</i>	303
ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА НОВОГО АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ИЗ СЕМЯН ЕЖОВНИКА ОБЫКНОВЕННОГО ( <i>ECHINOCHLOA CRUSGALLI</i> ) <i>Нольде С.Б., Рогожин Е.А., Василевский А.А., Баринов Н.А., Балашова Т.А., Егоров Ц.А., Гришин Е.В., Арсеньев А.С.</i>	304
SPATIAL STRUCTURE OF A NOVEL ANTIMICROBIAL PEPTIDE FROM SEEDS OF COMMON BARNYARD GRASS ( <i>ECHINOCHLOA CRUSGALLI</i> ) <i>Nolde S.B., Rogozhin E.A., Vassilevski A.A., Barinov N.A., Balashova T.A., Egorov T.A., Grishin E.V., Arseniev A.S.</i>	305
AGGREGATION PROPENSITY OF THE ALZHEIMER'S AMYLOID $\beta$ -PEPTIDE IS ENHANCED BY THE JAPANESE MUTATION E22 $\Delta$ <i>Овчинникова О.Ю., FINDER V.H., Vodopivec I., Nitsch R.M., Glockshuber R.</i>	306
ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР DUSF ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С РЕГУЛЯТОРНЫМИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМИ E-БОКС В ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ СЕМЕННИК-СПЕЦИФИЧНЫХ ГЕНОВ <i>STELLATE DROSOPHILA MELANOGASTER</i> <i>Оленкина О.М., Егорова К.С., Кибанов М.В., Гвоздев В.А., Оленина Л.В.</i>	307
TRANSCRIPTION FACTOR DUSF INTERACTS WITH E-BOX REGULATORY SEQUENCES IN PROMOTER REGION OF THE TESTIS-SPECIFIC <i>STELLATE</i> GENES IN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> <i>Olenkina O.M., Egorova K.S., Kibanov M.V., Gvozdev V.A., Olenina L.V.</i>	309
РЕКОМБИНАНТНЫЙ БТШ70 ЧЕЛОВЕКА КАК СРЕДСТВО ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА ОТ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ <i>Остров В.Ф., Евгеньев М.Б., Мурашев А.Н.</i>	310
HUMAN RECOMBINANT HSP70 PREVENTS TOXIC EFFECTS OF LIPOPOLYSACCHARIDES <i>Ostrov V.F., Murashev A.N., Evgen'ev M.B.</i>	311



ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТНЫХ ВАРИАНТОВ ЦИТОХРОМА C ЛОШАДИ СО СНИЖЕННОЙ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ НА ОСНОВЕ МЕТОДА АНАЛИЗА ИНФОРМАЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ <b>Островерхова Т.В.,</b> <i>Черткова Р.В.,</i> <i>Пепелина Т.Ю.,</i> <i>Богатова О.В.,</i> <i>Некрасов А.Н.,</i> <i>Долгих Д.А.,</i> <i>Кирпичников М.П.</i> .....	312
DESIGN OF MUTANT VARIANTS OF HORSE CYTOCHROME C WITH LOWER ELECTRON-TRANSPORT ACTIVITY FROM ANALYSIS OF INFORMATIONAL STRUCTURE <b>Ostroverkhova T.V.,</b> <i>Chertkova R.V.,</i> <i>Pepelina T.Y.,</i> <i>Bogatova O.V.,</i> <i>Nekrasov A.N.,</i> <i>Dolgikh D.A.,</i> <i>Kirpichnikov M.P.</i> .....	313
ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ СУРВИВИН И SMAC/DIABLO <i>IN VITRO</i> <b>Павлюков М.С.,</b> <i>Антипова Н.В.,</i> <i>Завалова Л.Л.,</i> <i>Шахпаронов М.И.</i> ..	314
INVESTIGATION OF THE INTERACTION BETWEEN RECOMBINANT SURVIVIN AND SMAC/DIABLO <i>IN VITRO</i> <b>Pavlyukov M.S.,</b> <i>Antipova N.V.,</i> <i>Zavalova L.L.,</i> <i>Shahparonov M.I.</i> .....	315
НОВАЯ СИСТЕМА ВЫЯВЛЕНИЯ СЛУЧАЙНЫХ МУТАЦИЙ В ДНК СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК <b>Патрушев Л.И.,</b> <i>Заболотнева А.А.,</i> <i>Патрушева Н.Л.</i> .....	316
NEW ASSAY FOR DETECTION OF RANDOM MUTATIONS IN THE DNA OF SOMATIC CELLS <b>Patrushev L.I.,</b> <i>Zabolotneva A.A.,</i> <i>Patrusheva N.L.</i> .....	318
НЕКОДИРУЮЩИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ГЕНОМА ЗАЩИЩАЮТ КОДИРУЮЩИЕ УЧАСТКИ ГЕНОВ ОТ ХИМИЧЕСКОГО МУТАГЕНЕЗА <b>Патрушев Л.И.,</b> <i>Минкевич И.Г.</i> .....	319
NON-CODING SEQUENCES OF EUKARYOTIC GENOME PROTECT CODING PARTS OF GENES AGAINST CHEMICAL MUTAGENESIS <b>Patrushev L.I.,</b> <i>Minkevich I.G.</i> .....	321
ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ЖЕЛТОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА Ph <sub>1</sub> YFP, УСТАНОВЛЕННАЯ С ПОМОЩЬЮ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИХ И РАСЧЕТНЫХ МЕТОДОВ <b>Пахомов А.А.,</b> <i>Мартьянов В.И.</i> .....	323
3D-STRUCTURE OF YELLOW FLUORESCENT PROTEIN Ph <sub>1</sub> YFP SOLVED BY MASS-SPECTROMETRIC AND COMPUTATIONAL METHODS <b>Pakhomov A.A.,</b> <i>Martynov V.I.</i> .....	324
ИСКУССТВЕННЫЕ ФНО-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ ДОМЕНА ФИБРОНЕКТИНА <b>Петровская Л.Е.,</b> <i>Шингарова Л.Н.,</i> <i>Некрасов А.Н.,</i> <i>Крюкова Е.А.,</i> <i>Болдырева Е.Ф.,</i> <i>Якимов С.А.,</i> <i>Долгих Д.А.,</i> <i>Кирпичников М.П.</i> .....	325

ARTIFICIAL TNF-BINDING PROTEINS BASED ON HUMAN FIBRONECTIN DOMAIN <b>Petrovskaya L.E.,</b> <i>Shingarova L.N.,</i> <i>Nekrasov A.N.,</i> <i>Kryukova E.A.,</i> <i>Boldyreva E.F.,</i> <i>Yakimov S.A.,</i> <i>Dolgikh D.A.,</i> <i>Kirpichnikov M.P.</i> .....	326
TRIP8b – НОВЫЙ КЛАТРИН-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК <b>Попова Н.В.,</b> <i>Деев И.Е.,</i> <i>Петренко А.Г.</i> .....	327
TRIP8b IS A NOVEL CLATHRIN-BINDING PROTEIN <b>Popova N.V.,</b> <i>Deyev I.E.,</i> <i>Petrenko A.G.</i> .....	328
ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ПРОАПОПТОЗНОГО БЕЛКА ВNP3 <i>Шульга А.А.,</i> <b>Пустовалова Ю.Е.,</b> <i>Ткач Е.Н.,</i> <i>Кирпичников М.П.,</i> <i>Арсеньев А.С.</i> .....	329
EXPRESSION AND PURIFICATION OF PRO-АПОПТОТИС ПРОТЕИН ВNP3 <i>Schulga A.A.,</i> <b>Pustovalova Yu.E.,</b> <i>Tkach E.N.,</i> <i>Kirpichnikov M.P.,</i> <i>Arseniev A.S.</i> .....	330
АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ИОНОВ И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА <b>Радциг М.А.,</b> <i>Хмель И.А.</i> .....	331
ANTIBACTERIAL EFFECTS OF SILVER IONS AND SILVER NANOPARTICLES <b>Radzig M.A.,</b> <i>Khmel I.A.</i> .....	332
НОВЫЙ БЕЛОК ОБОНЯТЕЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ КРЫСЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЙСЯ В ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ <b>Радченко В.В.,</b> <i>Ильницкая Е.В.,</i> <i>Третьяков В.Е.,</i> <i>Сторожева З.И.,</i> <i>Шуваева Т.М.,</i> <i>Липкин В.М.</i> .....	333
NOVEL PROTEIN FROM RAT OLFACATORY EPITHELIUM EXPRESSING IN RATHOPHYSIOLOGICAL CONDITIONS <b>Radchenko V.V.,</b> <i>Ilitskaya E.V.,</i> <i>Tretyakov V.E.,</i> <i>Storozheva Z.I.,</i> <i>Shuvaeva T.M.,</i> <i>Lipkin V.M.</i> .....	334
СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕИНАЗ ИЗ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ И КОДИРУЮЩИЕ ИХ ГЕНЫ <b>Ревина Т.А.,</b> <i>Кладницкая Г.В.,</i> <i>Гвоздева Е.Л.,</i> <i>Парфенов И.А.,</i> <i>Валуева Т.А.</i> .....	335
SPECIFIC PROTEASE INHIBITORS FROM POTATO TUBERS AND THEIR GENES <b>Revina T.A.,</b> <i>Kladnitskaya G.V.,</i> <i>Gvozdeva E.L.,</i> <i>Parfenov I.A.,</i> <i>Valueva T.A.</i> .....	336
ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛОПОДОБНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ К ГАПОНИНУ МЛЕКОПИТАЮЩИХ <b>Родионова А.С.,</b> <i>Радченко В.В.,</i> <i>Костанян И.А.,</i> <i>Сурина Е.А.,</i> <i>Липкин В.М.</i> .....	337
GENERATION OF THE RECOMBINANT ANTIBODY LIKE PROTEINS TO THE MAMMALIAN HAPONIN <b>Rodionova A.S.,</b> <i>Radchenko V.V.,</i> <i>Kostanyan I.A.,</i> <i>Surina E.A.,</i> <i>Lipkin V.M.</i> ..	338



РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БОТУЛИНИЧЕСКИХ ТОКСИНОВ ТИПОВ А, В, Е И F НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ <i>Аббасова С.Г., Руденко Н.В., Шувалова О.П., Виноградова И.И., Вертиев Ю.В., Несмеянов В.А., Гришин Е.В.</i> .....	339
DEVELOPMENT OF A MONOCLONAL ANTIBODY-BASED TEST SYSTEM FOR THE DETECTION OF BOTULIN TOXINS TYPE A, B, E, AND F <i>Abbasova S.G., Rudenko N.V., Shuvalova O.P., Vinogradova I.I., Vertiev Yu.V., Nesmeyanov V.A., Grishin E.V.</i> .....	340
ОПТИМИЗАЦИЯ СИНТЕЗА HBsAg В КЛЕТКАХ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ <i>Руквицова Е.Б., Чеботарева Е.Н., Бурьянов Я.И.</i> .....	341
OPTIMIZATION OF HBsAg SYNTHESIS IN TRANSGENIC PLANT CELLS <i>Rukavtsova E.B., Chebotareva E.N., Buryanov Ya.I.</i> .....	342
ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДЕФОЛИАНТА ДРОППА НА СИНТЕЗ БЕЛКА В ЖИВОТНЫХ КЛЕТКАХ <i>Саитмуратова О.Х., Назаров Т.А.</i> .....	343
BIOLOGICAL EFFECT OF DEFOLIANT DROPP ON PROTEIN SYNTHESIS IN CELLS <i>Saitmuratova O.H., Nazarov T.N.</i> .....	344
ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЙ ЯДА КОБРЫ И ФРАГМЕНТА НЕЙРОПЕПТИДА НА ЯДЕРНЫЙ СИНТЕЗ БЕЛКА <i>Саитмуратова О.Х., Сагдиев Н.Ж.</i> .....	345
ANALYSIS OF EFFECT OF COBRA'S TOXIN AND NEUROPEPTIDE FRAGMENT ON NUCLEUS PROTEIN SYNTHESIS <i>Saitmuratova O.H., Sagdiev N.J.</i> .....	346
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НЕКОТОРЫХ СИСТЕМ ИОННОГО ТРАНСПОРТА НА ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ И ГЕМОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТИ ЛАТАРЦИНА Ltc1 <i>Самсонова О.В., Арсеньев А.С., Кирпичников М.П., Феофанов А.В.</i> ..	347
STUDY OF THE ROLE OF SOME ION TRANSPORT SYSTEMS IN THE LATARCIN Ltc1 CYTOTOXIC AND HAEMOLYTIC ACTIVITIES <i>Samsonova O.V., Arseniev A.S., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V.</i> .....	349
ЭФФЕКТЫ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ПУЛА БТШ70 В ПОПУЛЯЦИЯХ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК <i>Сапожников А.М., Алекперов Э.А., Бойко А.А., Луцан Н.И., Клинкова А.В.</i> .....	350
EFFECTS OF EXTRACELLULAR POOL OF HSP70 IN POPULATIONS OF LYMPHOID CELLS <i>Sapozhnikov A.M., Alekperov E.A., Boyko A.A., Lutsan N.I., Klinkova A.V.</i> ..	352

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ ЭПИТОПОВ ДЕСМОГЛЕИНА 3 ЧЕЛОВЕКА <i>Свирицевская Е.В., Лысенко А.А., Дементьева Д.В., Прохоров А.В.</i> ..	353
IDENTIFICATION OF HUMAN DESMOGLEIN 3 PATHOGENIC EPITOPES <i>Svirshchevskaya E.V., Lysenko A.A., Dementyeva D.V., Prokhorov A.V.</i> ..	354
1,4,6,10-ТЕТРААЗААДАМАНТАНЫ – НОВЫЙ КЛАСС ГЕТЕРОАДАМАНТАНОВ <i>Семакин А.Н., Сухоруков А.Ю., Лесив А.В., Иоффе С.Л.</i> .....	355
1,4,6,10-TETRAAZAADAMANTANES – A NEW CLASS OF HETEROADAMANTANES <i>Semakin A.N., Sukhorukov A.Yu., Lesiv A.V., Ioffe S.L.</i> .....	356
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОФАГОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ В КРАСНОДАРСКОМ И ПРИМОРСКОМ КРАЯХ, И ПОЛУЧЕНИЕ НА ЭТОЙ ОСНОВЕ ПРЕПАРАТА ДЛЯ ФАГОВОЙ ТЕРАПИИ ЭШЕРИХИОЗА У СВИНЕЙ <i>Скобликов Н.Э., Васильева Е.А., Васильева Е.Л., Москаленко Е.А., Зимин А.А.</i> .....	357
MICROBIOLOGICAL AND MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTIC OF BACTERIOPHAGES ISOLATED FROM VARIOUS SOURCES IN KRASNODAR AND PRIMORIE REGIONS, AND PREPARATING THE PHAGE MEDICINE FOR THERAPY OF ESCHERICHIOSIS OF PIG <i>Skoblikov N.E., Vasilyeva E.A., Vasilyeva E.L., Moskalenko E.A., Zimin A.A.</i> .....	359
ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ ХИТООЛИГОСАХАРИДОВ НА АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ <i>PHYTOPHTHORA INFESTANS</i> <i>Сорокань А.В., Черепанова Е.А.</i> .....	361
INFLUENCE OF ACETYLTATION DEGREE OF CHITIN ON PEROXIDASES ACTIVITY IN POTATO, INFECTED BY <i>PHYTOPHTHORA INFESTANS</i> <i>Sorokan A.V., Cherepanova E.A.</i> .....	362
ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ОЛИГОМЕРИЗАЦИЯ УКОРОЧЕННЫХ В ОБЛАСТИ N-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА ФОРМ АТР-ЗАВИСИМОЙ Lon-ПРОТЕИНАЗЫ <i>E. COLI</i> <i>Степнов А.А., Андрианова А.Г., Чащинова Д.В., Мельников Э.Э., Ротанова Т.В.</i> .....	363
FUNCTIONAL CHARACTERISTICS AND OLIGOMERIZATION OF <i>E. COLI</i> ATR-DEPENDENT Lon PROTEASE WITH VARIOUS TRUNCATIONS IN THE REGION OF N-TERMINAL DOMAIN <i>Stepnov A.A., Andrianova A.G., Chaschinova D.V., Melnikov E.E., Rotanova T.V.</i> .....	364

ИНДУЦИРУЕМАЯ АРЕНИЦИНАМИ ПРОВОДИМОСТЬ БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН (БЛМ) <i>Суханов С.В., Барсуков Л.И., Баландин С.В., Жмак М.Н., Овчинникова Т.В.</i> .....	365
ARENICIN-INDUCED CONDUCTIVITY OF BILAYER LIPID MEMBRANES (BLM) <i>Sukhanov S.V., Barsukov L.I., Balandin S.V., Zhmak M.N., Ovchinnikova T.V.</i> .....	366
ВКЛЮЧЕНИЕ ДЕЛЬТА-СОН ИНДУЦИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА В ПОЛИМЕРНЫЕ МАТРИЦЫ <i>Суханова Т.В., Гуревич Я.М., Артюхов А.А., Ефремов Е.С., Чикин Л.Д., Прудченко И.А., Штильман М.И., Марквичева Е.А.</i> .....	367
ENTRAPMENT OF DELTA-SLEEP INDUCING PEPTIDE INTO POLYMER MATRICES <i>Sukhanova T.V., Gurevich Y.M., Artyukhov A.A., Efremov E.S., Chikin L.D., Prudchenko I.A., Shtilman M.I., Markvicheva E.A.</i> .....	368
СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОЗИДОВ ФЕРМЕНТАТИВНЫМ ТРАНСГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕРМОСТАБИЛЬНЫХ НУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ <i>Таран С.А., Фефанов С.А., Мирошников А.И.</i> .....	369
SYNTHESIS OF NUCLEOSIDE ANALOGUES BY ENZYMATIC TRANSGLYCOSYLATION WITH RECOMBINANT THERMOSTABLE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASES <i>Taran S.A., Feofanov S.A., Miroshnikov A.I.</i> .....	371
РАЗРАБОТКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ ПРОГРАММ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ЗАСОЛЕНИЮ <i>Тарлачков С.В., Вишвецва Е.Н., Шевчук Т.В., Дьяченко О.В., Захарченко Н.С., Бурьянов Я.И.</i> .....	372
DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL MODEL OF EPIGENETIC ACTIVATION OF ABIOTIC STRESS RESISTANCE PROGRAMS IN PLANTS <i>Tarlachkov S.V., Vshyvceva E.N., Shevchuk T.V., Dyachenko O.V., Zakharchenko N.S., Buryanov Ya.I.</i> .....	373
ПРИМЕНЕНИЕ МЕЗО-ЗАМЕЩЕННЫХ ПОЛИМЕТИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ В КАЧЕСТВЕ СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ <i>Татиколов А.С., Акимкин Т.М., Кашин А.С., Панова И.Г.</i> .....	374
APPLICATION OF MESO-SUBSTITUTED POLYMETHINE DYES AS SPECTRAL-FLUORESCENT PROBES FOR BIOMACROMOLECULES <i>Tatikolov A.S., Akimkin T.M., Kashin A.S., Panova I.G.</i> .....	375
ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ КАРБОНОВЫХ И ФОСФОРНОЙ КИСЛОТ, СОДЕРЖАЩИХ ФРАГМЕНТЫ АЛКАЛОИДОВ <i>Тылябаев З., Абдувахабов А.А.</i> .....	376

POLYFUNCTIONALITY OF ESTERS AND PHOSPHATES WITH ALKALOID FRAGMENTS <i>Tilyabaev Z., Abdvakhobov A.A.</i> .....	377
ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ФРАКЦИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ ФОТОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ <i>Трубецкая О.Е., Шалойко Л.А., Демин В.Д., Трубецкой О.А.</i> .....	378
SEPARATION AND ISOLATION OF PHOTOCHEMICALLY ACTIVE AND FLUORESCENT SPECIES FROM HUMIC SUBSTANCES <i>Trubetskaya O.E., Shaloiko L.A., Demin D.V., Trubetskoj O.A.</i> .....	380
СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ЦЕРЕБРОЛИЗИНА И СЕМАКСА НА МОДЕЛИ ФОКАЛЬНОГО ИНСУЛЬТА У КРЫС CD <i>Туховская Е.А., Сухорукова Н.А., Лобанова Н.Н., Мурашев А.Н.</i> .....	381
COMPARATIVE INVESTIGATION OF NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF CEREBROLYSIN AND SEMAX IN RATS CD WITH FOCAL STROKE <i>Tukhovskaya E.A., Sukhorukova N.A., Lobanova N.N., Murashev A.N.</i> ..	382
НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОПОРОШКОВ МЕТАЛЛОВ <i>Фаткуллина Л.Д., Кривандин А.В., Иваненко Г.Ф., Бурлакова Е.Б., Голощанов А.Н.</i> .....	383
SOME ASPECTS OF THE BIOLOGICAL EFFECTS OF METAL NANOPOWDERS <i>Fatkullina L.D., Krivandin A.V., Ivanenko G.F., Burlakova E.B., Goloscharov A.N.</i> .....	384
ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОЙ ОЛИГОПЕПТИДАЗЫ В ИЗ ПСИХРОТОЛЕРАНТНОГО МИКРООРГАНИЗМА <i>SERRATIA PROTEAMACULANS</i> <i>Хайруллин Р.Ф., Себякина Т.Ю., Михайлова А.Г., Руми Л.Д.</i> .....	385
ISOLATION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NOVEL OLIGOPeptIDASE B FROM PSYCHROTOLLERANT MICROORGANISM <i>SERRATIA PROTEAMACULANS</i> <i>Khairullin R.F., Sebyakina T.Yu., Mikhailova A.G., Rumsh L.D.</i> .....	386
НОВЫЕ ОПИОИДНЫЕ ПЕПТИДНЫЕ АГОНИСТЫ С АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЙ И КАРДИОПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ <i>Хохлова О.Н., Шайхутдинова Э.Р., Мурашев А.Н., Крапф Г., Биссесар Э., Боброва И.</i> .....	387
NOVEL OPIOID PEPTIDE AGONISTS WITH ANALGESIC AND CARDIOPROTECTIVE ACTIVITY <i>Khokhlova O.N., Shaikhutdinova E.R., Murashev A.N., Krapf H., Bissessar E., Bobrova I.</i> .....	388

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ И РЕЗУЛЬТАТЫ ХИМИОТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ ЦИСПЛАТИНА ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ <i>Хохрин Д.В., Хрунин А.В., Моисеев А.А.</i> .....	389
GENETIC POLYMORPHISM AND OUTCOME OF CISPLATIN-BASED CHEMOTHERAPY IN OVARIAN CANCER <i>Khokhrin D.V., Khrunin A.V., Moiseev A.A.</i> .....	390
СКОРОСТЬ ПРОЯВЛЕНИЯ И РОСТА ПЕРЕВИТОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ИНСУЛИН-ЗАВИСИМОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ У МЫШЕЙ BALB/C <i>Хрипкова Н.А., Семушина С.Г., Александровский Я.А., Моисеева Е.В.</i> ..	391
TUMOR MANIFESTATION AND GROWTH RATE OF TRANSPLANTED MAMMARY CANCER FOLLOWING INSULIN DEPENDENT DIABETES MELLITUS <i>Khrpikova N.A., Semushina S.G., Aleksandrovski J.A., Moiseeva E.V.</i> ...	392
СОЗДАНИЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ МИКРОНОСИТЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ МОЛОЧНОЙ И СОПОЛИМЕРОВ МОЛОЧНОЙ И ГЛИКОЛЕВОЙ КИСЛОТ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ <i>Цой А.М., Севрин Ш., Грандфис К., Марквичева Е.А.</i> .....	393
DEVELOPMENT OF BIODEGRADABLE MICROCARRIERS BASED ON POLY(L-LACTIDE) AND POLY(LACTIDE-CO-GLYCOLIDE) FOR TISSUE ENGINEERING <i>Tsoy A.M., Sevrin Ch., Grandfils Ch., Markvicheva E.A.</i> .....	394
ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ПРОДУКЦИИ БЫТОВОГО НАЗНАЧЕНИЯ И ТОВАРОВ ДЛЯ ДЕТЕЙ С ПОМОЩЬЮ БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ <i>Чепкова И.Ф., Ануфриев М.А.</i> .....	395
ESTIMATION OF TOXICITY OF HOUSEHOLD PRODUCTS AND GOODS FOR CHILDREN BY MEANS OF IMMOBILIZED MICROORGANISMS BIOSENSOR <i>Чепкова И.Ф., Ануфриев М.А.</i> .....	397
РАСТИТЕЛЬНЫЙ ПРЕПАРАТ ИЗ <i>SILENE SUSSAMYRICA</i> ДЛЯ БОРЬБЫ С КАЛИФОРНИЙСКИМ ТРИПСОМ <i>Черменская Т.Д., Щеникова А.В., Чакаева А.Ш.</i> .....	398
PLANT PREPARATION FROM <i>SILENE SUSSAMYRICA</i> AGAINST WESTERN FLOWER THRIPS <i>Chermenskaja T.D., Shchenikova A.V., Chakaeva A.Sh.</i> .....	400
ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА АВТОУБИКВИТИЛИРОВАНИЯ БЕЛКА UBC13 (UBE2N) С ПОМОЩЬЮ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ <i>Чернорудский А.Л., Кондратьева Е.В., Жаберева А.С., Згода В.Г., Гайнуллин М.Р.</i> .....	401

PROBING THE MECHANISM OF AUTOUBIQUITYLATION OF UBC13 (UBE2N) PROTEIN USING MASS SPECTROMETRY <i>Chernorudskiy A.L., Kondratieva E.V., Zhabereva A.S., Zgoda V.G., Gainullin M.R.</i> .....	402
АЛЬТЕРНАТИВНАЯ ИНИЦИАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ ГЕНА <i>speA</i> , СУПРЕССИРУЮЩЕГО ПАТОГЕННОСТЬ <i>ERWINIA CAROTOVORA</i> <i>Чернышов С.В., Гороховатский А.Ю., Бурьянов Я.И.</i> .....	403
ALTERNATIVE TRANSLATION INITIATION OF <i>speA</i> GENE SUPPRESSING <i>ERWINIA CAROTOVORA</i> PATHOGENICITY <i>Chernyshov S.V., Gorokhovatsky A.Yu., Buryanov Ya.I.</i> .....	405
КОНЬЮГАТЫ ХЛОРИНА $e_6$ С БОР-СОДЕРЖАЩИМИ ПОЛИЭДРАМИ КАК ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МОДУЛЬНЫЕ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ, БОР-НЕЙТРОНОЗАХВАТНОЙ И ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ РАКА <i>Честнова А.В., Игнатова А.А., Грин М.А., Миронов А.Ф., Сиваев И.Б., Брегадзе В.И., Феофанов А.В.</i> .....	406
CONJUGATES OF CHLORIN $e_6$ WITH BORON-CONTAINING POLYHEDRONS AS MULTIFUNCTIONAL MODULAR CONSTRUCTIONS FOR FLUORESCENT DIAGNOSTICS, ANTICANCER BORON NEUTRON CAPTURE AND PHOTODYNAMIC THERAPY <i>Chestnova A.V., Ignatova A.A., Grin M.A., Mironov A.F., Sivaev I.B., Bregadze V.I., Feofanov A.V.</i> .....	408
БЕТА-СПИРАЛЬНЫЙ ДОМЕН БАКТЕРИОФАГА T4 И ПЕПТИДИЛ-ПРОЛИЛ ИЗОМЕРАЗА УПРАВЛЯЮТ УКЛАДКОЙ ФРАГМЕНТА ДЛИННЫХ ХВОСТОВЫХ ФИБРИЛЛ В СОСТАВЕ ХИМЕРНОГО БЕЛКА <i>Чуров-Неточин Р.Н., Шнейдер М.М., Сыкилинда Н.Н., Мирошников К.А.</i> .....	410
BACTERIOPHAGE T4 BETA-HELICAL DOMAIN AND PEPTIDYL-PROLYL ISOMERASE DRIVES THE FOLDING OF THE LONG TAIL FIBER FRAGMENT INTO A FUNCTIONAL CHIMERIC PROTEIN <i>Churov-Netochin R.N., Shneider M.M., Sykilinda N.N., Miroshnikov K.A.</i> ..	411
ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ СОЗРЕВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ ЭМБРИОНОВ ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ <i>Чурочкина О.А., Шестибратов К.А.</i> .....	412
SOMATIC EMBRYOGENESIS IN PICEA ABIES: OPTIMIZATION OF MATURATION CONDITIONS <i>Churochkina O.A., Schestibratov K.A.</i> .....	413
АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ ИЗ ЛЕЙКОЦИТОВ РУССКОГО ОСЕТРА <i>ACIPENCER GUELDENSTADTI</i> <i>Шамова О.В., Овчинникова Т.В., Тагаев А.А., Леонова Ю.Ф., Орлов Д.С., Кокряков В.Н.</i> .....	414

ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM LEUKOCYTES OF THE RUSSIAN STURGEON <i>ACIPENCER GUELDENSTADTI</i> <b>Shamova O.V., Ovchinnikova T.V., Tagaev A.A., Leonova Yu.F., Orlov D.S., Kokryakov V.N.</b> .....	415
ОСОБЕННОСТИ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЛЕЙКОЗАХ <b>Вологжанникова А.А., Шевчук Т.В., Исмаилов Р.Г., Вишвецва Е.Н., Маринич Д.В., Дьяченко О.В., Бурьянов Я.И.</b> .....	416
PECULIARITIES OF HUMAN GENOME SITE-SPECIFIC METHYLATION DURING LEUKAEMIA <b>Vologjannikova A.A., Shevchuk T.V., Ismailov R.G., Vshyvceva E.N., Marinich D.V., Dyachenko O.V., Buryanov Ya.I.</b> .....	417
RHO GTPase SHP/WRCH2 ИНДУЦИРУЕТ АПОПТОЗ КЛЕТОК PC12, СОПРОВОЖДАЮЩИЙСЯ АКТИВАЦИЕЙ JNK И СУПРЕССИЕЙ АКТ <b>Шепелев М.В., Чернофф Д., Коробко И.В.</b> .....	418
RHO FAMILY GTPase SHP/WRCH2 INDUCES PC12 APOPTOTIC CELL DEATH ACCOMPANIED BY JNK ACTIVATION AND SUPPRESSION OF AKT <b>Shepelev M.V., Chernoff J., Korobko I.V.</b> .....	420
ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ СУБСТАНЦИИ ИНСУЛИНА И ПРЕПАРАТОВ ИНСУРАН Р И ИНСУРАН НПХ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ИХ КАЧЕСТВА НА ОПЫТНОМ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ ИБХ РАН <b>Шибанова Е.Д., Шепель Е.Н., Пальченкова Н.Б., Сизова Н.В., Гусаров Д.А., Баирамашвили Д.И.</b> .....	421
RESEARCH OF INSULIN ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENT (API) AND PHARMACEUTICALS INSURAN R AND INSURAN NPH STABILITY FOR GUARANTEEING QUALITY AT THE EXPERIMENTAL BIOTECHNOLOGY PRODUCTION (EBP) OF THE INSTITUTE OF BIOORGANIC CHEMISTRY <b>Shibanova E.D., Shepel E.N., Palchenkova N.B., Sizova N.V., Gusarov D.A., Bairamashvili D.I.</b> .....	422
ПРЕПАРАТИВНАЯ ОЧИСТКА БАКТЕРИОФАГОВ <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ <b>Шкатула С.В., Куликов Е.Е., Сыкилинда Н.Н., Мирошников К.А.</b> ....	423
PREPARATIVE CHROMATOGRAPHIC PURIFICATION OF <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> BACTERIOPHAGES <b>Shkatula S.V., Kulikov E.E., Sykilinda N.N., Miroshnikov K.A.</b> .....	424
ВЕНОМИКА ПАУКА <i>MISUMENA VATIA</i> <b>Шляпников Ю.М., Козлов С.А., Гришин Е.В.</b> .....	425
VENOMICS OF <i>MISUMENA VATIA</i> SPIDER <b>Shlyapnikov Y.M., Kozlov S.A., Grishin E.V.</b> .....	426

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НАРУШЕНИЙ В ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ К ГОРМОНАМ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИСТЕМЕ В ТКАНЯХ ДИАБЕТИЧЕСКИХ КРЫС С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ, ПРОИЗВОДНЫХ СИГНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ <b>Шпаков А.О., Бондарева В.М., Шпакова Е.А., Тарасенко И.И., Деркач К.В., Кузнецова Л.А., Власов Г.П., Перцева М.Н.</b> .....	427
IDENTIFICATION OF THE DISTURBANCES IN HORMONE-SENSITIVE ADENYLYL CYCLASE SYSTEM IN THE TISSUES OF DIABETIC RATS USING SYNTHETIC PEPTIDES, THE DERIVATIVES OF SIGNAL PROTEINS <b>Shpakov A.O., Bondareva V.M., Shpakova E.A., Tarasenko I.I., Derkach K.V., Kuznetsova L.A., Vlasov G.P., Pertseva M.N.</b> .....	428
ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ, ПРОИЗВОДНЫХ ТРЕТЬЕЙ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ ПЕТЛИ СЕРОТОНИНОВОГО РЕЦЕПТОРА 6-ГО ТИПА, НА АКТИВНОСТЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ К СЕРОТОНИНУ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ <b>Шпакова Е.А., Тарасенко И.И., Власов Г.П., Шпаков А.О.</b> .....	429
INFLUENCE OF THE PEPTIDES, DERIVATIVES OF THE THIRD INTRACELLULAR LOOP OF SEROTONIN RECEPTOR OF THE TYPE 6, ON ACTIVITY OF SEROTONIN-SENSITIVE ADENYLYL CYCLASE SIGNALING SYSTEM <b>Shpakova E.A., Tarasenko I.I., Vlasov G.P., Shpakov A.O.</b> .....	430
ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИАНИЛИНСОДЕРЖАЩИХ СОРБЕНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИСУЛЬФОКИСЛОТНЫХ МАТРИЦ <b>Ягудаева Е.Ю., Капустин Д.В., Букина Я.А., Тверской В.А., Рязанцев Д.Ю., Завриев С.К., Зубов В.П.</b> .....	431
PREPARATION OF A POLYANILINE ADSORBENTS ON THE POLY(SULFONIC ACID) MATRIX <b>Yagudaeva E.Yu., Bukina Ya.A., Kapustin D.V., Tverskoy V.A., Ryazantsev D.Yu., Zavriev S.K., Zubov V.P.</b> .....	432
РЕКОМБИНАНТНОЕ ГУМАНИЗИРОВАННОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ F1 АНТИГЕНА <i>YERSINIA PESTIS</i> <b>Ягудин Т.А., Марченко А.Н., Зацепин С.С., Городецкая С.Б., Солопова О.Н., Шемчукова О.Б., Сवेशников П.Г., Беневоленский С.В.</b> ...	433
RECOMBINANT HUMANIZED ANTIBODY AGAINST F1 ANTIGEN <i>YERSINIA PESTIS</i> <b>Yagudin T.A., Marchenko A.N., Zatsepin S.S., Gorodetskaya S.B., Solopova O.N., Shemchukova O.B., Sveshnikov P.G., Benevolensky S.V.</b> ...	434
АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ДВУХ ПРОЛИН-БОГАТЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ЛЕЙКОЦИТОВ КОЗЫ <b>Ямщикова Е.В., Шамова О.В., Овчинникова Т.В., Орлов Д.С., Кокряков В.Н.</b> .....	435



ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF TWO PROLINE-RICH PEPTIDES FROM GOAT LEUKOCYTES <i>Yamschikova E.V., Shamova O.V., Ovchinnikova T.V., Orlov D.S., Kokryakov V.N.</i> .....	436
АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ .....	437
AUTHOR INDEX .....	444
СОДЕРЖАНИЕ .....	451
CONTENTS .....	451



### **ООО "ИнтерЛабСервис"**

109544, Москва, Б.Казенный пер., д.10, стр.3  
Тел: (495) 925-05-54 факс: (495) 916-18-18  
info@interlabservice.ru  
www.interlabservice.ru

Поставка лабораторного оборудования, реагентов и пластиковых расходных материалов для молекулярно-биологических и биохимических исследований. Компания является официальным дистрибьютором продукции ряда ведущих отечественных и зарубежных фирм.

"ИнтерЛабСервис" предлагает:

- Наборы реагентов для выделения нуклеиновых кислот **QIAGEN со склада в Москве** и под заказ
- Автоматические станции для выделения нуклеиновых кислот и другое оборудование от QIAGEN
- Амплификатор Rotor-Gene для проведения ПЦР в реальном времени с функцией HRM от QIAGEN и прочее лабораторное оборудование для ПЦР
- Ферменты, наборы реагентов и отдельные реагенты для ПЦР, ОТ-ПЦР и NASBA
- Широкий спектр качественного лабораторного пластика компании AxyGen
- Спектрофотометр PicoDrop для измерений объемов до 2 мкл непосредственно в наконечнике дозатора
- Флуоресцентный ридер для биочипов MArS
- Сервисное обслуживание оборудования
- Информационная и методическая поддержка клиентов

### **InterLabService**

B. Kazenniy per, 10-3, Moscow, Russia, 105064  
Phone: +7 (495) 925-0554 Fax: +7 (495) 916-1818  
www.interlabservice.ru  
info@interlabservice.ru

Supplier of laboratory equipment, reagents and consumables for molecular biology and biochemistry research. Official distributor of several leading Russian and international manufactures.

InterLabService offers:

- **QIAGEN** nucleic acid purification kits **from Moscow stock** and by order
- QIAGEN automated systems for nucleic acid purification and other laboratory protocols
- Real-time PCR cyler Rotor-Gene with HRM option from QIAGEN along with other PCR equipment
- Enzymes, reagent kits and individual reagents for PCR, RT-PCR and NASBA
- Wide range of high quality laboratory plastic from AxyGen Scientific
- Spectrophotometer Picodrop measuring 2 µl samples directly through the pipette tip
- MArS microarray fluorescence scanner
- Technical service for supplied equipment
- Informational and technical customer support



Компьютерная верстка: Т.И. Яковлева

Отпечатано на полиграфическом участке ИБХ РАН  
Печать офсетная. Печ. л. 25,0. Тираж 400 экз.

© Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической  
химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
Москва, 2009 г.