

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 2. Young scientists competition

Moscow – Pushchino

Конференция проводится при поддержке:

Российской академии наук
Министерства образования и науки Российской Федерации
Российского фонда фундаментальных исследований
Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова
ЗАО "Пептек"
ООО "ИнтерЛабСервис"
Московского института кибернетической медицины

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

МЕТАБОЛИЗМ N-АЦИЛДОФАМИНОВ В ТКАНЯХ И КЛЕТКАХ ЖИВОТНЫХ

Акимов М.Г.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
E-mail: akimovmike@yandex.ru
Факс: (495) 335-71-03; тел.: (495) 330-65-92

Исследования предыдущих лет показали, что N-ацилдофамины (NADA) – дофаминамиды длинноцепочечных жирных кислот – являются эндогенными лигандами ванилоидного и каннабиноидного рецепторов, оказывают иммуномодулирующее, сосудорасширяющее и противовирусное действие, ингибируют ферменты каскада арахидоновой кислоты. В головном мозге млекопитающих обнаружены дофаминамиды арахидоновой (AA-DA), олеиновой (OI-DA), стеариновой (St-DA) и пальмитиновой жирных кислот, а также показана возможность биосинтеза и метилирования N-арахидоноилдофамина. Однако, локализация и производительность систем метаболизма N-ацилдофамина оставались неустановленными, и потому биологическая значимость данных об их сигнальном действии была весьма ограниченной.

Мы выдвинули гипотезу о том, что пути метаболизма NADA и свободного дофамина могут быть близкими, и изучили стадии биосинтеза NADA (конъюгацию с жирной кислотой, окисление, декарбоксилирование) и основные пути их превращений – сульфатирование, метилирование, глюкуронидирование, окисление – во фракционированных гомогенатах печени, спинного и головного мозга крысы, а также в полных гомогенатах пресноводных гидр *Hydra attenuata* и *H. magnipapillata* и на культурах клеток глиомы C6 и феохромоцитомы PC12. Накопление целевых продуктов подтверждали методами масс-спектрометрии ESI и MALDI.

Применение тритий-меченных предшественников позволило нам детектировать биосинтез NADA во всех исследованных тканях, причем процесс был локализован в микросомах. Мы установили, что наибольшее количество продукта наблюдалось при использовании комбинации: жирная кислота + тирозин. CoA-эфир жирной кислоты не используется в качестве предшественника N-ацилдофамина, а N-ацилтирозин должен быть сначала декарбоксилирован, и только потом окислен до AA-DA. Для успешного биосинтеза молекул в клеточных культурах при их насыщении соответствующей жирной кислотой необходим внешний сигнал: кальцимицин для C6 и KCl для PC12.

Известно, что, в отличие от большинства амидов жирных кислот, NADA гидролизуются с трудом; этот факт подтвержден в наших экспериментах.

Процесс метилирования по катехольной группе оказался весьма эффективным: специфическая активность систем цитозольной фракции в отношении AA-DA, OI-DA и N-докозагексаеноилдофамина (DHA-DA) была в диапазоне 81-106 пмоль/(мин*мг) в печени, и 9-23 пмоль/(мин*мг) в нервной системе. Метилирование NADA не детектировалось в

микросомальной фракции, а метилирование St-DA – ни в одной из изученных систем.

Еще один высокопроизводительный путь превращений NADA – сульфатирование. Реакция изучена методом фотометрии с использованием синтезированного стандарта сульфата AA-DA. Процесс сульфатирования протекает в цитозольной фракции печени (специфическая активность 0.5-1.32 нмоль/(мин*мг)), спинного и головного мозга (до 3.45 нмоль/(мин*мг)) крысы, а также в гомогенате пресноводной гидры *H. magnipapillata*. В последнем случае превращению подвергались только DHA-DA и Ol-DA. Несмотря на высокую производительность, K_m системы головного мозга для DHA-DA оказалась достаточно высокой – 17.76 мкМ, что делает более вероятной роль сульфатирования в качестве защиты сигнальной системы от перегрузки и экзогенных ацилдофаминов, а не как способ инактивации N-ацилдофаминов для прерывания их сигнала. Сульфатирование St-DA обнаружено не было. Единственный установленный путь превращений St-DA – глюкуронидирование. Используя фотометрию продукта сопряженной реакции, мы зафиксировали данный процесс в головном мозге, где глюкуронидируются St-DA и Ol-DA, и в печени (Ol-DA, AA-DA, DHA-DA). Специфическая активность системы головного мозга находится в диапазоне 0.14-0.302 нмоль/(мин*мг), а печени – 0.07-0.16 нмоль/(мин*мг), что сравнимо с метилированием. K_m для St-DA в головном мозге оказалась достаточно высокой – 96 мкМ.

Окисление NADA было изучено во фракциях плазмалеммы и митохондрий крысы с использованием фотометрии. В первом случае зафиксировано окисление всех ненасыщенных дофаминамидов со специфической активностью 0.75-1.91 нмоль/(мин*мг). В митохондриальной фракции восстановление искусственного акцептора электронов стимулировали только AA-DA и DHA-DA. Вероятный продукт окисления NADA по катехольной группе, хинон, был синтезирован нами и проявил себя как сильный нуклеофил. Он легко вступал в реакции присоединения с такими SH-содержащими молекулами, как 2-меркаптоэтанол и β-лактоглобулин, а также с инсулином, с образованием аддуктов в первом случае и олигомеров в последних двух.

Таким образом, метаболизм NADA повторяет метаболизм дофамина с некоторыми ткане- и молекулоспецифическими отличиями. Предположительно, это может иметь значение для регуляции передачи сигнала NADA.

METABOLISM OF N-ACYLDOPAMINES IN ANIMAL TISSUES AND CELLS

Akimov M.G.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: akimovmike@yandex.ru

Fax: (495) 335-71-03; tel.: (495) 330-65-92

The research of the past years has shown N-acyldopamines (dopamineamides of long-chain fatty acids, NADA) to be endogenous ligands of vanilloid and cannabinoid receptors which possess immunomodulatory, vasodilatory and antiviral activity, inhibit enzymes of the arachidonic acid cascade. In mammalian brain dopamineamides of arachidonic (AA-DA), oleic (Ol-DA), stearic (St-DA) and palmitic acid were identified and the possibility of biosynthesis and methylation of AA-DA was demonstrated. However the localization and productivity of N-acyldopamines' metabolic systems remained unknown and thus the biological significance of data on their signal properties was very limited.

We proposed a hypothesis that the pathways of NADA metabolism could be close to those of free dopamine and studied the stages of NADA biosynthesis (conjugation with fatty acid, oxidation, decarboxylation) and basic pathways of their transformation – sulfation, methylation, glucuronidation, oxidation in fractionated homogenates of rat liver, brain and spinal cord, as well as in whole homogenates of freshwater hydras *Hydra attenuata* and *H. magnipapillata* and in glioma C6 and pheochromocytoma PC12 cell cultures. The accumulation of target products was confirmed using ESI and MALDI mass-spectrometry.

Using tritium-labeled precursors we detected biosynthesis of NADA in all tissues studied; the process was localized in microsomes. We found that the most product formed in incubation of fatty acid with tyrosine. CoA-ester of fatty acid is not N-acyldopamines' precursor; N-acyltyrosine has to be decarboxylated first and then oxidized to AA-DA. An external signal is required for successful biosynthesis in cell cultures, which is calcimycin for C6 and KCl for PC12.

It was known that contrary to most fatty acid amides NADA are poorly hydrolyzed; this fact was confirmed in our experiments.

The methylation of catechol group of NADA was very efficient: specific activity of cytosolic fraction's enzymes for AA-DA, Ol-DA and N-docosahexaenoyldopamine (DHA-DA) was in range 81-106 pmol/(min*mg) in liver and 9-23 pmol/(min*mg) in nervous system. NADA methylation in microsomes was not detected, methylation of St-DA was undetectable in all systems studied.

Yet another high-performance pathway of NADA transformation was sulfation. This reaction was studied by photometry using synthesized standard of AA-DA sulfate. Sulfation took place in cytosolic fraction of rat liver (specific activity 0.5-1.32 nmol/(min*mg)), spinal cord and brain (up to 3.45 nmol/(min*mg)) as well as in freshwater hydra *H. magnipapillata* homogenate. In the latter case only DHA-DA and Ol-DA were converted. Though its high performance K_m of brain enzymatic system for DHA-DA appeared to be quite high: 17.76 мкМ. This makes the role of sulfation as protector against overload and exogenous acyldopamines

more probable than the one as the way of NADA inactivation for termination of their signal. Sulfation of St-DA was not detected.

The only St-DA transformation pathway discovered was glucuronidation. Using photometry to measure the product of conjugated reaction we were able to detect this process in brain (here St-DA and Ol-DA were glucuronated) and in liver (Ol-DA, AA-DA, DHA-DA). Specific activity of brain system was in range 0.14-0.302 nmol/(min*mg) and of liver one 0.07-0.16 nmol/(min*mg) and thus was comparable to methylation. K_m for St-DA in brain was quite high: 96 mkM.

NADA oxidation was studied in rat plasma membrane and mitochondrial fractions using photometry. In the first case the oxidation of all unsaturated dopamineamides with specific activity 0.75-1.91 nmol/(min*mg) was detected. In mitochondrial fraction the reduction of artificial electron acceptor was stimulated only by AA-DA and DHA-DA. The probable catechol group oxidation product on NADA, quinone, was synthesized and appeared to be a good nucleophile. It easily reacted with such SH-containing molecules as 2-mercaptoethanol and β -lactoglobulin as well as with insulin producing adducts in the first case and oligomers in the latter two.

Thus NADA metabolism resembles the one of dopamine with some tissue- and molecule-specific differences. Probably this may be significant for regulation of NADA signal transduction.

ПРОДУКЦИЯ ПОЛИЭПИТОПНОГО БЕЛКА ВИРУСА ЯЩУРА В БАКТЕРИЯХ И РАСТЕНИЯХ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ

Андрянова Е.П., Кременчугская С.Р., Борисов В.В., Эльдаров М.А., Фолимонов А.С.

Центр "Биоинженерия" РАН, Москва

E-mail: andrianovak@gambler.ru

Факс: (499) 135-05-71; тел.: (499) 135-12-30

Начиная с двадцатого столетия, животноводство многих стран мира несет большие убытки от эпидемических вспышек ящура. Для профилактики ящура в настоящее время широко используются вакцины на основе инактивированного вируса. К сожалению, такие вакцины имеют ряд существенных недостатков, наиболее серьезные из которых – необходимость использования специальных лабораторий для их получения, сложность достоверного диагностического различия вакцинированного животного от заболевшего после их использования и недостаточная быстрота получения в условиях возникновения очага заболевания. Мы исследуем возможность применения препаратов рекомбинантных белков, образованных набором наиболее иммуногенных эпитопов вируса ящура в составе одной полипептидной цепи. Вакцинация такими полиэпитопными белками, содержащими комбинацию хорошо изученных В- и Т-клеточных эпитопов вируса, может приводить к улучшению иммунного ответа у животного и способствовать более эффективной защите.

В нашей лаборатории был сконструирован синтетический ген, кодирующий фрагменты структурных (VP1, VP4) и неструктурных (2C, 3D) белков вируса ящура наиболее широко распространенного изолята О/Тайвань/99. Во избежание потенциальных проблем сворачивания белка эпитопы были разделены "гибкими" глицин-богатыми линкерами. В последовательность рекомбинантного белка были включены дополнительные фрагменты, представляющие собой в одном случае хитин-связывающий домен, а в другом – шесть аминокислотных остатков гистидина для возможности аффинной очистки белка в нативных или денатурирующих условиях, соответственно.

Полиэпитопный белок был экспрессирован в бактериях и растениях. Для получения белка в бактериальной системе экспрессии были использованы клетки *E.coli* штамма Rosetta 2 (DE3), трансформированные плазмидой pET23, кодирующей рекомбинантный ген. В этой системе белок был экспрессирован с использованием метода самоиндукции. В качестве растительной системы были использованы растения *N. benthamiana*, где белок экспрессировали с помощью модифицированного X-вируса картофеля и агробактериальной инокуляции. Белки были выделены, очищены и проверены на растворимость в физиологических условиях.

Препараты полиэпитопного белка, полученного в бактериях, были использованы для однократной иммунизации морских свинок. Было показано, что у шести из семи иммунизированных животных не развивались

признаки заболевания после заражения вирусом ящура. В сыворотке животных присутствовали антитела к вирусу ящура серотипа О, легко выявляемые методами непрямого иммуноферментного анализа и в реакции нейтрализации цитопатического эффекта вируса. Антитела сывороток иммунизированных животных преимущественно реагировали с вирусным белком VP1.

Полученные в нашей работе результаты позволяют предположить перспективность разрабатываемого метода иммунизации животных полиэпитопным белком.

PRODUCTION OF FMDV POLYPEPTIDE PROTEIN IN BACTERIA AND PLANTS AS A POTENTIAL VACCINE

Andrianova E.P., Kremenchugskaya S.R., Borisov V.V., Eldarov M.A., Folimonov A.S.

Centre "Bioengineering" RAS, Moscow

E-mail: andrianovak@rambler.ru

Fax: (499) 135-05-71; tel.: (499) 135-12-30

Foot-and-mouth disease (FMD) causes economical losses in the livestock industry of many countries of the world. The modern technology to control FMD is based on the vaccine which is chemically inactivated virus. Unfortunately this method has a number of disadvantages including the need of high-containment facilities, difficulties in reliable distinguishing vaccinated from infected animals and not an adequate rate of vaccine production in a case of emergency. We are developing alternative FMD vaccine-candidate, based on the proteins, consisting of efficient viral epitopes. Vaccination by such polypeptide proteins, which include a combination of well characterized B- and T-cell epitopes of the virus, may result in improving of animal immune response and inducing protection from the disease. Polypeptide proteins can be obtained fast and in great quantities using well established *E. coli* expression system. The use of inexpensive plant expression system is also being researched.

The recombinant gene designed in our laboratory encoded fragments of structural (VP1, VP4) and non-structural proteins (2C, 3D) of wide spread isolate FMDV O/Taiwan/99. Epitopes were separated by "flexible" glycine-rich linkers to prevent possible problems with folding of the protein. The protein was expressed with two affinity tags, chitin binding domain and six histidines for purification in native and denaturing conditions, respectively.

The polypeptide protein was expressed in bacteria and plants. The bacterial strain Rosseta 2 was transformed with pET23 plasmid, which carried the recombinant gene. In this system the protein was produced by autoinduction method. In *N. benthamiana* plants the protein was expressed using a modified potato virus X construct with agroinfiltration. Produced proteins were extracted, purified and water solubility was examined.

The bacterial protein was used for single immunization of guinea pigs. Six of seven immunized animals did not develop FMD symptoms after inoculation with the virus. The sera of immunized animals contained FMDV type O-specific antibodies readily detectable with commercial ELISA kits and in reaction of neutralization of virus cytopathic effect. The antibodies primarily reacted with protein VP1.

The obtained results suggest that the polypeptide protein immunization method being developed is promising.

КОНСТРУИРОВАНИЕ НОВОГО ВЕКТОРА ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ETA-EGFP ГИБРИДНОГО БЕЛКА И ЕГО ЭФФЕКТЫ В КЛЕТКАХ HeLa

Арефьева А.С., Глинка Е.М., Сапожников А.М., Зацепина О.В.

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

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

E-mail: quality4@rambler.ru

Факс: (495) 330-66-47; тел.: (495) 779-23-66

Конструирование векторов для экспрессии цитотоксичных белков и их направленная доставка в опухолевые клетки являются многообещающим подходом в генотерапии рака. Вообще, последовательности генов высокоэффективных цитотоксичных белков, экспрессия которых индуцирует клеточную смерть, широко используются при конструировании векторов для генной терапии. Экзотоксин А из *Pseudomonas aeruginosa* (ETA, exotoxin A) и дифтерийный токсин (DT-A, diphtheria toxin A) являются мощными цитотоксичными белками, которые останавливают белковый синтез путем инактивации фактора элонгации-2 (EF-2, elongation factor-2). Наряду с разработкой ткане-/опухолеспецифичных промоторов для адресной экспрессии генов токсичных белков в опухолевых клетках используется и локальная генная терапия для прямой доставки векторов с высокоактивными промоторами, такими как цитомегаловирусный промотор (CMV, cytomegalovirus promoter), в опухолевые ткани. Довольно часто большинство тканеспецифичных промоторов являются более слабыми по сравнению с широко используемыми вирусными промоторами, такими как CMV ранний промотор и SV40 ранний промотор. Некоторые невирусные методы генной доставки, такие как инъекции плазмидной ДНК, электропоративная доставка, доставка с помощью липосом и сочетание этих методов, также являются подходящими и эффективными для трансфекции солидных опухолей.

Мы использовали рEGFP-N1 вектор при конструировании новой плазмиды (рCMV-ETA-EGFP) для эукариотической экспрессии усеченного фрагмента экзотоксина А (ETA фрагмент был амплифицирован с плазмиды рSW200, любезно предоставленной Prof. Winfried Wels, Chemotherapeutisches Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus, Frankfurt, Germany). Известно, что ETA ингибирует белковый синтез и, следовательно, вызывает клеточную гибель. Ген ETA был генетически "слит" с геном зеленого флуоресцирующего белка (EGFP, enhanced green fluorescent protein), при этом экспрессия гибридного ETA-EGFP гена была поставлена под контроль CMV промотора. Эффекты экспрессии рCMV-ETA-EGFP определяли при помощи метода временной трансфекции культуры клеток человека HeLa. При микроскопическом анализе клетки HeLa, трансфицированные рCMV-ETA-EGFP и котрансфицированные рCMV-ETA-EGFP и рEGFP-N1, проявляли низкую интенсивность флуоресценции по сравнению с клетками, трансфицированными только рEGFP-N1. Результаты проточной цитометрии соответствовали таковым, полученным в результате флуоресцентной микроскопии, и давали информацию о функциях ETA-EGFP гибридного белка.

Анализ количества мертвых клеток (методом исключения трипанового синего) подтвердил высокий токсический эффект гибридного белка ETA-EGFP в клетках, трансфицированных рCMV-ETA-EGFP и котрансфицированных рCMV-ETA-EGFP и рEGFP-N1. Используя субстратный Ac-DEVD-AFC тест, мы обнаружили, что ETA-EGFP гибридный белок индуцировал апоптотическую гибель клеток путем активации каспазы-3.

Важным аспектом генной терапии является исследование эффектов экспрессии токсичных белков в клетках. Однако, для этого требуются специальные методы для определения активности новых векторов. Относительно простым и быстрым методом определения экспрессии генов, кодирующих токсичные белки, является котрансфекция созданных конструкций с люциферазо- или GFP (green fluorescent protein)-содержащими векторами. В этих условиях продукт экспрессии токсичного гена специфически ингибирует экспрессию репортерного гена. При этом, существуют такие клеточные белки, которые являются очень чувствительными к внешним стимулам, таким как введение чужеродных агентов. Эти белки также могут служить индикаторами последствий введения векторов в клетки. Подобными реакционными маркерами могут служить некоторые специфические ядрышковые белки. При иммуноцитохимическом анализе, используя антитела против одного из маркерных белков ядрышка A3, локализация которого меняется при обработке клеток HeLa многими известными ингибиторами трансляции, мы получили доказательство того, что белковый синтез ингибируется в трансфицированных клетках *in situ*.

ETA-EGFP гибридный белок также был идентифицирован в лизатах трансфицированных клеток методом Western-блота при помощи антител против GFP.

Таким образом, наши результаты показывают, что клетки HeLa, трансфицированные рCMV-ETA-EGFP, синтезируют ETA-EGFP гибридный белок, который эффективно ингибирует белковый синтез, приводя к массовой гибели клеток путем апоптоза через каспаза-3-зависимый путь. Сконструированный вектор может быть использован при генотерапии рака, а также полезен при исследовании трансляционных нарушений в злокачественных клетках человека. Также мы предлагаем новый подход для определения активности векторов, кодирующих ингибиторы белкового синтеза, основываясь на перераспределении ядрышковых белков в трансфицированных клетках.

CONSTRUCTION OF THE NOVEL VECTOR FOR EXPRESSION OF ETA-EGFP FUSION PROTEIN AND ITS EFFECTS IN HeLa CELLS

Arefieva A.S., Glinka E.M., Sapozhnikov A.M., Zatsepina O.V.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: quality4@rambler.ru

Fax: (495) 330-66-47; tel.: (495) 779-23-66

Construction of vectors expressing cytotoxic proteins and their targeted delivery into malignant tumor cells is a promising approach for gene therapy. Generally, the gene sequences of highly potent cytotoxic proteins, the expression of which induce cell death, are used in gene therapy vectors. Exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* (ETA) and diphtheria toxin (DT-A) are powerful cytotoxic proteins that arrest protein synthesis by inactivating elongation factor-2 (EF-2). Alongside the development of tissue/tumor-specific promoters for the targeted expression of genes of toxic proteins in cancer cells, local gene therapy can be used for the directed transfer of vectors with very active promoters, such as the cytomegalovirus promoter (CMV), into tumor tissues. Very often, most tissue-specific promoters are much weaker than commonly used viral promoters such as the CMV early promoter and SV40 early promoter. Some non-viral methods of gene delivery, such as plasmid DNA injection, electroporation-assisted delivery, liposome-enhanced techniques, as well as combinations of these methods, are feasible and efficient for transfecting solid tumors.

We used the pEGFP-N1 vector to construct a novel plasmid (pCMV-ETA-EGFP) for eukaryotic expression of a truncated exotoxin A (ETA fragment was amplified from plasmid pSW200, kindly provided by Prof. Winfried Wels, Chemotherapeutisches Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus, Frankfurt, Germany). That is known to inhibit protein synthesis, and subsequently induce cell death. ETA gene was linked genetically to the enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene, and ETA-EGFP gene expression was driven by the CMV promoter. The effects of pCMV-ETA-EGFP expression were examined in transiently transfected HeLa cells. According the microscopic analysis, HeLa cells transfected with pCMV-ETA-EGFP or cotransfected with pCMV-ETA-EGFP and pEGFP-N1 showed lower fluorescence intensity, than cells transfected with pEGFP-N1 alone. The flow cytometry results were in good agreement with those obtained by fluorescence microscopy and revealed the functions of the ETA-EGFP fusion protein.

Analysis of the number of dead cells (using trypan blue exclusion assay) further confirmed the highly toxic effect of the ETA-EGFP fusion protein on cells transfected with pCMV-ETA-EGFP or cotransfected with pCMV-ETA-EGFP and pEGFP-N1. Using Ac-DEVD-AFC substrate test we discovered that ETA-EGFP fusion protein induced apoptotic cell death through the caspase-3 activation.

An important aspect of gene therapy is the study of the effects of toxic protein expression in cells. However, this requires methods for detecting the activity of new vectors. Relatively simple and rapid method for estimating the expression of a gene encoding a toxic protein is to cotransfect the created constructs with

luciferase- or GFP (green fluorescent protein)-containing vectors. In such cases, the expression product of the toxic gene specifically inhibits reporter gene expression. Additionally, there are cell proteins that are very sensitive to external stimuli such as the introduction of foreign agents. Such proteins can also serve as indicators of the effects that arise from the introduction of such vectors into cells. Several specific nucleolar proteins may be used as reaction markers in cells. During immunocytochemistry, using the antibody against a marker nucleolar antigen A3, the distribution of which changes when HeLa cells are treated with known translation inhibitors, we obtained evidence to support the idea that protein synthesis is inhibited in transfected cells *in situ*.

ETA-EGFP fusion protein was identified in lysates of transfected cells by employing the Western blot analysis (using anti-GFP antibodies).

Collectively, our results indicate that HeLa cells transfected with pCMV-ETA-EGFP synthesize the ETA-EGFP fusion protein that efficiently inhibits protein synthesis, leading to massive cell death by an apoptosis-mediated pathway with a participation of caspase-3. The constructed vector can be used in suicidal gene therapy of cancer and may also be useful for investigating the general effects of translational downregulation in human cancer cells. We also suggest a novel approach for detecting the activity of new vectors encoding different translation inhibitors, which is based on the redistribution of nucleolar proteins in transfected cells.

РЕГУЛЯЦИЯ ОПЕРОНА *rpsB-tsf*, КОДИРУЮЩЕГО РИБОСОМНЫЙ БЕЛОК S2 И ФАКТОР ЭЛОНГАЦИИ Ts

Асеев Л.В., Бони И.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
E-mail: leroymail@gmail.com
Факс: (495) 330-65-38; тел.: (495) 330-63-29

Аутогенная регуляция синтеза рибосомных белков (р-белков) – необходимое условие поддержания эквимоллярности синтеза рибосомных компонентов у бактерий. Молекулярные механизмы аутогенного контроля изучены для многих рибосомных оперонов, однако оперон *rpsB-tsf*, кодирующий жизненно важные компоненты трансляционного аппарата – р-белок S2 и фактор элонгации Ts, никогда не исследовался и даже его промотор не был локализован. Цель работы – изучение особенностей регуляции оперона *rpsB-tsf* у *Escherichia coli* и родственных бактерий в сравнении с известными моделями регуляции других рибосомных оперонов. В работе получены следующие принципиально новые результаты.

Впервые локализован промотор оперона и показана его консервативность в γ -подклассе протеобактерий. Для идентификации промотора картированы 5'-концы *rpsB*-транскриптов методом удлинения праймера на суммарной клеточной РНК. Обнаружен единственный сигнал, соответствующий позиции -162 (относительно А в стартовом кодоне AUG *rpsB*-мРНК). Анализ последовательности перед локализованным транскрипционным стартом позволил предположить, что транскрипция оперона направляется единственным промотором TGTGGTATAAA, принадлежащим к редкому классу "удлиненных" -10 промоторов, что подтверждено мутационным анализом. Удлиненный -10-элемент отделен от старта транскрипции так называемым дискриминатором GCGCGC, типичным для промоторов стабильных РНК, негативно регулируемых алармоном ppGpp при аминокислотном голодании, но редким для промоторов белковых оперонов. Получены данные, что GC-богатый дискриминатор отвечает за негативную регуляцию *rpsB*-промотора при увеличении уровня ppGpp в клетке. Филогенетический анализ выявил высокую консервативность строения промоторной области оперона *rpsB-tsf* (сочетание удлиненного – 10-элемента и GC-богатого дискриминатора) у γ -протеобактерий.

Впервые показано, что р-белок S2 служит негативным регулятором экспрессии оперона *rpsB-tsf* на пост-транскрипционном уровне. Оперон *rpsB-tsf* априори не подчиняется классической схеме аутогенной регуляции р-белков, согласно которой один из продуктов оперона является не только структурным компонентом рибосомы, напрямую взаимодействующим с рРНК на первых этапах сборки субчастиц, но и негативным регулятором, способным подавлять трансляцию своей мРНК, если его количество в клетке превышает уровень рРНК. Однако, S2 не узнает свободную рРНК и включается в состав 30S субчастиц на завершающем этапе сборки, поэтому как потенциальный белок-репрессор он априори представлял исключение

из общего правила. Для исследования возможности аутогенного контроля экспрессии оперона *in vivo* созданы специализированные штаммы, в которых синтез β -галактозидазы с хромосомного *lacZ*-гена направляется областью инициации трансляции *rpsB*-мРНК, включающей 5'-нетранслируемую область (5'-НТО) различной длины (как природную длиной 162 нт, так и укороченные варианты), а также плаزمиды, экспрессирующая S2 с *rpsB*-промотора. Синтез S2 с плазмиды специфически подавлял экспрессию *rpsB-lacZ*-репортера, если длина 5'-НТО не менее 120 нт, что прямо доказывает функцию S2 как аутогенного репрессора. Показана консервативность фолдинга 5'-НТО у разных представителей γ -протеобактерий: в каждом случае две протяженные шпильчатые структуры LH и RH разделены слабоструктурированной центральной областью CR. Более того, некоторые участки последовательности 5'-НТО оказались универсально консервативными, что предполагает их важную роль в регуляции экспрессии. Филогенетические предсказания подтверждены экспериментально. Полученные данные указывают на высокую консервативность механизма регуляции оперона *rpsB-tsf* в эволюции протеобактерий.

С помощью Вестерн- и Нозерн-блоттинга исследован механизм регуляции экспрессии второго гена оперона, *tsf*, который не имеет собственного промотора и транскрибируется как часть бицистронного транскрипта. Показано, что прямое ингибирование трансляции *rpsB*-гена белком S2 оказывает полярный эффект на транскрипцию второго цистрона (и как следствие на уровень синтеза фактора Ts) в результате нарушения транскрипционно-трансляционного сопряжения в пределах *rpsB*-гена.

Показано, что для аутогенной регуляции своего оперона белку S2 требуется помощник, р-белок S1. Оказалось, что нарушение аутогенного контроля происходит не только в *rpsB*-мутантах (нарушение регуляции в мутантах по гену, кодирующему белок-регулятор, типично для оперонов р-белков), но и в мутанте по гену белка S1 (*rpsA::IS10*) с низким уровнем синтеза укороченного варианта белка. Зависимость от уровня синтеза р-белка, кодируемого в другом опероне, предполагает, что в регуляции может участвовать комплекс р-белков S1-S2. Образование такого комплекса доказано с помощью иммунопреципитации. Т.о., выявлено принципиальное отличие механизма аутоконтроля оперона *rpsB-tsf* от известных моделей регуляции других оперонов р-белков, где белку-репрессору не требуется помощник.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 06-04-48353 и 09-04-01014, основные результаты опубликованы: Aseev et al. 2008. RNA 14: 1882-1894; Асеев и др. 2009. Мол. Биол. 43: 111-118.

REGULATION OF THE *rpsB*-*tsf* OPERON ENCODING RIBOSOMAL PROTEIN S2 AND ELONGATION FACTOR Ts

Aseev L.V., Boni I.V.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: leroy@mail@gmail.com

Fax: (495) 330-65-38; tel.: (495) 330-63-29

Autogenous regulation of ribosomal protein (r-protein) synthesis ensures the balanced and equimolar production of ribosomal components in bacteria. Molecular mechanisms of the autogenous control have been studied for many of ribosomal operons, except for *rpsB*-*tsf* encoding two essential proteins of translational machinery, r-protein S2 and elongation factor Ts, which has never been studied and where even promoter location has remained unknown. The main goal of our study was to investigate the regulatory features of *rpsB*-*tsf*, in comparison with the models of regulation developed for other r-protein operons. New fundamentally important results obtained in our work are following.

The promoter of the operon was localized for the first time and shown to be highly conserved in γ -subdivision of proteobacteria. To identify the *rpsB* promoter(s), we have mapped 5'-ends of the *in vivo* *rpsB* transcripts by using primer extension on the total cellular *E. coli* RNA. The only signal was found which corresponded to the position -162 (relative to the A+1 of the *rpsB* start codon AUG). Analysis of the sequence preceding this presumable transcriptional start point suggested that *rpsB*-*tsf* transcription may be governed by a single promoter TGTGGTATAAAA belonging to the rare class of extended minus 10 promoters, which was further directly confirmed by site-directed mutations. The extended -10 element is separated from the transcription start by a so-called "discriminator" region GCGCGC, which is typical for stable RNA promoters under negative control of the alarmone molecule ppGpp under amino acids starvation, but rarely occurs in promoters for protein operons. We found that the GC-rich discriminator is responsible for negative regulation of the *rpsB* promoter by elevated level of ppGpp in a cell. Phylogenetic approach revealed high conservation of the *rpsB* promoter design (combination of the extended -10 element with the GC-rich discriminator) among γ -proteobacteria.

It is shown for the first time that r-protein S2 serves as a negative regulator of the *rpsB*-*tsf* expression at the post-transcriptional level. The *rpsB*-*tsf* operon a priori cannot fit the classical model for autogenous control of r-protein synthesis, according to which one of the r-protein encoding by an operon serves not only as a structural component directly interacting with rRNA at the first steps of ribosome assembly but also as a negative regulator inhibiting translation of its own mRNA if its level exceeds that of rRNA. Indeed, S2 does not recognize naked rRNA and participates at the last step of the 30S assembly, therefore as a potential autorepressor it a priori represents an exception from the canonic rule. To study whether *rpsB*-*tsf* can be nevertheless regulated by S2, we created a series of specialized strains where production of γ -galactosidase from chromosomal *lacZ* gene is driven by translation initiation region of the *rpsB* mRNA bearing 5'-UTR of differing length (native 162-nt long UTR and its truncated variants), as well as

the plasmid producing S2 from the *rpsB* promoter. S2 in trans specifically inhibited expression of the *rpsB*-*lacZ* reporter if the length of 5'-UTR was no less than 120 nt. Thus, the role of S2 as autogenous repressor was directly proven. Phylogenetic analysis revealed high conservation of the 5'-UTR specific folding among γ -proteobacteria: in all cases two long irregular hairpins LH and RH were separated by loosely structured central region CR. Moreover, several short sequences within CR and RH appeared to be universally conserved, implying their important role in expression regulation. Phylogenetic predictions were experimentally confirmed, thus indicating high level of conservation of the regulatory mechanism in evolution of proteobacteria.

Western- and Northern-blot techniques were used to define the regulation mechanism for the second gene in the operon, *tsf*, which has no its own promoter and is transcribed as a part of bicistronic transcript. We showed that both genes are regulated from a single target within 5'-UTR in front of *rpsB*; the *rpsB* translation is directly inhibited by S2, this inhibition exerts a polar effect on transcription of the second cistron (and therefore on Ts synthesis) caused by breaking the transcription-translation coupling within *rpsB*.

It is shown that protein S2 needs a helper protein, r-protein S1, to regulate the *rpsB*-*tsf* expression. The S2-mediated autogenous control appeared to be impaired not only in *rpsB* mutants (abolished regulation in regulatory protein mutants is typical for r-protein operons) but also in the *rpsA* mutant *rpsA::IS10* producing suboptimal level of truncated r-protein S1. Such dependence on synthesis of the product of another operon is unique and suggests that the S1-S2 complex might be involved in *rpsB*-*tsf* regulation. The formation of this complex was proven by immunoprecipitation. This implies the principal difference of the mechanism for the *rpsB*-*tsf* control from the known regulatory models where the r-protein repressor does not need a helper protein.

This work is supported by RFBR grants 06-04-48353 and 09-04-01014; the main results are published in Aseev et al., 2008, RNA **14**:1882-1894; Aseev et al. 2009. Mol. Biol. (Russ) **43**: 111-118.

НОВОЕ СЕМЕЙСТВО МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА, ОБРАЗОВАННОЕ ПРИ ЗАХВАТЕ ПЕРВОГО ЭКЗОНА ГЕНА *MAST2* РЕТРОТРАНСПОЗОНОМ SVA

Бантыш О.Б., Буздин А.А.

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

В результате детального анализа структуры человек-специфичных вставок ретротранспозонов SVA, мы обнаружили 76 элементов, обладающих необычной структурой: на 5'-конце они несли копии последовательности первого экзона гена *MAST2*, а на 3'-конце – последовательность ретротранспозона SVA. Длины обеих частей обнаруженных химерных элементов сильно различались: от 35 до 383 п.о. для 5'-концевой части и от 662 до 4255 п.о. – для 3'-концевой. Постоянной оставалась только граница между двумя частями. Такие двухчастные элементы несли на 3'-конце поли(А)-последовательность различной длины и были фланкированы прямыми повторами. 5'-Концевая последовательность, комплементарная первому экзону гена *MAST2*, содержала в своём составе CpG-островок, поэтому обнаруженное семейство химерных ретротранспозонов было названо нами CpG-SVA.

Согласно предложенному нами механизму, CpG-SVA семейство образовалось при ретротранспозиции предкового элемента, возникшего благодаря 5'-трандукции, осуществлённой элементом SVA. После разделения предковых линий человека и шимпанзе SVA встроился в первый интрон *MAST2* в прямой ориентации. В результате сплайсинга aberrантной РНК, получившейся с промотора *MAST2*, но терминально процессированной по сигналу полиаденилирования SVA, первый экзон *MAST2* объединился со спланированным 3'-концевым фрагментом ретротранспозона. Образовавшийся предковый элемент CpG-SVA в результате собственной ретропозиции дал начало вышеупомянутому семейству.

Картирование прямых повторов, фланкирующих вставки элементов CpG-SVA, позволило нам обнаружить 18 случаев 5'-трандукции и 13 случаев 3'-трандукции, не относящейся к CpG-SVA геномной ДНК. При этом для четырёх элементов наблюдались одновременно и 5'-, и 3'-трандукции. Во всех четырех случаях элемент CpG-SVA был фланкирован с 5'-конца трансдуцированной последовательностью Alu эволюционно старого семейства AluSc, а с 3'-конца – трансдуцированной последовательностью около 400 п.о., включающей другой эволюционно старый элемент – AluSp.

Общность структуры этих четырех локусов свидетельствует об их общем происхождении от единого предкового элемента CpG-SVA, содержащего трансдуцированные последовательности с обеих сторон.

Привлечение CpG-островка в состав элементов этого химерного семейства, по-видимому, оказалось выгодно с точки зрения повышения частоты ретротранспозиции. Известно, что для гена *MAST2* характерна

высокая тканеспецифическая экспрессия в семенниках, следовательно, можно предположить, что присутствие CpG-островка в составе ретротранспозона обеспечивает высокую тканеспецифичную транскрипцию элементов CpG-SVA в семенниках. Это должно иметь выгодные последствия для семейства CpG-SVA с точки зрения фиксации в геноме, ведь для того, чтобы после вставки в геном хозяина передаться потомству, ретротранспозон должен встроиться в клетках зародышевой линии, например, расположенных в семенниках. Действительно, эволюционно молодое семейство CpG-SVA можно признать весьма "успешным": ведь потомки одной из более чем 1000 имевшихся на тот момент в геноме человека копий SVA (т.е. <0.1%) дали 76 зафиксированных в геноме вставок, что составляет около 9% от всех известных 860 человек-специфичных вставок SVA.

Кроме того, мы показали, что для обратной транскриптазы L1 характерно нематричное навешивание цитозина на 3'-конец синтезированной первой цепи кДНК.

NOVEL FAMILY OF HUMAN TRANSPOSABLE ELEMENTS FORMED DUE TO A FUSION OF THE FIRST EXON OF GENE *MAST2* WITH RETROTRANSPOSON SVA

Bantysh O.B., Buzdin A.A.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: olgabantysh@gmail.com

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

During the detailed structure analysis of human specific inserts of SVA retrotransposons, we identified 76 elements of an unusual structure. These inserts harbor a copy of 1st exon of gene *MAST2* at the 5' end, and a part of SVA retrotransposon sequence on the 3' terminus. Lengths of both parts of these chimeric elements varied significantly: from 35 to 383 base pairs (b.p.) for the 5'-terminal part and from 662 to 4255 b.p. for the 3'-part. Although lengths of both parts varied, junction site was identical for all the elements. These binary elements had a poly(A) sequence of a variable length on the 3' end, and were flanked by 10-12 b.p. long direct repeats. The discovered chimeric family of retrotransposons was named "CpG-SVA" because there was a CpG island on the "exonic" 5'-terminal part of these elements.

We propose a mechanism for the formation of CpG-SVA family that includes a 5'-transduction by an ancestral human specific SVA retrotransposon. An ancestral SVA has inserted into the first intron of gene *MAST2* in the sense orientation. Due to slicing of an aberrant RNA driven by *MAST2* promoter but terminally processed using SVA polyadenylation signal, first exon of *MAST2* has fused to a spliced 3'-terminal fragment of SVA retrotransposon. The above ancestor CpG-SVA element due to retrotranspositions of its own copies has formed a novel family presented in the modern human genome by 76 members.

We identified 18 cases of 5'- and 13 cases of 3'- CpG-SVA transduction of genomic DNA flanking CpG-SVA insertion sites. Moreover, there were four elements that had 3'- and 5'-transductions simultaneously. These "double transducer" CpG-SVA elements were flanked by identical evolutionally ancient Alu repeat sequences of AluSc and AluSp families. Similar structures of these four loci most likely evidence for their single ancestry.

Recruitment of a *MAST2* CpG-island was most likely beneficial to the hybrid retrotransposons because it could significantly increase retrotransposition frequency. *MAST2* gene is transcribed predominantly in testis. Apparently, the presence of *MAST2* CpG island in CpG-SVA elements might increase CpG-SVA family transcription in testis, which would provide further fixation of novel CpG-SVA inserts in genome, when retrotransposed in testicular germ cells. Indeed, expansion of evolutionally young family CpG-SVA was very successful: only one ancestor element among more than 1000 SVA copies presented in genome at that time (i.e. < 0.1%) gave rise to 76 fixed novel inserts (over 9% of all 860 human specified SVA inserts). Also we demonstrate that human L1 reverse transcriptase adds an extra cytosine residue to the 3'-terminus of the nascent cDNA first strand.

СИНТЕЗ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ДИАРИЛЭТЕНОВЫХ АНАЛОГОВ РЕТИНАЛЯ

Беликов Н.Е., Липтев А.В., Земцов Р.В., Лукин А.Ю., Демина О.В.*,
Барачевский В.А.**, Краюшкин М.М.***, Швец В.И., Ходонов А.А.

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

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

**Центр фотохимии РАН, Москва

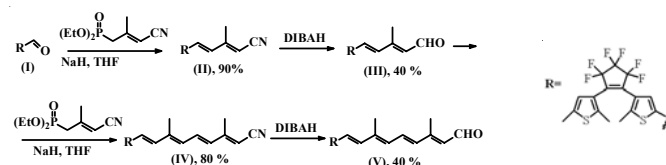
***Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва

E-mail: nbelikov@yandex.ru

Факс: (495) 434-82-33; тел.: (495) 936-88-96

Нами была разработана и предложена эффективная экспериментальная процедура получения целевого фотохромного полиеналя (**V**), аналога фрагмента нативного хромофора бактериородопсина – *all-E*-ретинаяля и содержащего вместо триметилциклогексенового кольца природного хромофора фрагмент 1,2-бис(тиенил)этена.

Ключевой стадией синтеза являлось олефинирование по Хорнеру-Эммонсу C_5 -фосфонатным реагентом карбонильного предшественника (**I**). Полученный промежуточный нитрил (**II**) был восстановлен в альдегид при помощи диизобутиллалюминий гидрида при $-80^\circ C$. Повторение вышеперечисленных стадий олефинирования и восстановления для (**III**, **IV**) позволило получить целевой аналог ретинаяля (**V**) с общим выходом 12%. Вновь образованные $C=C$ -связи имели *E*-конфигурацию по данным 1H -ЯМР-спектров (J 16.3 Гц). Целевые и промежуточные соединения получены в препаративных количествах, их структуры доказаны набором физико-химических методов анализа.



Были проведены спектрально-кинетические исследования фотохромных свойств полученных соединений [1]. Показано, что все соединения проявляют выраженные фотохромные свойства и являются термически необратимыми. Было установлено, что введение в молекулу полиеновой цепи, сопряжённой с диарилэтенным фрагментом, приводит к bathochromному сдвигу спектра поглощения открытой формы по сравнению с исходным альдегидом (**I**). Для циклических изомеров положение максимума поглощения незначительно зависит от длины цепи сопряжения. Наилучшие кинетические характеристики процесса фотоциклизации, а также низкая степень фотодеградации характерны для нитрила (**II**).

Литература

1. N. Belikov et al. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* 2008. **196**. 262-267.

SYNTHESIS AND SPECTRAL PROPERTIES OF DIARYLETHENE RETINAL ANALOGS

Belikov N.E., Laptev A.V., Zemtsov R.V., Lukin A.Yu., Demina O.V., Barachevsky V.A.**, Krayushkin M.M.***, Shvets V.I., Khodonov A.A.*

M.V. Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow

*N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow

**Photochemistry Center RAS, Moscow

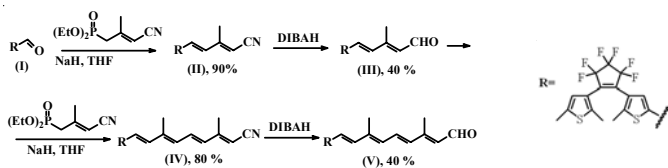
***N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: nbelikov@yandex.ru

Fax: (495) 434-82-33; tel.: (495) 936-88-96

An effective experimental procedure has been developed and proposed for obtaining the target photochromic polyenal (**V**), analog of *all-E*-retinal – native bacteriorhodopsin chromophore fragment, containing 1,2-bis(thienyl)ethene instead of trimethylcyclohexene ring of natural chromophore.

The key step of the synthesis was Horner-Emmons olefination procedure of carbonyl precursor (**I**) with C₅-phosphonate reagent. Resulting intermediate nitrile (**II**) has been reduced into aldehyde with diisobutylaluminium hydride at -80°C. Repeating olefination and reduction steps for (**III**, **IV**) gave target retinal analog (**V**) with overall yield 12%. Newly formed C=C-bonds had *E*-configuration shown by ¹H-NMR spectra (*J* 16.3 Hz). Target and intermediate compounds were obtained in preparative quantities, their structures being confirmed by range of physico-chemical methods of analysis.



Spectral-kinetic studies of obtained substances have been carried out [1]. All the substances have been shown to possess distinct photochromic properties and to be thermally irreversible. It has been found that introduction of polyenic chain, conjugated with diarylethene fragment, into the molecule leads to bathochromic shift of open form absorbance spectrum compared to initial aldehyde (**I**). The position of absorption maximum depends on conjugation chain length slightly for cyclic isomers. The best kinetic properties of photocyclization process as well as low photodegradation degree are typical for nitrile (**II**).

Reference

1. N. Belikov et al. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* 2008. **196**. 262-267.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ РІР-АКВАПОРИНОВ В СТЕРИН-ОБОГАЩЕННЫХ ДОМЕНАХ ПЛАЗМАЛЕММЫ

Белугин Б.В.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва

Электронный адрес: hausen@yandex.ru

Факс: (495) 977-80-18; тел.: (499) 231-83-77

Биологические мембраны содержат качественно разные липиды. Но для выполнения функции гидрофобного барьера и среды для белков такое многообразие избыточно. Не вызывает сомнения, что в мембране существуют области, отличающиеся по составу от остальной части мембраны из-за особенностей физических свойств и биологических функций. На сегодняшний день принято считать, что мембраны являются высокоорганизованными структурами, обеспечивающими необходимую гетерогенность для компартментализации клеточных процессов. Обнаруженные в плазмалемме животных, грибов и растений сфинголипид- и стерин-насыщенные домены, "липидные рафты", обладают плотной упаковкой компонентов и специфическим белковым составом. Метод получения таких доменов для анализа основан на их устойчивости к солюбилизации неионными детергентами. Детергенты избирательно разрушают липид-липидные и липид-белковые взаимодействия, а сохраняющаяся детергент-устойчивая фракция мембран используется в исследованиях. Однако, неизвестно, насколько такие мембраны отражают состав "липидных рафтов" *in vivo*. Одним из характерных белков детергент-устойчивых фракций плазмалеммы клеток растений являются РІР-аквапорины – белки водных каналов. В связи с чем встает вопрос о степени ассоциации РІР-аквапоринов с этими доменами. Задачи данной работы состояли в выделении "рафтов" из плазмалеммы побегов этиолированных проростков гороха, как детергент-устойчивой фракции, и анализе содержания в них РІР-аквапоринов.

Плазмалемму получали разделением микросомальных мембран в двухфазной полимерной системе и часть солюбилизировали на холоду 1%-ным Тритоном Х-100. Далее исходные и солюбилизированные мембраны разделяли на фракции путем флотации в 3-х ступенчатом градиенте плотности OptiPrep. Фракции с плотностью 1.09, 1.14 и 1.17 г/см³ отбирали и анализировали. Обогащение фракций компонентами "рафтов" оценивали по отношению стерин/белок, фазовое состояние липидного бислоя – по спектрам генерализованной поляризации флуоресценции зонда лаурдана, содержание РІР-аквапоринов – методом Вестерн-блот анализа.

После обработки мембран Тритоном Х-100 в отношении детергент : белок ≥ 10 : 1 солюбилизировалась основная часть белка плазмалеммы. Содержание белка в легких детергент-устойчивых фракциях не превышало 10-20%. В контрольных вариантах для плазмалеммы было характерно равномерное распределение по белку во всех фракциях. Показано, что легкие фракции мембран были обогащены стеринами. Отношение в них стерин/белок составляло 0.1 и 0.3 мг стерина/мг белка для контрольной и

солюбилизированной плазмалеммы, соответственно. Во фракциях с высокой плотностью соотношение стерин/белок не превышало 0.05 мг стерина/мг белка как для солюбилизированной, так и контрольной плазмалеммы. Анализ температурной зависимости спектров генерализованной поляризации флуоресценции липофильного зонда лаурдана, встроенного в везикулы плазмалеммы разной плотности, показал, что обогащенные стеринами мембраны характеризуются более плотной упаковкой в них липидных молекул. Иммунодетекция PIP-аквапоринов выявила преимущественное распределение этих белков в детергент-устойчивых мембранах. Однако, во фракциях контрольной плазмалеммы разной плотности распределение аквапоринов было равномерным.

Таким образом, можно полагать, что PIP-аквапорины лишь отчасти являются резидентными белками упорядоченных стерин-обогащенных доменов плазмалеммы, а обработка Тритоном X-100 "стягивает" данные белки в эти структуры.

PIP-AQUAPORIN LOCALIZATION IN STEROL-ENRICHED PLASMA MEMBRANE DOMAINS

Belugin B.V.

Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow

E-mail: hausen@yandex.ru

Fax: (495) 977-80-18, tel.: (499) 231-83-77

Biological membranes are composed of a large variety of lipids. Such diversity is not necessary for the function of hydrophobic barrier and solvent of proteins. It is not questionable in the plasma membrane there are lipid-protein domains differed by their physical properties and biological functions. Today, it is accepted that membranes are highly organized structures providing necessary heterogeneity to compartmentalize cellular processes. Sphingolipid- and sterol-enriched domains, also termed as "lipid rafts", in animal, plant and yeast plasma membrane have a tight lipid packing and specific protein content. A common method to analyze such domains based on a partial resistance to solubilization by non-ionic detergents. Although detergent treatment disrupts lipid-lipid and lipid-protein interactions, the resting fraction of detergent-resistant membranes (DRMs) can be isolated and analyzed. However, it is unknown how well the composition of DRMs reflects the content of intact "lipid rafts" *in vivo*. Among the proteins detected in the detergent-resistant fraction of plant cell membranes it has been found PIP-aquaporins – water channel proteins. Question of PIP-aquaporin lipid-raft association seems to be controversial and remains unclear. The aims of this work were to isolate "rafts" from the plasma membrane of etiolated pea shoots, as detergent-resistant fraction, and to analyze the PIP-aquaporin abundance.

Plasma membrane was prepared from microsomes by an aqueous polymer two-phase partitioning. After treatment with 1% Triton X-100 at 4°C solubilized and resting membranes separated to the three fractions by flotation in the discontinuous OptiPrep density gradient. Fractions with density 1.09, 1.14, 1.17 g/ml were collected and analyzed. "Lipid raft" enrichment was appreciated by sterol/protein ratio, the phase state of lipid bilayer was analyzed by generalized polarization of emission and excitation spectra of Laurdan probe, PIP-aquaporin abundance was assessed using Western blot analysis.

After Triton X-100 treatment with detergent : protein ratio $\geq 10 : 1$ the majority of protein content was solubilized. Protein portion in the low density detergent-resistant fraction was presented no more than 10-20%. For control variant protein distribution was found uniformly in all three fractions. It was shown, that low density fractions were enriched by sterol about 0.1 and 0.3 mg sterol/mg protein in control and solubilized membranes, correspondingly. In high density fractions this ratio did not exceed 0.05 mg sterols to mg protein in both control and treated membranes. Temperature dependence analysis of the fluorescence generalized polarization of dye Laurdan, which was used to label plasma membrane vesicles with different density, revealed that sterol-enriched membranes characterized by tight lipid packaging. Immunolocalization of PIP-aquaporins revealed the preferential distribution of such proteins in detergent-resistant membranes. However, the PIP-abundance was evenly distributed in the different density fractions of resting membranes.

Thereby, it is possible that PIP-aquaporins are partially resident proteins in ordered sterol-rich plasma membrane domains and Triton X-100 treatment promotes the accumulation of such proteins in these structures.

КЛЮЧЕВОЙ ФЕРМЕНТ СТЕРОИДОГЕНЕЗА ЖИВОТНЫХ ФУНКЦИОНИРУЕТ В РАСТЕНИЯХ, ПОВЫШАЯ ИММУНИТЕТ И УСКОРЯЯ ПРОЦЕССЫ РОСТА И РАЗВИТИЯ

Бердичевец И.Н., Спивак С.Г., Картель Н.А.**, Шпаковский Г.В.****

Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН, Москва, Россия

*Институт биоорганической химии НАНБ, Минск, Беларусь

**Институт генетики и цитологии НАНБ, Минск, Беларусь

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

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: i_berdichevets@hotmail.ru

Факс: (499) 132-89-62; тел.: (499) 135-53-62

Долгое время считалось, что стероидные гормональные системы животных и растений принципиально различны. Только в последнее десятилетие стали накапливаться данные об определённой структурной и функциональной консервативности путей регуляции синтеза биологически активных стероидных соединений у этих двух важнейших царств живой природы. Установлено, что основные стадии в процессах биосинтеза и метаболизма стероидных гормонов животных и брассиностероидов растений катализируют цитохромы P450, в обоих системах функционируют такие ферменты, как стероид 5 α -редуктаза (5 α R) и Δ^5 -гидроксистероиддегидрогеназа/ Δ^5 - Δ^4 -кетостероидизомераза (3 β -HSD).

Ключевую роль в биосинтезе стероидных гормонов животных играет цитохром P450_{SCC} (side-chain-cleaving), который локализован во внутренней мембране митохондрий клеток стероидогенных тканей и, с участием двух других компонентов митохондриальной электрон-транспортной цепи, аденодоксина и аденодоксинредуктазы, катализирует реакцию отщепления боковой цепи холестерина с превращением его в прегненолон – общий предшественник всех стероидных гормонов животных. Хотя присутствие митохондриальных цитохромов у растений до сих пор не доказано, известно, что в митохондриях наперстянки *Digitalis sp.* происходит превращение холестерина в прегненолон. Более того, недавно в растениях обнаружен ряд стероидных гормонов животных (прогестерон, 17-гидроксипрогестерон, 16-дегидроксипрогестерон, андростендион), а также гомологи белков-рецепторов, контролирующих транспорт холестерина в митохондрии клеток животных. Следовательно, в растениях возможна трансформация стероидов, подобная таковой у животных.

Это натолкнуло нас на мысль, что эффективная гетерологическая экспрессия гена *CYP11A1*, кодирующего цитохром P450_{SCC} животных, в растениях не только возможна, но и может привести к существенным изменениям в их метаболизме. Для того чтобы проверить указанное предположение, нами впервые получены трансгенные растения табака, эффективно экспрессирующие кДНК *CYP11A1* из коры надпочечников быка (Патент РФ № 2237717 от 10.10.2004). Детальная характеристика четырёх поколений этих трансгенных растений показала, что они по сравнению с

растениями дикого типа имеют сокращенный период вегетативного развития (раннее цветение и созревание семян), увеличенную биомассу и повышенную продуктивность (количество и качество семян). Кроме того, для полученных трансгенных растений характерна более выраженная устойчивость к ряду грибных фитопатогенов.

Наблюдаемый фенотип, по-видимому, объясняется синтезом в трансгенных растениях биологически активных стероидных соединений – производных прегненолона. Действительно, в экстрактах из листьев всех линий трансгенных растений с помощью метода ГХ-МС (газовая хроматография и масс-спектрометрия) нами обнаружен этот прогормон – продукт реакции, катализируемой гетерологичным геном *CYP11A1*. Полученные результаты позволили сделать вывод о том, что в трансгенных растениях табака синтезируется функционально активный цитохром P450_{SCC}.

Дальнейшим продуктом превращения прегненолона у животных является прогестерон, который оказывает гормональное действие и на растения: в научной литературе описана индукция раннего цветения *Arabidopsis thaliana* экзогенным прогестероном. Кроме того, как отмечалось выше, в растениях обнаружен фермент 3 β -HSD, катализирующий превращение прегненолона в прогестерон. Сравнительный анализ показал, что содержание прогестерона в листьях полученных нами трансгенных растений табака, в среднем, на 49 % превышает таковое в листьях контрольных растений. Мы предполагаем, что повышение уровня прогестерона в трансгенных растениях табака обусловлено превращением прегненолона в прогестерон под действием 3 β -HSD.

Поскольку стероидные гормоны растений (брассиностероиды) имеют структурное сходство со стероидными гормонами животных, можно предположить, что гетерологичный цитохром P450_{SCC} включается в метаболизм и этих соединений. Действительно, сравнительный анализ показал, что в семенах четырех независимых генетических линий трансгенных растений содержание 24R-брассиностероидов, в среднем, на 40% ниже, чем в семенах контрольных растений. Это может указывать на возможность прямого действия цитохрома P450_{SCC} на брассиностероиды, поскольку известно, что у ряда растений при метаболизме брассиностероидов происходит отщепление боковой цепи C₂₇-стероидов.

Таким образом, нами впервые продемонстрировано, что отдельные компоненты систем биосинтеза стероидных гормонов животных и растений совместимы друг с другом и могут работать сообща. Применённый нами подход является удобным для детального изучения метаболизма стероидных соединений в растениях, он может быть использован для создания трансгенных растений, интересных с точки зрения практической биотехнологии (картофель, томат, наперстянка) – такие работы нами уже ведутся. Разработанная методология может оказаться полезной для обнаружения митохондриальных цитохромов растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (грант № Б08Р-210) и РФФИ (грант № 08-04-90049).

KEY ENZYME OF ANIMAL STEROIDOGENESIS CAN FUNCTION IN PLANTS IMPROVING THEIR IMMUNITY AND INCREASING THE PROCESSES OF GROWTH AND DEVELOPMENT

Berdichevets I.N., Spivak S.G., Kartel N.A.** , Shpakovski G.V.****

Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia

*Institute of Bioorganic Chemistry, Minsk, Belarus

**Institute of Genetics and Cytology, Minsk, Belarus

***Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

E-mail: i_berdichevets@hotmail.ru

Fax: (499) 132-89-62; tel.: (499) 135-53-62

Over a long period of time it was considered that steroid hormonal systems of plants and animals are principally different. In recent decade the evident proof of structural and functional conservatism of the metabolism and regulation of biologically active steroid compounds in these two main kingdoms of living nature has been found. It has been shown that main stages in the metabolism of animal steroid hormones and plant brassinosteroids are catalyzed by the cytochromes P450 and such enzymes as 5 α -reductase (5 α R) and Δ^5 -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -ketosteroid isomerase (3 β -HSD) are functioning in both animals and plants.

Cytochrome P450_{SCC} (P450 side chain cleavage) is a key enzyme involved in the animal steroid hormone biosynthesis. This protein is localized in mitochondria, and together with the other two components of the mitochondrial electron transfer chain, adrenodoxin reductase and adrenodoxin, it catalyzes the reaction of cholesterol side chain cleavage resulting in formation of pregnenolone, which is a common metabolic precursor of all animal steroid hormones. Though mitochondrial cytochromes have not yet been discovered in plants, it is known that reaction of cholesterol transfer into pregnenolone takes place in mitochondria of foxglove (*Digitalis sp.*). Moreover, a number of animal steroid hormones (progesterone, 17-hydroxyprogesterone, 16-dihydroxyprogesterone, androstenedione) and receptors which mediate mitochondrial cholesterol uptake in animal cells were also recently discovered in plants. Thus, transformation of steroids may take place in plants in a similar way to the cells of steroidogenic tissues of animals.

We assumed that heterologous expression of *CYP11A1* gene encoding animal cytochrome P450_{SCC} is indeed possible and could result in considerable changes in the metabolism of plants. To test this hypothesis we created the transgenic tobacco plants efficiently expressing cDNA of *CYP11A1* gene encoding bovine cytochrome P450_{SCC} (Patent RF 2237717. 2004 Oct. 10).

We performed the detailed phenotypic characterization of plants obtained and have shown that the transgenic tobacco plants have reduced period of vegetative development (early flowering and maturation of bolls), enlarged biomass and increased productivity (quantity and quality of seeds) throughout the four generations studied compared to the empty-vector and wild-type plants. Moreover, they show resistance to some fungal pathogens.

The observed phenotypes are likely determined by the biosynthesis of new biologically active steroid compounds, pregnenolone derivatives. Indeed, pregnenolone, a product of the reaction catalyzed by cytochrome P450_{SCC}, was discovered in the steroid-containing fraction of transgenic plants leaves by the gas chromatography-mass spectrometry method. Based on these observations, we concluded that the recombinant cytochrome P450_{SCC} is synthesized and is functionally active in transgenic tobacco plants.

The product of further metabolic transformation of pregnenolone in animals is progesterone, which is known to have hormonal action in plants. It has been shown that exogenous progesterone induces early flowering in *Arabidopsis thaliana*. Moreover, as mentioned above, the 3 β -HSD enzyme catalyzing the transformation of pregnenolone into progesterone has been recently discovered in plants. In our study we observed about 49% increase in progesterone content in all *CYP11A1* transgenic lines comparing to control lines. We assume that this significant increase of progesterone could be the result of pregnenolone conversion into progesterone mediated by 3 β -HSD enzyme.

As plant steroid hormones, brassinosteroids (BR), have similar structure to the animal steroid hormones, it is reasonable to predict that heterologous cytochrome P450_{SCC} can also participate in the metabolism of BR. Indeed, the comparative analysis revealed that level of BR in the seeds of four transgenic lines was 40% lower than in control ones. This data can be explained by direct action of cytochrome P450_{SCC} on the BR as far as it was previously reported that metabolism of BR in some plants takes place with the side chain cleavage of C₂₇-steroids.

Thus, we have demonstrated that individual components of plant and animal steroid hormone biosynthesis are compatible to each other and can co-function in a model systems. The described approach could be used for the further detailed studies of the metabolism of steroids in plants and also for the creation of new transgenic plants (potato, tomato, foxglove) in the field of practical biotechnology. The creation of such plants is a matter of our present research. This methodological platform can be also of great importance for the detection of mitochondrial cytochromes P450 in plants.

This study was supported by the BRFB (grant № B08P-210) and RFBR (grant № 08-04-90049).

НОВЫЙ БЕЛОК ГАПОНИН В КЛЕТКАХ СНО-К1 ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С GAPDH И ЛОКАЛИЗУЕТСЯ В ЯДРЕ КЛЕТКИ

*Богатова О.В., Ракитина Т.В., Смирнова Е.В., Поздеев В.И.,
Липкин В.М., Костанян И.А.*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и
Ю.А.Овчинникова РАН, Москва
E-mail: bogatova.olga@gmail.com
Факс: (495) 336-61-66; тел.: (495) 330-63-47

В 2007 году в клетках линии HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека нами был обнаружен новый белок, взаимодействующий с поликлональными антителами к одной из форм фактора дифференцировки HLDF. Мы дали этому белку название гапонин (haponin, HLDF-alike protein). Определение частичной аминокислотной последовательности гапонина показало его идентичность с гипотетическим белком человека NP_115701.2, помещённым в коллекцию генов млекопитающих Национального института здоровья США (NIH Mammalian Gene Collection) под номером доступа MGC11102. Позднее на основании предполагаемой структурной гомологии с эукариотическим фактором инициации трансляции 1A, в номенклатуре человеческих генов (HGNC) белку NP_115701.2 было присвоено название eIF1AD (белок, содержащий домен эукариотического фактора инициации трансляции 1A), тогда как название гапонин было принято в качестве альтернативного.

Фактор инициации трансляции eIF1A, участвующий в сборке 43S рибосомного комплекса на иницирующем кодоне мРНК, – это белок, состоящий у человека из 144 а.о., 75 из которых формируют РНК-связывающий домен, консервативный у представителей живого мира от прокариот и архей до млекопитающих. Подобный домен присутствует также в структуре человеческого гапонина и его аналогов из других представителей эукариот. Данные о связи гапонина с рибосомой и процессом трансляции или о наличии у него РНК-связывающей активности на настоящее время отсутствуют. Однако, было показано, что в дрожжевой двухгибридной системе гапонин взаимодействует с транскрипционным фактором STAT1.

С целью функционального изучения гапонина нами была получена экспрессия человеческого гапонина с 6-ти гистидиновым N-концевым тагом в бакуловирусной системе, наработаны поликлональные антитела на рекомбинантный белок и изучена экспрессия эндогенного гапонина в ряде клеточных линий млекопитающих. Клетки яичника китайского хомячка СНО-К1 были выбраны для дальнейшего исследования белка. В тотальном клеточном лизате был проведен поиск потенциальных партнеров гапонина методом соосаждения с рекомбинантным белком. Одним из вероятных партнеров гапонина в клетках СНО-К1 оказалась глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH). Это взаимодействие было подтверждено соосаждением очищенного GAPDH из эритроцитов человека с рекомбинантным гапоном, а также перекрестной иммунопреципитацией эндогенных белков из лизатов клеток культуры СНО-К1.

GAPDH – важнейший фермент гликолиза, однако в течение последних десятилетий было показано, что GAPDH имеет большой набор неканонических функций, в т.ч. он участвует в репликации и репарации ДНК, регуляции транскрипции и трансляции, ядерном экспорте РНК и апоптозе. В клетке GAPDH существует в тетрамерной форме и локализуется, в основном, в цитоплазме, но при проведении апоптотического сигнала или ответе на стресс образуются димерные и мономерные формы белка, которые накапливаются в ядре. Поэтому для дальнейшего изучения взаимодействия гапонина и GAPDH мы решили выяснить клеточную локализацию гапонина.

На основе линии СНО-К1 были выведены стабильные клоны, экспрессирующие GFP и слитный белок GFP-гапонин, и проведён их сравнительный анализ. Методом конфокальной микроскопии было показано, что GFP равномерно распределяется между цитоплазмой и ядром клетки, в то время как GFP-гапонин накапливается в ядре; кроме того, сверхэкспрессия GFP-гапонина вызывала заметное замедление пролиферации клеток по сравнению с исходной линией и клетками, экспрессирующими GFP.

Данная работа выполняется при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 08-04-01127-а) и программы Президиума Российской академии наук "Молекулярная и клеточная биология".

NEW PROTEIN HAPONIN IN CHO-K1 INTERACTING WITH GAPDH IS LOCALIZED IN CELL NUCLEUS

Bogatova O.V., Rakitina T.V., Smirnova E.V., Pozdeev V.I., Lipkin V.M., Kostanyan I.A.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: bogatova.olga@gmail.com

Fax: (495) 336-61-66; tel.: (495) 330-63-47

In 2007, when studying differentiation factor of promyelocytic leukemia HL-60 HLDF, we found new protein showed immunoreactivity with polyclonal antibodies recognizing one of the isoforms of this factor. We recommended naming this protein haponin (HLDF-alike protein). Identification of the partial amino acid sequence of the protein revealed its identity with the human hypothetical protein NP_115701.2, dumped into NIH Mammalian Gene Collection as the MGC11102. Later, for its structural homology, it was named eIF1AD (eukaryotic initiation factor 1a domain containing protein), as haponin was accepted by NCBI as an alias.

Translation initiation factor eIF1a participating in the assembling of 43S ribosome complex on the mRNA initiation codone consists of 144 aa in human, 75 of which forms RNA-binding domain conserved among all living matter from prokaryotes and arches to mammals. The same domain is found in the human haponin as well as its analogues of eukaryotes. However, there are no data on the relation between haponin and ribosome and translation to the moment. The only experimental data on the role of this protein in cell demonstrate it to interact with transcription factor STAT1 in yeast two-hybrid assay.

To study protein functioning, firstly we obtained expression of human haponin with N-terminal 6-His tag in baculoviral system, then polyclonal antibodies recognized recombinant protein were gained and expression of native haponin in the panel of mammalian cell lines was studied. For the further studies on the protein, chinese hamster ovary cells CHO-K1 were selected. Total cell lysates were searched for the potential haponin partners that pull down recombinant protein. One of the probable interacting partners is glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The interaction was proved by pull-down assay with purified GAPDH from human erythrocytes and, as well, cross-immunoprecipitation of native proteins from CHO-K1 cells.

GAPDH is a key enzyme in glycolysis, though it has a number of non-canonical functions showed in a past few decades, e.g., participation in transcription regulation, nuclear export of RNA, DNA replication and reparation, apoptosis, etc. GAPDH is also known to take part in redox-regulation of a number of transcription and translation factors, GAPDH antibodies inhibit protein translation. In cell, GAPDH is tetrameric and localized mainly in the cytoplasm, but, when driving apoptosis signal or stress response, dimeric or monomeric forms arises that accumulate in the nucleus. So, for the further studies on haponin and GAPDH we decide to study cell localization of haponin.

On the basis of CHO-K1 line, we developed stable clones expressing GFP and fusion protein GFP-Haponin and undertake their comparative analysis. It was

demonstrated by confocal microscopy that GFP is distributed uniformly between cell cytoplasm and nucleus, while GFP-Haponin accumulates in the nucleus; in addition, overexpression of GFP-Haponin induces significantly delayed cell proliferation as compared with the parent line CHO-K1 or its derivative expressing GFP.

This work is financially supported by the Russian Foundation for Basic Research grant № 08-04-01127-a and Presidium of the Russian Academy of Sciences (Molecular and Cell Biology Program).

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ГЕНЕРАЦИЮ ЭДС В МИКРОБНОМ БИОТОПЛИВНОМ ЭЛЕМЕНТЕ

Воеводская О.А., Нгуен В.Т., Алферов С.В.

Тульский государственный университет, Тула

Электронный адрес: chem@tsu.tula.ru

Факс: (4872) 33-13-05; тел.: (4872) 35-18-40

Одним из возможных путей решения сложившихся энергетических и экологических проблем является разработка альтернативных источников электрической энергии – биотопливных элементов (БТЭ). Основной проблемой, препятствующей коммерциализации и распространению БТЭ, является их низкая производительность. Важным фактором, влияющим на работу микробных БТЭ, является температура. Анализ литературных данных показал, что вопросы температурной зависимости работы микробных биотопливных элементов освещены слабо, в связи с чем исследования по изучению влияния температуры на работу БТЭ являются актуальными.

Целью данной работы было получение термодинамических и кинетических характеристик микробного биотопливного элемента на основе бактерий *Gluconobacter oxydans* sb.sp. *industrius* (ВКМ В-1280) и медиатора 2,6-дихлорфенолиндофенола на основании изучения влияния температуры на генерацию потенциала.

Для определения термодинамических параметров процесса генерации потенциала (температурного коэффициента ЭДС, изменения свободной энергии Гиббса, энтропии, энтальпии) и константы равновесия в модели микробного БТЭ на основе бактерий *Gl. oxydans* и медиатора электронного транспорта 2,6-дихлорфенолиндофенола, была изучена зависимость генерируемой ЭДС от температуры в диапазоне от 283 до 313 К.

Эта зависимость имела вид кривой с максимумом в области 104 мВ. Для определения температурного коэффициента ЭДС dE/dT использовали тангенс угла наклона линейного участка зависимости ЭДС от температуры. Исходя из температурного коэффициента ЭДС, были получены термодинамические функции (изменение свободной энергии Гиббса, энтропия, энтальпия) и константа равновесия процесса генерации ЭДС для исследуемого БТЭ. Для изучаемой системы "бактериальные клетки *Gl. oxydans* – медиатор 2,6-дихлорфенолиндофенол" не удалось обнаружить надежные литературные данные, подтверждающие перенос одного или двух электронов молекулами медиатора. Поэтому значения термодинамических функций рассчитывались как с участием одного, так и двух электронов.

Для одного электрона:

$$\Delta G^0 = -9,6 \pm 0,8 \text{ кДж} \quad \Delta S^0 = 22 \pm 6 \text{ Дж/К} \quad \Delta H^0 = -3 \pm 1 \text{ кДж} \quad K_a = 50 \pm 12$$

Для двух электронов:

$$\Delta G^0 = -20 \pm 2 \text{ кДж} \quad \Delta S^0 = 44 \pm 11 \text{ Дж/К} \quad \Delta H^0 = -6 \pm 3 \text{ кДж} \quad K_a = 2400 \pm 1600$$

Для определения кинетической характеристики – энергии активации процесса генерации потенциала в исследуемой модели микробного БТЭ – была изучена зависимость времени генерации максимальной ЭДС от температуры в кювете. Данная зависимость имеет вид гиперболы.

Установлено, что при увеличении температуры значительно сокращается время генерации максимального значения потенциала. Используя метод равных выходов, был построен график в координатах $\ln 1/\tau$ ($1/RT$). Тангенс угла наклона прямой соответствует $-E_a$. Таким образом, рассчитанная энергия активации составила 67 ± 4 кДж/моль. Математическую обработку результатов проводили с помощью компьютерной программы SigmaPlot 10. Следует отметить, что определенная таким образом энергия активации является эффективной, т.е. включает в себя энергии активации всех отдельных стадий процесса: 1 – диффузия глюкозы к активному центру фермента в мембране клетки; 2 – химическая реакция – трансформация глюкозы до глюконолактона под действием фермента глюкозодегидрогеназы; 3 – передача электрона на кофактор PQQ фермента глюкозодегидрогеназы; 4 – передача электрона от кофактора PQQ на медиатор; 5 – транспорт медиатора от активного центра фермента до электрода; 6 – передача электрона от медиатора на электрод и регенерация медиатора.

Стадия ферментативной трансформации глюкозы до глюконолактона (2) и стадии передачи электронов (3,4,6) протекают быстро и не оказывают заметного влияния на общую скорость процесса генерации потенциала в БТЭ. Вероятнее всего, лимитирующими являются стадии, связанные с диффузией глюкозы к активному центру фермента и медиатора к электроду в растворе.

Выводы:

Впервые изучено влияние температуры на генерацию ЭДС в биотопливном элементе на основе клеток *Gl. oxydans* и медиатора 2,6-дихлорфенолиндофенола. При повышении температуры от 293 до 308 К наблюдалось возрастание ЭДС генерируемой БТЭ на 10%, при 313 К – резкое падение ЭДС, связанное, по-видимому, с инактивацией фермента.

Получены данные по термодинамическим функциям (изменение свободной энергии Гиббса, энтропия, энтальпия), константе равновесия и энергии активации процесса генерации ЭДС для исследуемой модели БТЭ.

Работа выполнена в рамках ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" (2009-2013 гг.), госконтракт № 02.740.11.0296.

TEMPERATURE EFFECT ON THE EMF GENERATION IN THE MICROBIAL FUEL CELL

Voevodskaya O.A., Nguen V.T., Alferov S.V.

Tula State University, Tula

E-mail: chem@tsu.tula.ru

Fax: (4872) 33-13-05; tel.: (4872) 35-18-40

One of the possible ways for solving ecological and energy problems is the development of the alternative power sources devices – biofuel cells (BFC). The main problem which is hampers the commercialization and wide distribution of BFC is the low performance. One of the important factors which are influence the BFC performance is the temperature. Analysis of the literature displayed that the questions of the temperature dependence of BFC is poor studied, so the investigation of the temperature affect of the biofuel cells performance is the actual task.

The goal of this work was to obtain the thermodynamic and kinetic characteristics of the microbial biofuel cell based on the bacteria *Gluconobacter oxydans* sb.sp. *industrius* (VKM B-1280) and mediator 2,6-dichlorophenol indophenol (2,6-DCPIP) studying the temperature affect on the generation of the potential.

For determination of the thermodynamic parameters of the potential generation process (electromotive force (EMF) temperature coefficient, Gibbs free energy, entropy and enthalpy) and equilibrium constant the dependence of generated EMF from the temperature in the range from 283 to 313 K have been studied in the model of microbial BFC based on the *Gl. oxydans* cells and electron-transport mediator 2,6-dichlorophenol indophenol.

The curve of the temperature dependence of the generated EMF had maximum in the range of 104 mV. For determination of EMF temperature coefficient dE/dT the slope of the linear section of the temperature dependence of generated EMF in the range from 283 to 308 K have been used. On the basis of EMF temperature coefficient the thermodynamic functions (Gibbs free energy, entropy and enthalpy) and equilibrium constant of the potential generation process in the current microbial BFC have been calculated. For the system containing *Gl. oxydans* cells and electron-transport mediator 2,6-dichlorophenol indophenol we have not been able to find any reliable information confirming the transportation one or two electrons by the mediator molecules. So the values of the thermodynamic functions have been calculated with both one and two electron transfer.

For one electron transfer:

$$\Delta G^{\circ} = -9,6 \pm 0,8 \text{ кДж} \quad \Delta S^{\circ} = 22 \pm 6 \text{ Дж/К} \quad \Delta H^{\circ} = -3 \pm 1 \text{ кДж} \quad K_a = 50 \pm 12$$

For two electron transfer:

$$\Delta G^{\circ} = -20 \pm 2 \text{ кДж} \quad \Delta S^{\circ} = 44 \pm 11 \text{ Дж/К} \quad \Delta H^{\circ} = -6 \pm 3 \text{ кДж} \quad K_a = 2400 \pm 1600$$

For determination of the kinetic characteristic – activation energy of the potential generation process in the microbial BFC under study the dependence of the maximum EMF generation time from the electrochemical cell temperature have been studied. This dependence was of the hyperbola form.

It was established that the increasing of temperature considerably decrease the time for maximum potential generation. Using the equal-outlet method the graph in the coordinates $\ln 1/\tau$ ($1/RT$) has been plot. Slope of the graph corresponds to $-E_a$. So the calculated activation energy was 67 ± 4 kJ/mol. Mathematical treatment of the obtained data have been carried out with SigmaPlot 10. It should be mentioned that the activation energy determined in such way is the effective, i.e. it includes the activation energy of the each particular stage of the process: 1 – glucose diffusion to the active site of the enzyme in the cell membrane; 2 – chemical reaction – enzyme transformation of the glucose to gluconolactone with glucosedehydrohenase; 3 – electron transfer to PQQ of glucosedehydrohenase; 4 – electron transfer from PQQ to the mediator 2,6-DCPIP; 5 – mediator diffusion from the active site of the enzyme to the electrode; 6 – electron transfer from the mediator to electrode and regeneration of mediator.

Stage of the enzyme transformation of the glucose to gluconolactone (2) and stages of electron transfer (3,4,6) run fast, and don't considerably effect the overall speed of the potential generation process in BFC. Most probably the limitation stages are connected with diffusion of the glucose to the active site of the enzyme and with the diffusion of the mediator 2,6-DCPIP to the electrode in the solution.

Conclusions:

The temperature affect on the EMF generation in the microbial biofuel cell based on the bacteria *Gl. oxydans* sb.sp. *industrius* (VKM B-1280) and mediator 2,6-dichlorophenol indophenol have been studied for the first time. The rise of the temperature from 293 to 308 K leads to the increasing on 10% in generated EMF. Under the 313 K it was registered the sharp decrease in EMF, which is probably connected with temperature inactivation of the enzyme.

It was obtained the thermodynamic parameters (EMF temperature coefficient, Gibbs free energy, entropy and enthalpy), equilibrium constant and activation energy of the potential generation process in the model of microbial BFC under investigation.

The current study was carried out with grant support from government contract № 02.740.11.0296.

НОВЫЙ МЕХАНИЗМ АКТИВАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ПРИ ПОМОЩИ СУПЕРКОМПЛЕКСА BTFLy, ОБЪЕДИНЯЮЩЕГО КОАКТИВАТОРЫ TFIIID И BRAHMA

Воробыева Н.Е., Шидловский Ю.В., Георгиева С.Г.

Институт биологии гена, Москва

E-mail: nvorobyova@gmail.com

Факс: (499) 135-41-05; тел.: (499) 135-97-31

Физиологическое состояние клетки определяется внешними и внутренними сигналами. В большинстве случаев конечной точкой действия этих сигналов является изменение уровня транскрипции гена. Для поддержания активированной транскрипции требуется воздействие различных коактиваторных комплексов, которые привлекаются ген-специфическими активаторами. Одной из основных задач коактиваторов является ремоделирование и модификация хроматина. Для множества генов, транскрибируемых РНК-полимеразой II, такую функцию выполняет хроматин ремоделирующий комплекс Brahma. Другим важным свойством коактиваторов является привлечение на промотор общих факторов транскрипции (GTFs), которые формируют преинициаторный комплекс. Для большинства генов РНК-полимеразы II таким коактиватором является общий фактор транскрипции TFIIID.

Процесс привлечения коактиваторных комплексов на промотор до сих пор остается не до конца изученным. Самой популярной является модель последовательного привлечения коактиваторов при инициации транскрипции гена. Она подтверждается данными о том, что обычно привлечение хроматин ремоделирующих комплексов предшествует появлению общих факторов транскрипции на промоторе. По другой модели в процессе активации транскрипции коактиваторы привлекают совместно в составе уже предварительно сформировавшихся суперкомплексов.

В настоящей работе охарактеризован новый суперкомплекс BTFLy (Brahma and TFIIID in one assembly) [1-2]. Он включает в себя коактиваторные комплексы TFIIID и Brahma, соединенные при помощи белка SAYP. Объединение данных коактиваторов в стабильный суперкомплекс свидетельствует в пользу совместного привлечения их при активации транскрипции.

В данной работе был локализован активаторный домен белка SAYP, им оказался эволюционно консервативный домен SAY. Обнаружено, что способность данного домена активировать транскрипцию зависит от клеточного уровня компонентов комплексов TFIIID и Brahma. С помощью различных методов показано, что домен SAY взаимодействует с этими коактиваторными комплексами. Кроме того, в составе этих комплексов были определены непосредственные партнеры SAYP. Оказалось, что SAY домен взаимодействует одновременно с субъединицей TAF5 комплекса TFIIID и VAP170 компонентом комплекса Brahma, объединяя эти коактиваторные комплексы в единый суперкомплекс BTFLy.

Суперкомплекс BTFLy за счет своих компонентов способен обеспечивать выполнение двух ключевых этапов подготовки промотора для формирования преинициаторного комплекса, а значит и последующей активации транскрипции.

Основой для формирования суперкомплекса служит SAY домен белка SAYP. Он является высококонсервативной областью белка и входит в состав всех гомологов SAYP у различных организмов, в том числе и у человека. Можно предположить, что представленный механизм функционирования коактиватора SAYP будет характерен и для гомологов этого белка.

Литература

- [1] Vorobyeva N.E., Soshnikova N.V., Nikolenko J.V., et al. (2009). Transcription coactivator SAYP combines chromatin remodeler Brahma and transcription initiation factor TFIIID into a single supercomplex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**(27):11049-54.
- [2] Vorobyeva N.E., Soshnikova N.V., Kuzmina J.L., et al. (2009). The novel regulator of metazoan development SAYP organizes a nuclear coactivator supercomplex. *Cell Cycle*. **8**(14):1-5.

NOVEL MECHANISM OF TRANSCRIPTION ACTIVATION BY BTFLy SUPERCOMPLEX COMBINING TFIID AND BRAHMA COACTIVATORS

Vorobyeva N.E., Shidlovskii Yu.V., Georgieva S.G.

Institute of Gene Biology, Moscow

E-mail: nvorobyova@gmail.com

Fax: (499) 135-41-05; tel.: (499) 135-97-31

Fisiological status of living cell is determined by inner and external signals. In most cases the end point of signals action is changes in gene transcription. For maintaining of activated transcription is required an impact of different coactivator complexes, which are recruited by gene-specific activators. One of the main coactivator's goal is to remodel and modify chromatin. For this function for many genes transcribed by RNA-polymerase II is responsible Brahma chromatin remodeling complex. Other important coactivator's ability is to recruit General Transcription Factors (GTFs) to promoter and to form preinitiation complex. For most RNA-polymerase II genes for this activity is responsible general transcription factor TFIID.

Process of recruiting coactivator complexes to promoter is still poorly studied. The most popular the model of transcription initiation suppose one-by-one coactivator recruitment. It is confirmed by the fact that the recruitment of chromatin-remodeling complexes is usually a prerequisite for the efficient recruitment of GTFs to the promoter. In opposite model transcriptional coactivators are recruited in previously organized state, forming supercomplexes.

In this work a novel BTFLy supercomplex (Brahma and TFIID in one assembly) is characterized [1-2]. It includes coactivator complexes TFIID and Brahma, united by the SAYP protein. Integration of such complexes in single supercomplex testifies to the model of combined recruitment of coactivators during transcription activation.

In this work an evolutionary conserved SAY domain was localized as an activation domain of SAYP protein. Revealed, that ability of this domain to activate transcription depends on cellular level of TFIID and Brahma complexes components. Interactions between SAY domain and these coactivator complexes were demonstrated using different techniques. Moreover direct partners of SAYP in composition of these complexes were found. SAY domain simultaneously interact both with TAF5 subunit of TFIID complex and BAP170 component of Brahma complex, combining these coactivators in single supercomplex.

Presented BTFLy supercomplex by the means of its components could provide execution of two key steps of promoter preparation for preinitiation complex formation, therefore for subsequent transcription activation.

SAY domain of SAY protein serve as the basis for BTFLy supercomplex formation. It is an evolutionary conserved region of the protein and is present in sequence of all SAYP homologues in different organisms including human. We supposed, that presented mechanism of coactivator SAYP functioning could be inherent for its homologues.

References

- [1] Vorobyeva N.E., Soshnikova N.V., Nikolenko J.V., et al. (2009). Transcription coactivator SAYP combines chromatin remodeler Brahma and transcription initiation factor TFIID into a single supercomplex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**(27):11049-54.
- [2] Vorobyeva N.E., Soshnikova N.V., Kuzmina J.L., et al. (2009). The novel regulator of metazoan development SAYP organizes a nuclear coactivator supercomplex. *Cell Cycle*. **8**(14):1-5.

УГЛЕВОДСВЯЗЫВАЮЩИЙ ПАТТЕРН КЛЕТОЧНЫХ ГАЛЕКТИНОВ ЧЕЛОВЕКА ТАНДЕМНОГО ТИПА

Вохмянина О.А., Рапопорт Е.М., Пазынина Г.В., Северов В.В., Бовин Н.В.

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

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

E-mail: vokhmyanina.olga@gmail.com

Факс: (495) 330-55-92; тел.: (495) 330-66-83

Введение. Галектины – β -галактозидсвязывающие белки, объединенные в одну группу по гомологии аминокислотной последовательности углеводсвязывающего сайта. Интерес к исследованию галектинов вызван тем, что эти белки вовлечены в многочисленные процессы, связанные с жизнедеятельностью клетки. В зависимости от структурной организации галектины млекопитающих разделяют на три группы: прото-, химерный и тандемный типы. Изучаемые нами галектины – галектины тандемного типа (-4, -6, -8, -9), содержат два гомологичных, но неидентичных по аминокислотной последовательности углеводсвязывающих домена (УСД), соединенных коротким пептидным линкером. С повышенной экспрессией галектина-4 при раке желудка и молочной железы, а галектина-8 при карциноме легкого и простаты связано распространение метастаз и плохой прогноз заболевания; галектин-9, являясь хемоаттрактантом, привлекает эозинофилы в очаг воспаления. Наиболее полная характеристика специфичности галектинов была получена твердофазными методами, методами плазмонного резонанса, поляризации флуоресценции и фронтальной аффинной хроматографии. Основным выводом проведенных исследований является то, что галектины узнают фрагмент Gal β 1-4GlcNAc или Gal β 1-3GlcNAc.

Особый интерес представляет исследование галектинов в составе клеточной мембраны. В этой связи остается невыясненным, насколько адекватно отражают перечисленные выше тест-системы реальную ситуацию, то есть, когда галектин находится на поверхности клетки. Отсутствие данных о специфичности галектинов на клетке мы объясняем отсутствием удобной экспериментальной модели. Галектины не имеют сигнальной N-концевой последовательности; попытки создать стойкие трансфектанты галектинов в большинстве случаев были неудачны: галектины не секретируются из клетки из-за неспособности взаимодействовать с белками-транспортёрами или из-за отсутствия сигнальной N-концевой последовательности в синтезируемом белке.

Цель нашей работы – изучить специфичность тандемных галектинов в составе клеточной мембраны. Галектины нагружали на клетки Raji (которые сами не экспрессируют галектины) и исследовали их взаимодействие с полиакриламидными флуоресцеин-мечеными гликоконъюгатами (Glc-РАА-Fluо) цитофлуориметрией. Данная клеточная модель позволила выявить: 1) наиболее аффинные лиганды галектинов тандемного типа; 2) вклад линкеров, N- и C-УСД в углеводную специфичность; 3) определить, с какими именно гликанами связываются галектины на поверхности клетки.

Результаты. Углеводная специфичность. Специфичность галектинов изучалась с помощью набора гликоконъюгатов Glyc-PAA-fluo, содержащих терминальные фрагменты Gal β 1-4GlcNAc (LN) или Gal β 1-3GalNAc; кроме того, было исследовано взаимодействие галектинов с сульфатированными олигосахаридами с остатками сульфата при O-3 и O-6 галактозы и (или) O-6 N-ацетилглюкозамина.

LN слабо связывается с галектинами, однако с увеличением лактозаминных звеньев в олигосахаридной цепи связывание увеличивается. Так, LN3'LN, т.е. Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc и LN₃, т.е. Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc связываются с галектинами -4, -8, - и -9 в 7 раз сильнее. Так же, как и для галектинов других типов, для связывания принципиально, в каком положении находится терминальный LN-фрагмент по отношению к лактозаминному кору, а именно, галектины-4, -8 и -9 связывались с LN3'(GlcNAc6')LN, но не с его изомером LN6'(GlcNAc3')LN. Агалактоаналог (LN)₃,3',6'LN не связывался с галектинами вовсе. Принципиальным различием галектинов тандемного типа от других галектинов является высокая аффинность к ним дисахарида T_{pp}, т.е. Gal β 1-3GalNAc β , а также сульфатов 3'OSuLe^c и 6OSuLN в клеточной системе. Дисахарид TF, т.е. Gal β 1-3GalNAc α , не проявляет сродства к галектинам тандемного типа, но введение сульфатной группы в положение C-3 остатка Gal (3'OSuTF) на два порядка увеличивает связывание с галектином-8 и -9. В твердофазной системе было показано, что за связывание с сульфатированными лигандами и сиалозидами отвечает C-УСД, а с олиголактозаминами - N-УСД галектинов. Галектины тандемного типа способны узнавать олигосахариды, фукозилированные или терминированные остатками Gal или GalNAc, причем трисахарид H (тип 2), т.е. Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β , проявляет наибольшую аффинность к галектинам, на два порядка превышающую LN₃ и T_{pp}.

Исследование углеводных цепей, с которыми связываются галектины на поверхности клетки. Галектин-8 нагружали на клетки, предварительно обработанные гликозидазами, отщепляющими цепи, терминированные остатками Neu5Ac α и Gal β . Десиалирование с последующим β -дегалактозилацией приводило к уменьшению связывания галектина-8 с клетками. Кроме того, связывание галектина с клетками падало после обработки клеток ингибитором биосинтеза N-гликозилированных цепей. Полученные результаты свидетельствуют о том, что галектины тандемного типа для закрепления на клетке используют β -галактозидтерминированные N-гликаны, которые могут содержать остаток Neu5Ac α -3Gal β .

Вовлеченность галектинов в цис-взаимодействие. На примере галектина-8 было показано, что десиалирование с последующим β -дегалактозилацией клеток, нагруженных галектином, приводит к увеличению связывания LN-пробы с лектином; т.е. галектины тандемного типа могут маскироваться на клетках β -галактозидами, терминированными остатком Neu5Ac α -3Gal β ; маскировка препятствует их взаимодействию с лигандами соседних клеток и обеспечивает регуляцию углеводсвязывающей активности галектина.

Выводы. T_{pp}, 3'OSuLe^c, 6OSuLN, H (тип 2) являются самыми афинными лигандами для галектинов тандемного типа; галектины тандемного типа могут маскироваться на клетке β -галактозид-терминированными гликанами.

CARBOHYDRATE-BINDING PATTERN OF HUMAN TANDEM-REPEAT-TYPE CELLULAR GALECTINS

Vokhmyanina O.A., Rapoport E.M., Pazynina G.V., Severov V.V., Bovin N.V.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: vokhmyanina.olga@gmail.com

Fax: (495) 330-55-92; tel.: (495) 330-66-83

Introduction. Galectins are β -galactoside binding lectins defined by homology in a sequence motif of the carbohydrate-recognition domain (CRD). Galectins can induce numerous processes involved in the regulation of cell activity. According to their structural architecture the galectin family can be divided into a proto-, chimera- and tandem-types. We study carbohydrate specificity of tandem-repeat-type subfamily galectins (-4, -6, -8, -9) that contain two homologous, non-identical on amino acid sequence CRDs (N-CRD and C-CRD) linked by a short peptide. High expression of galectin-4 on stomach and breast carcinoma as well as galectin-8 on lung and prostate carcinoma correlates with metastases spreading and poor prognosis of survival; it was shown that galectin-9 could act as potent eosinophil chemoattractant. The specificity of galectins was studied by solid phase assay, plasmon resonance, fluorescence polarization and frontal affinity chromatography. The main conclusion of these searches was that galectins preferentially bound glycoconjugates terminated by Gal β 1-4GlcNAc or Gal β 1-3GlcNAc. The particular point of interest of researchers is the study of galectins on cell membrane. Regarding to this it is not clear whether the methods mentioned above reflect cell system conditions, namely when galectins are expressed on cell surface. The specificity of galectins in cell composition has not been studied yet. This may be explained by the absence of the convenient experimental model. Because of the absence of N-signal sequence the attempts to obtain stable transfectants of galectins were unsuccessful: galectins were not secreted on the cell surface since they did not interact with protein-transporters or the synthesized protein did not possess N-terminal sequence.

The aim of our work was the study of carbohydrate specificity of tandem-repeat-type cellular galectins. Galectins were loaded on Raji cells (normally galectin free) and probed with multivalent glycoconjugates (Glyc-PAA-fluo) by flow cytometry. This model permits us to identify: 1) affine ligands of tandem type galectins; 2) how linker and N- and C-CRDs affect the carbohydrate specificity; 3) galectin targets on cell surface.

Results. The carbohydrate specificity. The specificity of galectins was studied by means of glycoconjugates containing terminal Gal β 1-4GlcNAc (LN) or Gal β 1-3GalNAc residues; besides interaction of galectins with ligands sulfated on the position O-3 or O-6 of Gal residue or O-6 of GlcNAc residue has been studied.

LN poorly bound to galectins, however binding was increased with the increase of lactosamine units in oligosaccharide chain, namely LN3'LN (i.e. Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc) and LN₃ (i.e. Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc) bound to galectins-4, -8, and -9 seven-fold stronger than LN. As in the case of proto- and chimera galectins the linkage of terminal LN residue to lactosamine core is principal for the tandem galectins, namely,

LN3'(GlcNAc6')LN, but not its isomer LN6'(GlcNAc3')LN bound to galectins-4,-8 and -9. Agalacto analog (LN)₃,3',6'LN did not bind to galectins at all. The principal difference of tandem-type galectins from the others is high affinity of disaccharide T_{ββ} (i.e. Galβ1-3GalNAcβ) and sulfated saccharides 3'OSuLe^c and 6OSuLN to galectins in cellular system. Disaccharide TF (i.e. Galβ1-3GalNAcα) did not bind to tandem-type galectins, but introduction of sulfated group into C-3 of Gal residue (3'OSuTF) increased binding to galectin-8 and-9 two-fold. It was shown by solid-phase assay that C-CRD was responsible for the binding of sulfated and sialylated glycans to tandem galectins whereas N-CRD – for oligolactosamines. Tandem-type galectins can recognize fucosylated or Galα- or GalNAcα-terminated glycans; trisaccharide H (type 2), i.e. Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ was the most potent ligand of tandem type galectins being two orders of magnitude more affine than LN₃ and T_{ββ}.

Study of glycans that utilize galectins for the anchoring on cell surface.

Galectin-8 was loaded on cells pre-incubated with glycosidases removing Neu5Acα and Galβ terminal residues from cell glycans. Desialylation following β-degalactosylation significantly improved the binding of galectin-8 to cells. Besides, galectins did not bind to cells pre-cultured with inhibitors of biosynthesis of N-glycans. The obtained data evidenced on anchoring of tandem-type galectins on cell surface via β-galactoside-terminated N-glycans, which can contain Neu5Acα-3Galβ fragment.

Involvement of galectins in cis-interaction. Desialylation following β-degalactosylation of galectin-8-loaded cells significantly improved the binding of LN to lectin, i.e. tandem-repeat-type galectins can be masked on cell surface by β-galactosides containing Neu5Acα-3Galβ residue; masking prevents less specific interaction with other cells glycans and provides regulation of carbohydrate-binding activity of galectins.

Conclusions: 1) Saccharides T_{ββ}, 3'OSuLe^c, 6OSuLN, H (type 2) are the most potent ligands of tandem-type galectins-4, -8 and -9. 2) Tandem-type galectins can be masked on cell surface by β-galactoside-terminated glycans.

РОЛЬ СТРУКТУРЫ МЕМБРАН ПРИ РАЗВИТИИ ДЕМЕНЦИИ АЛЬЦГЕЙМЕРОВСКОГО ТИПА И ЕЕ ТЕРАПИИ

Герасимов Н.Ю., Голощанов А.Н., Бурлакова Е.Б.

Институт биохимической физики РАН, Москва

E-mail: groshotan@gmail.com

Тел.: (495) 939-71-81

В регуляции многих клеточных систем участвуют мембраны. Функционирование мембран и воздействие на них внешних факторов, таких как патология или биологически активные вещества, приводит к генерализованным структурным переходам, затрагивающим как липидную, так и белковую фазы. Предпосылкой таких переходов является изменение текучести мембран. В результате происходит изменение липид-белковых взаимодействий, активности, специфичности и чувствительности мембранных белков к регуляторным факторам. Многие из этих переходов сопровождаются изменениями параметров перекисидного окисления липидов (ПОЛ) клеточных мембран. Таким образом, структура липидного бислоя играет важную роль в метаболизме клетки. Поэтому целью нашего исследования было изучение изменений структурных характеристик биологических мембран в норме, при патологии и воздействии биологически активных веществ. В качестве показателей структурного состояния мембран изучались вязкостные свойства, содержание малонового диальдегида, как показателя уровня перекисидного окисления липидов, а также гемолиз эритроцитов.

На первом этапе исследовались изменения текучести мембран, выделенных из мозга, а также изменения текучести и параметров ПОЛ эритроцитов мышей с патологией, моделирующей болезнь Альцгеймера (БА), основанной на бульбэктомии (удаление обонятельных луковиц). Модель БА разработана в лаборатории Бобковой Н.В. в ИБК РАН. В ходе работы были выявлены стадийные изменения текучести мембран, выделенных из переднего мозга. На пятый месяц после бульбэктомии наступает период компенсации. У старых животных наблюдается симбатное увеличение вращательной подвижности липидного и белкового зондов относительно нормы, как в микросомах, так и в субмитохондриальной фракции мембран, что говорит о дальнейшем развитии патологии. Полученные результаты коррелируются с данными других лабораторий об изменениях когнитивных функций, содержания β-амилоида, активности ацетилхолинэстеразы и т.д. Подобные стадийные изменения наблюдались и в структуре мембран эритроцитов. Структурное состояние мембран эритроцитов хорошо соотносится со структурой мембран, выделенных из мозга. Следовательно, состояние мембран эритроцитов отражает общее состояние организма.

По данным, полученным в экспериментах с моделью БА, сделано предположение, что подобные изменения структуры мембран могут происходить и при развитии БА у человека. В связи с этим нами изучено структурное состояние мембран эритроцитов 10 пациентов разного пола и возраста с различной степенью тяжести БА. Установлено, что у всех

пациентов с БА повышена текучесть обеих областей мембран эритроцитов, т.е. нарушены связи в системе регуляции ПОЛ клеточных мембран. В работе Бурлаковой Е.Б. предложена мембранная модель памяти, в которой определяющим фактором является структурное состояние мембран. С учетом этой модели можно объяснить нарушения памяти, связанные с развитием БА. Вследствие повышенной лабильности мембран (~ в 2 раза выше нормы) происходит настолько быстрая смена их жидкокристаллической структуры, что приводит к нарушениям не только долговременной, но и кратковременной памяти. Кроме того, изменена и скорость ПОЛ. Нами показано, что не у всех пациентов с БА происходит интенсификация процессов ПОЛ, как считалось ранее. По показателям ПОЛ выделено три группы пациентов. У первой группы повышен уровень ПОЛ. Она характеризуется высоким гемолизом и содержанием МДА как до, так и после инкубации, причем наблюдается повышение уровня гемолиза и количества МДА. У второй и третьей групп происходит угнетение процессов ПОЛ. Вторая группа характеризуется низким гемолизом и отсутствием прироста при инкубации. Соотношение МДА/ПГ было значительно выше единицы. У третьей группы наблюдается высокий механический гемолиз и снижение уровня гемолиза и содержания МДА за время инкубации. Возможно, эти группы находятся на различных стадиях развития БА.

Определенный интерес представляло сопоставление результатов воздействия на текучесть мембран препаратов димебон и NT-1505, синтезированных в ИФАВ РАН Бачуриным С.О. и предложенных для терапии БА, со структурным состоянием мембран при развитии БА. Полученные данные показали, что практически при всех температурах от 283 до 317 К оба препарата увеличивают текучесть как липидной, так и белковой фазы синапсомембранных мембран. Дальнейшее увеличение текучести мембран при БА может привести к разрушению клеток, поэтому следует проявлять осторожность при применении этих препаратов при терапии. Возможно, при совместном использовании данных препаратов с веществами, увеличивающими микровязкость мембран, можно повысить эффективность лечения.

По результатам нашей работы сделан вывод о том, что нарушения в структуре мембран играют важную роль при развитии патологий. Учитывая эти изменения можно глубже понять, как протекает процесс развития патологии на клеточном уровне, оценить состояние здоровья пациентов, а также повысить эффективность терапии.

MEMBRANES STRUCTURE ROLE DURING ALZHEIMER'S-LIKE DEMENTIA PROGRESSION AND THERAPY

Gerasimov N.Yu., Goloshchapov A.N., Burlakova E.B.

Institute of biochemical physics RAS, Moscow

E-mail: groshotan@gmail.com

Tel.: (495) 939-71-81

Membranes take part in various cell systems regulation. Functioning of membranes and external factors influence on them, such as biologically active substances or pathology, lead to generalized structural transitions, affecting both lipid and protein phases. A change of lipid bilayer fluidity is a precondition for such transitions. As a result, lipid-protein interactions and activity, specificity, regulatory factor sensitivity of membrane proteins are changing. Many of these transitions are accompanied by cell membrane lipid peroxidation changes. Thus, a membrane structure plays a significant part in cell metabolism. Therefore, the aim of our research was the study of biological membranes structural characteristic changing in health and none and with biologically active substances influence. Membranes fluidity as the structural characteristic, malonic dialdehyde (MDA) content and hemolysis of erythrocytes as lipid peroxidation (LPO) rate indicator were used.

In the first stage fluidity changing of brain membranes, and membranes fluidity and LPO characteristics changing of erythrocytes of mice with pathology, simulated Alzheimer's disease (AD), and based on olfactory bulb ectomy, was investigated. The AD model was developed at the ICB RAS by Bobkova N.V. The phasic alterations of membranes fluidity, separated from forebrain, have been found out during researches. For the fifth month after bulbectomy compensation period was observed. Microviscosity of lipid and protein phases increased symbately relative to norm in both microsomal and submitochondrial membranes of old mice forebrain. It speaks about the further progression of the pathology. The results are correlated with the data of other laboratories respecting changes of cognitive functions, β -amyloid content, acetylcholinesterase activity etc. Erythrocytes membrane structure changes were similar and also correlated with forebrain membrane structural changes. Consequently, an erythrocytes membrane structure exhibits organism's common state.

Under the data above we supposed that structure of membranes of human with Alzheimer's disease can be change similarly. Accordingly, we have studied erythrocytes membrane structural state from ten different age patients of both sexes with different Alzheimer's disease severity. Both erythrocytes membrane regions (lipid and protein) fluidity increased level, so failures in the system of LPO homeostasis in these membranes, was observed. Burlakova E.B. has proposed the memory model with the membranes structure as the primary factor. Based on this model memory impairments during AD can be explained. As a result of increased membranes lability (~twice above normal) membranes mesomorphic structure is altering insomuch rapidly, that both lasting and recent memory are lost. In addition, LPO parameters are also changed. We have shown that LPO rate is enhanced not for all patients, as considered earlier. Three groups were marked out by LPO

parameters. LPO rate was increased for the first group. It was characterized by enhanced hemolysis and MDA content before and after incubation with increasing both hemolysis and MDA content. For the second and third groups LPO rate was decreased. The second group was characterized by low hemolysis without increment during incubation. Relation of the MDA content to the peroxide hemolysis was significantly higher than one. Enhanced mechanical hemolysis and decreasing of MDA content and hemolysis during incubation period were observed for the third group. Probably, these groups were in a different AD severity.

In addition, it was interesting to compare membranes structural state during AD progression with a fluidity of membranes influenced by substances Dimebone and NT-1505, synthesized by Bachurin S.O. at the IPAC RAS and proposed for AD therapy. Obtained data have shown that both substances increase synaptosomal membranes lipid and protein regions fluidity practically for all temperatures from 273 to 317 K. Further membranes fluidity increasing observed during AD progression can leads to cells breakage, so one should use these substances carefully for Alzheimer's disease therapy. Perhaps, AD treatment will be more effective if NT-1505 and Dimebone will be used with substances, enhancing membranes microviscosity.

In accordance with the results of our research membranes structure disorder was concluded to play a significant part in a pathology progression. Considering these alterations, one can comprehend pathology progression process on cellular level more completely, determine patient's state more properly, and increase therapy efficiency.

СТРУКТУРНАЯ БИОЛОГИЯ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ФРАГМЕНТОВ РЕЦЕПТОРНЫХ ТИРОЗИНКИНАЗ: НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

Гончарук М.В.^{1,2}, Ермолюк Я.С.^{1,3}, Шульга А.А.^{1,4}, Гончарук С.А.^{1,2}, Ткач Е.Н.^{1,4}, Пустовалова Ю.Е.¹, Майзель М.Л.¹, Минеев К.С.¹, Бочаров Э.В.¹, Артеменко Е.О.¹, Соболев А.Г.¹, Арсеньев А.С.¹, Кирпичников М.П.^{1,2}

¹Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

²Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Институт нейрологии Университетского Колледжа Лондона, Лондон, Великобритания

⁴Центр "Биоинженерия" РАН, Москва, Россия

E-mail: ms.goncharuk@gmail.com

Факс: (495) 335-50-33; тел.: (495) 330-74-83-127

Живая клетка – открытая система, которая свободно обменивается с окружающей средой материей, энергией и информацией. Мембранные белки являются посредниками в этом обмене. Поэтому их изучение – структурное и функциональное – очень важно для понимания клеточной биологии на молекулярном уровне. Рецепторные протеинкиназы занимают центральное место в ключевых процессах жизнедеятельности клетки. Дисфункции этих рецепторов приводят ко многим болезням, например, канцерогенезу, остеопорозу, гипертонии, диабету, нарушениям иммунитета и прочим. Современные фармацевтические препараты уже содержат компоненты, воздействующие на рецепторные протеинкиназные системы, однако, детальные механизмы функционирования этих рецепторов еще до конца не известны. Это обусловлено, прежде всего, значительными трудностями, возникающими при получении мембранных белков высокого качества в количестве, достаточном для структурных исследований. В настоящей работе в качестве основных объектов исследования выбраны представители трех семейств рецепторных тирозинкиназ, которые широко распространены в различных тканях человеческого организма: рецепторы эпидермального фактора роста (ErbB1-ErbB4), рецепторы эффинов (EphA1, EphA2) и рецептор фактора роста фибробластов в норме (FGFR3) и патологии (с точечными мутациями G380R и A391E). Гомо- и гетеродимеризация данных рецепторных тирозинкиназ и их мутантных форм по трансмембранному (ТМ) домену непосредственно связаны с онкогенными процессами, а также с различными нарушениями строения скелета человека. В данной работе разработана простая и универсальная технология получения ТМ фрагментов рецепторных тирозинкиназ для их изучения методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР); их встраивания в липидные/детергентные мицеллы и бицеллы и анализа качества полученных комплексов при помощи динамического светорассеяния, кругового дихроизма (КД-) и ЯМР-спектроскопии.

Для высокоуровневой бактериальной экспрессии синтетические гены ТМ участков выбранных рецепторных тирозинкиназ экспрессировали в составе гибрида с тиоредоксином А *E.coli*. Нуклеотидную последовательность каждого пептида собирали из химически синтезированных олигонуклеотидов и подсоединяли к 3'-концу гена тиоредоксина А при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). 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-таг, устраняющий токсичность гибридного белка по отношению к клетке-хозяину. Итоговые гены клонировали в экспрессионный вектор pGEMEX-1 под транскрипционный контроль T7 промотора. Культивирование рекомбинантных штаммов проводили на минимальной солевой среде M9. При необходимости введения изотопных меток ^{15}N - или ^{13}C - использовали $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ или ^{13}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 стадии очистки проводили в присутствии 1% Тритона X-100. Для проведения структурных исследований необходимо удаление детергента, для чего 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 ^{15}N - и ^{15}N -/ ^{13}C -производных составил, в среднем, около 7 мг/л культуры. Идентичность всех очищенных белков соответствующим целевым пептидам подтверждена при помощи масс-спектрометрического анализа и ЯМР-спектроскопии.

Очищенные пептиды встраивали в мицеллы и бицеллы из различных детергентов и липидов и охарактеризовали методами динамического светорассеяния, КД- и ЯМР-спектроскопии. Для пептидов было выбрано оптимальное окружение (мицеллы додецилфосфохолина (ДФХ) или бицеллы димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ)/дигексаноилфосфатидилхолина (ДГФХ), модулирующее мембрану, в котором они находились в составе димеров и принимали преимущественно альфа-спиральную конформацию. Наличие кросс-пиков от всех глицинов в ^{15}N -HSQC-спектре ЯМР, а также относительно небольшая ширина линий подтверждают высокое качество полученных образцов, а также возможность получения структурно-динамической информации о гомо- и гетеродимерных комплексах ТМ пептидов всех трех семейств рецепторных тирозинкиназ методом гетероядерной спектроскопии ЯМР высокого разрешения.

Разработанная стратегия бактериального получения пептидов и их встраивания в мембраноподобное окружение позволила получить первые в мире структуры высокого разрешения ТМ доменов рецепторных протеинкиназ в димерном состоянии (Bocharov et al, 2008, J.Biol.Chem., 6950-6956; Bocharov et al, 2008, J.Biol.Chem., 29385-29395). Настоящая работа позволяет не только получить детальную пространственную информацию о структурно не охарактеризованных димерных комплексах, но и исследовать межмолекулярные белок-белковые и белок-липидные взаимодействия в мембране, значительно улучшить теоретические подходы для предсказания и моделирования функциональной ассоциации и конформационных перестроек ТМ доменов других мембранных белков. Это чрезвычайно важно для решения фундаментальной задачи понимания на молекулярном уровне механизмов функционирования мембранных белков и создания новых биологически активных веществ с заданными свойствами для биотехнологических и фармакологических целей. Ярким примером таких агентов могут являться лекарственные препараты нового поколения, основанные на синтетических пептидах, которые специфически взаимодействуют с ТМ доменами рецепторных тирозинкиназ и регулируют биологическую функцию рецепторов, для воздействия, например, на процессы пролиферации и передачи митогенных сигналов в опухолевых клетках.

STRUCTURAL BIOLOGY OF RECEPTOR TYROSINE KINASES TRANSMEMBRANE FRAGMENTS: NEW INSIGHT INTO MOLECULAR BASIS OF MEMBRANE PROTEINS FUNCTION

Goncharuk M.V.^{1,2}, Ermolyuk Ya.S.^{1,3}, Schulga A.A.^{1,4}, Goncharuk S.A.^{1,2}, Tkach E.N.^{1,4}, Pustovalova Yu.E.¹, Mayzel M.L.¹, Mineev K.S.¹, Bocharov E.V.¹, Artemenko E.O.¹, Sobol A.G.¹, Arseniev A.S.¹, Kirpichnikov M.P.^{1,2}

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

²Biological Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³Institute of Neurology, University College London, London, Great Britain

⁴Bioengineering Center RAS, Moscow

E-mail: ms.goncharuk@gmail.com

Fax: (495) 335-50-33; tel.: (495) 330-74-83-127

The alive cell is an open system which freely exchanges matter, energy and information with an environment. Membrane proteins are intermediaries in this exchange. Therefore their structural and functional study is very important for understanding of cellular biology at a molecular level. 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, osteoporosis, diabetes and other). Considerable part of modern drugs contains components that are directed towards receptor protein kinase systems. However the detailed mechanism of functioning of these receptors has not been completely understood yet. The main reason is the hydrophobic nature of transmembrane (TM) domains leading to certain difficulties during biochemical obtaining of high-quality membrane protein samples in milligram amount for structural analysis. In this study a set of protein tyrosine kinases from three families, widely distributed in the human tissues, was chosen: 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). TM domains of these proteins and their mutants are involved into receptor homo- and heterodimerization and development of different malignant types of human cancer, skeletal disorders, etc. The simple and universal technology of production of TM peptides of receptor tyrosine kinases for structural studies was developed. A method of reconstruction of purified peptides into membrane-mimicking environment was created and quality of the samples was analyzed employing dynamic light scattering, circular dichroism (CD) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy methods.

For high-yield bacterial production of target peptides, thioredoxin A *E.coli* fusion protein system was chosen. Nucleotide sequence encoding each receptor tyrosine kinase TM peptide was obtained by polymerase chain reaction (PCR) using chemically synthesized oligonucleotides and was fused to the 3'-terminus of thioredoxin A gene via PCR. 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 extension 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 gene was expressed in *E. coli* BL21(DE3)pLysS cells using M9 minimal medium. For the production of uniformly ¹⁵N- or ¹⁵N/¹³C-labeled protein samples minimal medium containing ¹⁵NH₄Cl or ¹⁵NH₄Cl/[U-¹³C]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. Hydrolysate 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 ¹⁵N- and ¹⁵N/¹³C- derivatives was about 7 mg/l. Identity and purity of all target peptides were confirmed by gel electrophoreses, mass spectrometry and NMR spectroscopy. Purified proteins were incorporated into lipid or detergent micelles and bicelles. Quality of solubilized samples was characterized employing dynamic light-scattering, CD-, NMR spectroscopy methods. The optimal membrane-mimicking environment (dodecylphosphocholine (DPC) micelles and dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)/dihexanoylphosphatidylcholine (DHPC) lipid bicelles) provided dimeric alpha-helical conformation to the peptides. The high quality of purified protein samples was confirmed by an identification of all cross-peaks from all glycine residues and relatively narrowness of the lines in the ¹⁵N-HSQC spectra making possible to obtain structural and dynamical information about homo- and heterodimers of TM peptides of receptor tyrosine kinases employing heteronuclear high-resolution NMR spectroscopy.

This strategy enabled to determine high resolution structures of TM domains of receptor protein kinases in dimeric state for the first time (Bocharov et al, 2008, J.Biol.Chem., 6950-6956; Bocharov et al, 2008, J.Biol.Chem., 29385-29395). This provides not only detailed spatial information about structurally uncharacterized dimeric complexes, but also about intermolecular protein-protein and protein-lipid interactions within the membrane. This improves theoretical approaches to prediction and modeling of the TM domains functional association and conformational rearrangements. Being extremely important for understanding the fundamental mechanisms of membrane protein functioning at molecular level, TM domains spatial structure development would give a deep insight into the nature of crucial biological processes in the living cell, resulting in an effective and novel drug design for biotechnology and pharmacology purposes.

БАКТЕРИАЛЬНЫЙ СИНТЕЗ, ОЧИСТКА И РЕФОЛДИНГ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

Гончарук С.А.^{1,2}, Ермолюк Я.С.^{1,3}, Шульга А.А.^{1,4}, Тихонов Р.В.¹, Майзель М.Л.¹, Соболев В.А.¹, Бочаров Э.В.¹, Кузьмичев П.К.¹, Чупин В.В.¹, Артеменко Е.О.¹, Арсеньев А.С.¹, Кирпичников М.П.^{1,2}

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

²Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Институт нейрологии Университетского Колледжа Лондона, Лондон, Великобритания

⁴Центр "Биоинженерия" РАН, Москва, Россия

E-mail: ms.goncharuk@gmail.com

Факс: (495) 335-50-33; тел.: (495) 330-74-83-127

Мембранные белки (МБ) составляют более четверти всех белков, кодируемых геномом человека. Они представляют собой существенную часть биологической мембраны и участвуют во многих процессах жизнедеятельности клетки. Именно МБ ответственны за передачу сигналов, производство и преобразование энергии, распознавание и транспорт веществ через мембрану. Дисфункции МБ нередко лежат в основе различных заболеваний. В настоящее время действие приблизительно 50% лекарств направлено именно на МБ. Знание пространственной структуры МБ, а также механизмов их функционирования способствовало бы более глубокому пониманию биологических процессов и заложило бы основу для рационального дизайна лекарственных препаратов. Среди огромного разнообразия данных о пространственной структуре водорастворимых белков в Protein Data Bank данные о МБ составляют лишь 1% от общего количества. Подобная ситуация, главным образом, связана с отсутствием эффективных технологий получения МБ. Если на сегодняшний день рекомбинантные водорастворимые белки можно синтезировать в любых количествах и без особых сложностей, то наработка каждого нового функционально-активного МБ в количествах, достаточных для физико-химических методов исследования, является значимым событием для структурных биологов.

Белки семейства KCNE, длина которых варьируется от 103 до 177 а.о., относятся к классу небольших МБ, содержащих один трансмембранный сегмент. Они взаимодействуют с α -субъединицами потенциал зависимых калиевых каналов и формируют с ними стабильные комплексы. Это приводит к изменению таких свойств каналов, как проводимость, селективность, потенциалы активации, деактивации и инактивации, чувствительность к лекарственным препаратам и др. Разработанные нами протоколы для получения МБ и их изотопно-меченных (¹⁵N-, ¹³C-) производных были успешно апробированы на белках семейства KCNE (KCNE1, dKCNE1 – укороченный вариант KCNE1, KCNE3). Подобрано стабильное окружение, имитирующее биологическую мембрану, пригодное для проведения структурно-функциональных исследований.

Для достижения высокого уровня экспрессии каждого из генов целевых белков собраны 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). Процесс очистки dKCNE1 и KCNE3 включал следующие основные 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. Для проведения структурных исследований необходимо получить правильно сложенный белок. В качестве сред, имитирующих мембранное окружение, использованы различные детергенты и липиды. Оптимальная среда определена на основании данных КД-спектроскопии, динамического светорассеяния и предварительных ЯМР-экспериментов. Показано, что для всех выбранных объектов смесь детергентов додецилфосфохолин/лаурилдиметиламиноксид (в соотношении 9:1) наилучшим образом подходит для дальнейших исследований: образуются небольшие мицеллы (радиус ~2,5 нм), образец монодисперсный, а белок, преимущественно, в альфа-спиральной конформации, что соответствует расчетным данным. Таким образом, полученные результаты открывают дорогу для дальнейших структурно-функциональных исследований.

BACTERIAL SYNTHESIS, PURIFICATION AND REFOLDING OF FULL-LENGTH MEMBRANE PROTEINS

Goncharuk S.A.^{1,2}, Ermolyuk Ya.S.^{1,3}, Schulga A.A.^{1,4}, Tikhonov R.V.¹, Mayzel M.L.¹, Sobol V.A.¹, Bocharov E.V.¹, Kuzmichev P.K.¹, Chupin V.V.¹, Artemenko E.O.¹, Arseniev A.S.¹, Kirpichnikov M.P.^{1,2}

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

²Biological Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³Institute of Neurology, University College London, London, Great Britain

⁴Bioengineering Center RAS, Moscow, Russia

E-mail: ms.goncharuk@gmail.com

Fax: (495) 335-50-33; tel.: (495) 330-74-83-127

Membrane proteins (MPs) represent approximately one-third of the proteins encoded by the human genome, and constitute considerable part of biological membrane. Because of diverse functionality, MPs take a part in the crucial processes of the cell. They participate in signal transmission, matter and energy transfer across the membrane. Many human diseases are connected to the malfunction of MPs. Approximately half of the most common drugs today are directed at MPs. But the rational design of medical treatments can only occur once the 3D-structure and mechanism of MP function are known. To date, only about one percent of all structures deposited in the Protein Data Bank correspond to the MPs. Mainly this is because of an absence of strategies of their effective production. Up to the moment there are lots of well known methods for relatively simple production of large amounts of water-soluble proteins. However to obtain milligram amounts of every new functionally active MP for physical and chemical analysis is very complicated task.

KCNE family members are MPs consisting of 103 to 177 residues, with a single transmembrane domain. These proteins associate with α -subunits of voltage-gated potassium channels to form stable complexes with unique properties. KCNE family members influence the channel gating, ion selectivity, ion flux rate (single channel conductance); significantly affect the pharmacology of the channels. We developed protocols for successive production of full-length KCNE proteins (KCNE1, dKCNE1-truncated KCNE1, KCNE3) and isotope labeled (¹⁵N-, ¹³C-) derivatives. For structural and functional analysis of the purified KCNE proteins, stable membrane-mimicking media were chosen.

To enhance the expression of the KCNE family 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 system was used. In this case fusion protein genetic constructs contained following nucleotide sequences: thioredoxin, His-tag, proteinase 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 powder was obtained via vacuum drying. For structure and functional elucidation it is very important to obtain correctly folded protein. Different lipids and detergents were used to embed purified protein samples. For all target proteins the best membrane-mimicking medium (maximally similar to the native one) was chosen based on the data obtained by circular dichroism (CD-) spectroscopy, dynamic light-scattering and nuclear magnetic resonance spectroscopy. It was shown that a dodecylphosphocholine/lauryltrimethylamine oxide (DPC/LDAO, 9:1) detergent mixture is the optimal medium for structural and functional analysis of KCNE proteins. It provided monodisperse solution with relatively small micelles (radius is about 2.5 nm). In DPC/LDAO the target proteins formed monomers mainly in alpha-helix conformation that correlates well with theoretical data. An identification of cross-peaks from all glycines and relatively narrowness of lines (~20 Hz) in the ¹⁵N-HSQC spectrum confirm high quality of purified protein samples and ability of employment the high-resolution NMR spectroscopy for structural and dynamical investigation of KCNE proteins.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕКТРООПТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ СУСПЕНЗИЙ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI* ПРИ ДЕЙСТВИИ АМПИЦИЛЛИНА

Гулий О.И.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
Саратов

E-mail: gulyiy@ibppm.sgu.ru

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

Изучение адаптации микробов к действию антибиотиков является важной медико-биологической проблемой, поскольку появление резистентных форм микроорганизмов приводит к снижению их терапевтических свойств. В результате воздействия антибиотиков на микробные клетки могут происходить изменения морфологии клеток, деструкция клеточной мембраны, изменения цитоплазматической мембраны и последующие нарушения биохимических процессов в этих клеточных структурах. Это, в свою очередь, может приводить к изменению электрофизических (ЭФ) свойств микробных клеток и, соответственно, к изменению электрооптических (ЭО) характеристик клеточных суспензий, регистрируемых в экспериментах с использованием электроориентации клеток в электрическом поле. По ним можно сделать предварительные заключения о наличии (или отсутствии) устойчивости к данному антибиотику у исследуемых клеток. Проведена оценка влияния β-лактамов антибиотиков на электрооптические свойства клеточной суспензии *E. coli*. Изучались электрофизические свойства микробных клеток чувствительных и резистентных штаммов к ампициллину, а также изменение электрооптических параметров клеточной суспензии при трансфекции ампициллин-чувствительного штамма в антибиотико-резистентный ампициллин-устойчивой фаговой плазмидой. Изменения в электрооптических свойствах суспензий клеток при действии ампициллина значительно отличаются для чувствительных и резистентных штаммов *E. coli*. Показано, что электрооптические свойства микробных суспензий при действии β-лактамов антибиотиков у чувствительных и резистентных штаммов коррелируются с наличием плазмид устойчивости к данным антибиотикам. Изменения в ОС суспензий клеток, чувствительных к антибиотикам штаммов, инкубированных с различными концентрациями антибиотиков, имели место только на первых пяти частотах ориентирующего электрического поля (10-1000 кГц). Показано, что максимальное изменение величины электрооптического сигнала происходит при концентрации ампициллина 50 мкг/мл. Проведены контрольные эксперименты путем стандартного посева на плотные питательные среды.

Таким образом, изменения ОС суспензий при действии ампициллина можно использовать в качестве теста устойчивости к данному антибиотику у исследуемых клеток. Предполагается возможность использования электрофизических методов для изучения механизма воздействия антибиотиков на бактериальные клетки.

ELECTROOPTICAL PARAMETERS OF AMPICILLIN-TREATED *ESCHERICHIA COLI* CELL SUSPENSIONS

Guliy O.I.

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

E-mail: guliy@ibppm.sgu.ru

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

Since the emergence of microorganisms hinders the therapeutic application of antibiotics, investigation of microbial adaptation to antibiotics is an important biomedical problem. In the presence of antibiotics, the morphology of microbial cells may be changed, their cellular membrane disrupted, and their cytoplasmic membrane modified; the biochemical processes occurring in these structures may therefore be impaired. This, in turn, may result in altered electrophysical (EP) characteristics of microbial cells and therefore in altered electrooptical (EO) characteristics of cell suspensions, which can be experimentally detected using the electrical orientation of the cells in an electric field. On the basis of these alterations, one can draw tentative conclusions about the presence or absence of resistance to a given antibiotic in the cells under study.

The study of the effect of β -lactamic antibiotic on the electro-optical properties of *Escherichia coli* cells showed that ampicillin influences on the orientational spectra of the ampicillin-susceptible *E. coli* strains and does not affect the orientational spectra of the ampicillin-resistant strains. The change in the electro-optical signal of the ampicillin-susceptible cells and ampicillin-resistant cells correlate with the presence plasmid-resistance for these antibiotics. Substantial changes in the orientational spectra (OS) of suspensions of cells incubated with various ampicillin concentrations took place only at the first five frequencies of the orienting electric field (10-1000 kHz). The maximal change in the magnitude of the electro-optical signal occurred at 50 $\mu\text{g/ml}$ of ampicillin. Under the action of ampicillin, sensitive and resistant *E. coli* strains gave different EO effects. It follows that the sensitive and resistant *E. coli* strains exhibit different of the EO effect on the action of ampicillin. Control experiments were carried out by standard plating on nutrient media.

The results of this research show that the study of the mechanism of antibiotic action on bacterial cells by using an electro-optical analysis method can be used for development of new antibiotic resistance assay. Thus, the OS changes of suspensions in the presence of antibiotics may be used as a test for microbial resistance to such antibiotics.

МАЖОРНЫЙ БЕЛОК мРНК УВ-1: СТРУКТУРНЫЕ И АССОЦИАТИВНЫЕ СВОЙСТВА

Гурьянов С.Г., Мельник Б.С., Филимонов В.В., Тимченко А.А.,
Кутышненко В.П. *, Овчинников Л.П., Семисотнов Г.В.

Институт белка РАН, Пушкино

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино

E-mail: sergey@vega.protres.ru

Факс: (495) 632-78-71; тел.: (4967) 73-89-41

УВ-1 – это белок с Мм 36 кДа, взаимодействующий с ДНК и РНК и участвующий в регуляции транскрипции и трансляции. Белок состоит из трех доменов: N-концевого Ala/Pro-богатого домена, домена холодого шока и C-концевого домена. УВ-1 способен олигомеризоваться, а также взаимодействовать с множеством молекулярных партнеров. Несмотря на участие УВ-1 во многих клеточных процессах, его структурные и ассоциативные свойства в растворе изучены недостаточно.

В этой работе мы представляем результаты исследований белка УВ-1 на различных структурных уровнях, включая вторичную структуру (протонный магнитный резонанс, ПМР, и круговой дихроизм в дальней ультрафиолетовой области), компактность (малоугловое рентгеновское рассеяние, МРР), жесткость третичной структуры (ПМР и дифференциальная сканирующая микрокалориметрия), а также межмолекулярную ассоциацию (ПМР, МРР и эксклюзионная хроматография). Нами показано, что вторичная структура УВ-1, в основном, представлена polyPro(II)-подобными спиральями. Данные МРР говорят о том, что молекулы УВ-1 находятся в составе растворимых ассоциатов и довольно компактны, но не глобулярны. Согласно данным ПМР и дифференциальной сканирующей микрокалориметрии лишь небольшая часть белковой молекулы плотно упакована. Эта часть претерпевает кооперативный переход как при повышении температуры, так и при ее понижении. По-видимому, ассоциация белка УВ-1 очень динамична и зависит от концентрации белка, ионной силы и величины рН раствора, причем за ассоциацию отвечает C-концевой домен. Модель структуры белка УВ-1 можно представить в виде плотно упакованного домена холодого шока, к которому примыкают неплотно упакованные N- и C-концевые домены со структурой polyPro(II)-подобной спирали.

Авторы благодарны профессору К. Кихаре и профессору К. Кимуре за помощь в сборе и интерпретации данных МРР.

Работа поддержана грантами по программе РАН "Молекулярная и клеточная биология" и по Программе поддержки научных школ.

MAJOR mRNP PROTEIN YB-1: STRUCTURAL AND ASSOCIATION PROPERTIES

Guryanov S.G., Melnik B.S., Filimonov V.V., Timchenko A.A., Kutysenko V.P., Ovchinnikov L.P., Semisotnov G.V.*

Institute of Protein Research RAS, Pushchino

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino

E-mail: sergey@vega.protres.ru

Fax: (495) 632-78-71; tel.: (496) 773-89-41

YB-1 is a multifunctional 36 kDa protein interacting with both DNA and RNA and participating in transcription and translation regulation. The protein consists of three domains: the N-terminal Ala/Pro-rich domain, the cold shock domain, and the C-terminal domain. YB-1 is capable of oligomerizing and interacting with a number of molecular partners. In spite of YB-1 involvement in many cellular processes, its structural and association properties in solution are poorly understood.

Here we report the results of our studies of different YB-1 structural levels including its secondary structure (¹H-NMR and far UV-CD), compactness (small angle X-ray scattering), rigidity of its tertiary structure (¹H-NMR and differential scanning calorimetry), as well as intermolecular association (¹H-NMR, small angle X-ray scattering and size-exclusion chromatography). It was shown that the secondary structure of YB-1 mainly consists of polyPro(II)-like helices and a small part of β-structure that is presumably related to the cold shock domain. Small angle X-ray scattering data suggest that YB-1 molecules within soluble associates are rather compact but not globular. Only a small part of the protein molecule is rigidly packed, according to ¹H-NMR and differential scanning calorimetry data. This rigidly packed part undergoes cooperative transition upon both temperature decrease and increase. It seems that protein associates are highly dynamic and dependent on protein concentration, ionic strength and pH value, with C-terminal domain being responsible for association. A model of the YB-1 structure in solution may be represented as the rigid cold shock domain flanked by non-rigidly packed polyPro(II)-like helices of N- and C-terminal domains.

The authors are indebted to Prof. K. Kihara and Prof. K. Kimura for their assistance in collection and interpretation of small angle X-ray scattering data.

This research was supported by grants from Russian Academy of Sciences (Program on "Molecular and cellular biology") and from Russian Program for Scientific Schools.

РОЛЬ МУТАЦИЙ В ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ОНКОГЕНА *LMP1* ВИРУСА ЭПШТЕЙНА-БАРР

Дидук С.В., Смирнова К.В.

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

E-mail: diduksv@rambler.ru

Факс: (495) 324-12-05; тел.: (495) 323-57-55

Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) широко распространен в человеческой популяции, им инфицировано более чем 90% населения мира. Убедительно доказана связь ВЭБ с рядом онкологических заболеваний человека и, в первую очередь, с лимфомой Беркита и недифференцированным раком носоглотки. Известно, что ключевую роль в патогенезе ВЭБ-ассоциированных заболеваний играет онкоген этого вируса – *LMP1*. Продуктом этого гена является одноименный интегральный мембранный белок с молекулярной массой 63 кДа, состоящий из 386 аминокислотных остатков. В его состав входят шесть трансмембранных доменов и два цитоплазматических: короткий N-терминальный и длинный C-терминальный домены. C-Терминальный цитоплазматический домен *LMP1* содержит две трансактивирующие области (STAR1 и STAR2), которые ответственны за активацию целого каскада сигнальных путей клетки, в первую очередь NF-κB, PI3K-Akt, SAPK/JNK и p38. Уникальной особенностью *LMP1* является его ярко выраженный полиморфизм. Различные варианты ВЭБ, имеющие специфические мутационные перестройки в *LMP1*, персистируют в географически ограниченных регионах. Часто с наличием определенных мутаций в последовательности *LMP1* связывают увеличение агрессивности отдельных его вариантов и как следствие увеличение уровня ВЭБ-ассоциированных заболеваний как, например, недифференцированного рака носоглотки в странах Юго-Восточной Азии. В связи с этим целью нашей работы стало изучение влияния ряда часто встречающихся мутаций белка *LMP1* на его функциональные свойства. Выбранными мутациями стали замена глицина на серин в 212 положении (G212S), серина на треонин в 366 положении (S366T) и треонина на аланин в 350 положении (T350A), а также их сочетания (G212S/T350A, G212S/S366T, G212S/T350A/S366T, Triple).

Ранее показано, что эти мутации приводят к нарушению двух сайтов убиквитин-протеосомальной системы (β-TrCP/HOS), локализованных в STAR-доменах белка *LMP1*, что усиливает трансформирующую активность *LMP1 in vitro*. В нашем исследовании удалось выявить, что только при наличии двойных и тройной мутаций, приводящих к нарушению обоих HOS-мотивов в STAR1 и STAR2 областях *LMP1*, происходит увеличение активации транскрипционного фактора NF-κB. Обнаружено, что экспрессия исследуемых мутантных вариантов *LMP1* приводит к активации протеинкиназы-B (PKB-Akt). Кроме того, установлено, что исследуемые мутации не влияют на уровень активации транскрипционного фактора AP-1. Используя методику прижизненной окраски активных структур клетки, мы не обнаружили влияния мутаций в HOS-мотивах молекулы *LMP1* на

изменения актиновых филаментов и паксиллина в трансформированных клетках. Анализ внутриклеточной генерации NO выявил снижение уровня NO в фибробластах Rat-1, трансдуцированных вариантами LMP1-Cao и LMP1-Triple, что может способствовать выживаемости и усилению туморогенных свойств трансформированных ими клеток. Показано, что синтез NO в клетках, экспрессирующих различные мутантные варианты LMP1, происходит за счет активации iNOS.

Далее, учитывая полученные нами результаты, а также полное отсутствие информации о штаммовых различиях вариантов LMP1 ВЭБ, персистирующих в России, интерес представляло выявить частоту встречаемости данных мутаций в российской популяции ВЭБ у больных ВЭБ-ассоциированными лимфопролиферативными патологиями, а также провести функциональный анализ выявленных вариантов LMP1. С этой целью мы провели секвенирование вариантов LMP1, изолированных из тканей российских больных ВЭБ-ассоциированными заболеваниями: инфекционным мононуклеозом (ИМ), лимфомой Ходжкина (ЛХ) и неходжкинскими лимфомами (НХЛ). На основании филогенетического анализа полученных полноразмерных последовательностей LMP1 удалось выявить преобладание монофилетической группы, относящейся к низкодивергентному штамму LMP1-B95.8b (более 51%). Варианты, относящиеся к доминирующей группе, характеризовались минимальным набором мутаций, при этом из трех исследуемых нами мутаций обнаружена только замена S366T. Впервые выполненный функциональный анализ низкодивергентных вариантов LMP1 показал сходство биологических свойств, несмотря на их различное клиническое происхождение: от больных злокачественными (ЛХ, НЛХ) и доброкачественными (ИМ) патологиями. Выявлен невысокий уровень активации транскрипционного фактора NF-κB исследуемыми вариантами в эмбриональных клетках почки человека HEK293. Активацию транскрипционного фактора AP-1 нам обнаружить не удалось. Анализ морфологии полученных клеточных линий Rat-1, постоянно экспрессирующих низкодивергентные варианты LMP1 российского происхождения, показал их способность к ингибированию контактного торможения и формированию колоний при росте без подложки. Кроме того, все исследуемые варианты LMP1 в клетках Rat-1 вызывали активацию индуцибельной NO-синтазы (iNOS), приводящую к продукции в клетках окиси азота (NO), уровень накопления которой оказался незначительно ниже такового, вызванного прототипным вариантом LMP1-B95.8. Таким образом, мы выявили, что сочетание трех мутаций в белке LMP1 (G212S/T350A/S366T) играет ключевую роль в модуляции сигнальной активности клетки, при этом не влияя на структурные компоненты ее цитоскелета. Проведенный структурно-функциональный анализ вариантов LMP1 от российских больных позволил нам выявить мутации, преобладающие в вариантах LMP1 ВЭБ, персистирующих в России. Мы полагаем, что отсутствие в российских вариантах LMP1 замен в G212S и T350A является определяющим фактором в понижении сигнальной активности при их экспрессии в клетках.

Работа поддержана грантом РФФИ № 07-04-00604-а.

ROLE MUTATIONS OF EPSTEIN-BARR VIRUS ONCOGENE LMP1 IN ITS FUNCTIONAL ACTIVITY

Diduk S.V., Smirnova K.V.

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

E-mail: diduksv@rambler.ru

Fax: (495) 324-12-05; tel.: (495) 323-57-55

Epstein-Barr virus (EBV) is prevalent human virus infected over 90% of the world's population. There is satisfactory evidence its association with some human oncological diseases, in the first instance Burkitt's lymphoma and undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. LMP1 oncogene of this virus plays a key role in pathogenesis of EBV-associated diseases. The product encoded by this gene is same name 63-kD integral membrane protein consisting of 386 amino acid residues. This protein includes six transmembrane domains and two cytoplasmic domains: a short N-terminal and a long C-terminal domain. The C-terminal cytoplasmic domain of LMP1 contains two transactivating regions (CTAR1 и CTAR2) which play an important role in activation of cascade of cell signal pathways, primarily NF-κB, PI3K-Akt, SAPK/JNK, and p38. One of unique LMP1 characteristic is its polymorphism. Different EBV variants with specific mutations in LMP1 are persisting in geographically restricted regions. Definite mutations in LMP1 sequence are often associated with increasing of aggressiveness of its distinct variants and increasing the level of EBV-associated diseases for instance undifferentiated nasopharyngeal carcinoma in South-East Asia. Accordingly, the aim of our study was to investigate the influence of commonly occurring LMP1 mutations on its functional potential. Following selected mutations include the replacement of glycine by serine in position 212 (G212S), replacement of serine by threonine in position 366 (S366T), and also replacement of threonine by alanine in position 350 (T350A), and its combinations (G212S/T350A, G212S/S366T, G212S/T350A/S366T, Triple).

Mutations affect two sites of ubiquitin-proteosomal systems (β-TrCP/HOS) which are located in LMP1 CTAR-domains was previously shown to increase transforming activity of LMP1 *in vitro*. Only with present of double and triple affected HOS-motifs mutations both in CTAR1 and CTAR2 were found to increase NF-κB activation. Also expression of studied LMP1 mutated variants induced activation of protein-kinase-B (PKB-Akt). In addition, it was established that LMP1 variants carrying mutations in HOS-motifs did not activate AP1 signaling pathways. We did not find any influence of LMP1 mutations in HOS-motifs on actin filaments and paxillin by method of intravital staining in transformed cells. By analysis of intracellular NO generation it was shown decreasing of NO level in Rat-1 fibroblast transduced by LMP1-Cao и LMP1-Triple variants. This would be contributing to survival and enhancement of transformed cell tumorigenic properties. NO synthesis in cells expressing different LMP1 mutated variants was shown to be by activation of iNOS.

Further, in consideration of obtained data and full absence of information about strain differences of LMP1 EBV variant persistent in Russia our attention was concentrated on frequency of occurrence studied mutations in Russian

population of EBV at patients with EBV-associated lymphoproliferative disorders and to carry out functional analysis of detected LMP1 variants. To this aim the sequencing of LMP1 variants isolated from Russian patients with infectious mononucleosis (IM), Hodgkin's lymphoma (HL), and non-Hodgkin's lymphoma (NHL) have been carried out. Phylogenetic study of obtained sequences revealed dominance of LMP1 variants belonging to proteins of low-divergent group LMP1-B95.8b (more than 51%). These variants are characterized by minimal set of mutations and only replacement S366T from three early studied mutations was detected in this group. For the first time performed functional analysis of low-divergent LMP1 variants elucidated the similarity of biological properties despite the difference of its clinical origin from patients with malignant (HL and NHL) or benign (IM) process. It was shown that expression of studied low-divergent LMP1 variants in embryonic kidney HEK293 cells was accompanied by insignificant increasing in transcriptional factor NF- κ B activation and hadn't influence on activation of transcriptional factor AP-1. Morphology assay of obtained Rat-1 stable cell lines constitutively expressing of low-divergent LMP1 variants was shown its ability to suppression of contact inhibition and colony formation with unsupported growth. Besides, it was detected that all investigated low-divergent LMP1 variants expressing in Rat-1 cells induced activation of inducible NO-synthase (iNOS) and intracellular production of nitrogen oxide (NO). At the same time the level of the accumulation of the latter was lower then one induced by low-transforming prototype variant LMP1-B95.8. In summary we have revealed that combination of tree mutations in LMP1 protein (G212S/T350A/S366T) play a key role at modulation of cell signal activity and have not any influence at structural components of its cytoskeleton. On the base structural-functional analysis of obtained from Russian patients LMP1 variants we have detected mutations dominated in LMP1 EBV variants persisted in Russia. We suppose that absence of replacement G212S and T350A in Russian LMP1 variants is a determinant factor in decreasing of signal activity in cells expressing those LMP1 variants.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (No. 07-04-00604-a).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КАРТИРОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ЛОКУСЕ *FXYD5-COX7A1* ХРОМОСОМЫ 19 ЧЕЛОВЕКА

Дидыч Д.А.

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

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

E-mail: Dmitry_D@inbox.ru

Факс: (495) 330-65-38; тел.: (495) 330-70-29

Цель исследования. После определения нуклеотидной последовательности геномов ряда организмов, одной из главных задач в постгеномную эру стало изучение механизмов регуляции экспрессии генов. Последние данные указывают на то, что транскрибируются не только гены, но и некодирующие последовательности генома. Вся совокупность генов и транскрибируемых областей генома многоклеточных организмов связана в сложнейшую регулируемую сеть, определяющую существование многочисленных типов специализированных клеток. Важнейшую роль в существовании этой регулируемой сети играют различные классы функциональных элементов генома (промоторы, энхансеры, сайленсеры, инсуляторы, MAR/SAR-элементы и др.). К сожалению, на сегодняшний день картирование всех регуляторных элементов на уровне целого генома с учетом всевозможных типов клеток многоклеточных организмов выходит за пределы наших возможностей. Альтернативой данного рода исследованиям служит полный функциональный анализ отдельных протяженных сегментов генома с последующей интеграцией полученных данных и созданием полной геномной карты регуляторных элементов.

В данной работе нами предложен экспериментальный подход, позволяющий идентифицировать потенциальные энхансеры в протяженных фрагментах генома. С помощью данного метода был проведен анализ участка девятнадцатой хромосомы человека длиной 1×10^6 п.о., расположенного между генами *FXYD5* и *COX7A1*.

Активность многих энхансеров *in vivo* может регулироваться инсуляторными последовательностями, обладающими энхансер-блокирующей активностью. Поэтому, для полного понимания функционирования энхансеров необходимо иметь представление о расположении в геноме инсуляторов. С помощью ранее разработанного в нашей лаборатории метода [1], основанного на позитивно-негативной селекции инсуляторных последовательностей, были выявлены в локусе *FXYD5-COX7A1* новые последовательности, проявляющие свойства инсуляторов.

Материалы и методы. Для селекции энхансеров нами был модифицирован самоинактивирующийся ретровирусный вектор pQCXIX путем замены области, содержащей промотор цитомегаловируса и IRES-последовательность, на ген неомифосфотрансферазы II под контролем минимального промотора цитомегаловируса. Процедура селекции основана на способности энхансеров активировать минимальный промотор гена

селективного маркера. Фрагменты библиотеки исследуемого локуса были клонированы в модифицированный ретровирусный вектор. Получен набор ретровирусных частиц, которым инфицировали клетки линии HeLa. В результате селекции были отобраны неомицин-устойчивые клетки, содержащие конструкции с потенциальными энхансерами. Фрагменты библиотеки, амплифицированные с геномной ДНК неомицин-устойчивых клеток с помощью ПЦР, были клонированы и секвенированы.

Для селекции потенциальных инсуляторов нами использован метод, основанный на позитивно-негативной селекции и способности инсуляторов защищать репортерный ген от воздействия энхансера, предложенный в работе [1].

Результаты. Идентифицировано 15 потенциальных энхансеров в локусе *FXVD5-COX7A1* хромосомы 19 человека. Энхансерная активность 13 обнаруженных последовательностей была подтверждена с помощью системы двойной люциферазной детекции в экспериментах по транзientным трансфекциям клеток HeLa. Методом сдвига электрофоретической подвижности ДНК-белковых комплексов (EMSA) показана способность обнаруженных фрагментов взаимодействовать с белками ядерного экстракта из клеток HeLa.

С помощью ранее разработанного в нашей лаборатории метода, основанного на позитивно-негативной селекции инсуляторных последовательностей, выявлено десять новых последовательностей в локусе *FXVD5-COX7A1* хромосомы 19 человека, проявляющих свойства инсуляторов.

Заключение. Таким образом, предложен новый экспериментальный подход для прямого отбора, идентификации и картирования потенциальных энхансеров внутри длинных геномных последовательностей. Метод позволяет одновременно находить и клонировать большое число энхансерных элементов.

Была составлена геномная карта расположения обнаруженных в работе потенциальных регуляторных элементов в локусе *FXVD5-COX7A1* хромосомы 19 человека. Обнаруженные потенциальные энхансеры располагаются преимущественно с 5'-сторон от генов либо в интронах. Взаимное расположение обнаруженных инсуляторов и генов согласуется с гипотезой, согласно которой инсуляторы подразделяют геномную ДНК на независимо регулируемые петлевые домены.

Литература

[1] Akopov S.B., Ruda V.M., Batrak V.V., et al. (2006) *Mamm. Genome*, **17**, 1042-1049.

IDENTIFICATION AND MAPPING OF REGULATORY ELEMENTS WITHIN *FXVD5-COX7A1* LOCUS ON HUMAN CHROMOSOME 19

Didych D.A.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: Dmitry_D@inbox.ru

Fax: (495) 330-65-38; tel.: (495) 330-70-29

The aim of the research. As the nucleotide sequence has been established for several genomes, the main objective of postgenomic research is to study the regulatory mechanisms of gene expression. Recent data suggest that not only genes are transcribed but a far greater portion of the genome. The total set of genes and transcribed genome regions forms an intricate regulatory network, which determines the formation of many specialized cells in multicellular organisms. The different classes of *cis*-regulatory elements (promoters, enhancers, silencers, insulators, scaffold/matrix attachment regions, etc.) play a major role in supporting this network.

Unfortunately, nowadays the mapping of all regulatory elements at the level of whole genome is not possible. Therefore, the alternative way of such a research is to carry out the functional analysis of long fragments of the genome with subsequent integration of the received data and creation of the complete map of regulatory elements of the genome.

Here we propose a straightforward method for identification of potential enhancers within long genomic sequences. Using this method, we have analyzed 1-Mb *FXVD5-COX7A1* region of human chromosome 19.

The enhancers can be regulated *in vivo* by insulators which exhibit enhancer-blocking activity. Hence, for detailed understanding of enhancers role in the genome it is needed to know the localization of insulators. Using a previously developed in our group method [1] based on the positive-negative selection of insulator sequences we revealed new potential insulators in 1-Mb *FXVD5-COX7A1* region of human chromosome 19.

Materials and methods. For selection of enhancers, we have modified the self-inactivating retroviral vector pQCXIX by substituting the CMV promoter and IRES with a cassette containing the neomycin phosphotransferase II (*NPTII*) gene under control of a CMV minimal promoter. The selection procedure is based on the ability of enhancers to activate a minimal promoter that drives expression of a selective gene. To this end a mixture of short DNA fragments derived from the segment of interest was cloned in modified retroviral vector. The pool of retroviruses obtained was used to infect HeLa cells and then to select neomycin-resistant colonies containing constructs with enhancer-like sequences. The pool of the genomic fragments was rescued by PCR and cloned, forming a library of the potential enhancers that were sequenced.

For selection of potential insulators, we used a method based on protection of the reporter gene promoter against the effect of enhancer and positive-negative selection as described in [1].

Results. Fifteen potential enhancers were identified within *FXVD5-COX7A1* region of human chromosome 19. The enhancer activity of 13 of them was verified in a transient transfection reporter gene assay. Using electrophoretic mobility shift

assay (EMSA) we showed the ability of identified enhancers to bind HeLa nuclear extract proteins.

Using a method based on the positive-negative selection of insulator sequences [1] we revealed 10 new potential insulators in *FXVD5-COX7A1* region of human chromosome 19.

Conclusions. We report a new experimental method of direct selection, identification, and mapping of potential enhancer sequences within extended stretches of genomic DNA. The method allows simultaneous cloning of a quantity of sequences instead of tedious screening of the separate ones, thus providing a robust and high-throughput approach to the mapping of enhancers.

All identified in this work potential regulatory sequences were mapped on chromosome 19 between genes *FXVD5* and *COX7A1*. The enhancer-like sequences were found to be predominantly located near 5'-regions of genes or within gene introns. Relative positions of insulators and genes are in accord with the hypothesis that insulators subdivide genomic DNA into independently regulated loop domains.

Reference

[1] Akopov S.B., Ruda V.M., Batrak V.V., et al. (2006) *Mamm. Genome*, **17**, 1042-1049.

ВЫЯСНЕНИЕ МЕХАНИЗМА ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ БЕЛКА STELLATE В СЕМЕННИКАХ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Егорова К.С., Кибанов М.В., Оленкина О.М., Гвоздев В.А., Оленина Л.В.

Институт молекулярной генетики РАН, Москва

E-mail: danamad@gmail.com

Факс: (499) 196-02-21; тел.: (499) 196-08-09

Расположенные в X-хромосоме тандемные кластеры семенник-специфичных генов *Stellate* контролируют сперматогенез у *Drosophila melanogaster*. Гены *Stellate* кодируют белок, гомологичный регуляторной β -субъединице протеинкиназы CK2 (CK2 β), и не экспрессируются у самцов дикого типа. В отсутствие Y-хромосомы или сцепленного с ней локуса *Su(Ste)* (*Suppressor of Stellate*) происходит дерепрессия генов *Stellate*, приводящая к накоплению в семенниках игло- или звездчатообразных белковых кристаллов, а также к нарушению сегрегации хромосом в мейозе и к частичной либо полной стерильности (Livak, 1984; Bozzetti et al., 1995). В норме экспрессия генов *Stellate* подавлена при помощи коротких РНК, обеспечиваемых антисмысловой транскрипцией высокомолекулярного локуса *Su(Ste)*, по механизму pi-РНК-сайленсинга (Aravin et al., 2001; Vagin et al., 2006). Механизм патогенеза, вызываемого гиперэкспрессией *Stellate*, до сих пор не выяснен.

Чтобы понять причины наблюдаемых аномалий сперматогенеза при гиперэкспрессии *Stellate*, мы получили высокоспецифичные антитела к белку *Stellate* и изучили его субклеточную локализацию методами биохимического фракционирования и иммуноокрашивания целых семенников. Мы показали, что, помимо ранее известного накопления белка *Stellate* в кристаллической форме, преимущественно в цитоплазме, он также присутствует в растворимой форме исключительно в нуклеоплазме сперматоцитов. Эксперименты по ко-иммунопреципитации выявили, что растворимый ядерный *Stellate* взаимодействует с каталитической α -субъединицей CK2 (CK2 α) *in vivo*. Мы также показали, что дерепрессия *Stellate* в семенниках приводит к модуляциям в фосфорилировании ядерных белков по остаткам серина.

Согласно нашим иммунохимическим и масс-спектрометрическим данным, и растворимая, и кристаллическая формы эндогенного *Stellate* триметилированы по остатку лизина K92. Интересно, что *Stellate*K92me3 специфически узнается антителами к триметилированному остатку лизина K9 гистона H3 (H3K9me3), что свидетельствует о структурной мимикрии эпигенетической модификации H3K9me3. Выравнивание последовательностей *Stellate* и других субъединиц CK2 β , в том числе и предполагаемого предшественника *Stellate*, β CK2tes (Kalmykova et al., 1997), выявило, что мотив для метилирования по остатку лизина возник и эволюционно закрепился только в *Stellate*. Мы показали, что у мух, гетерозиготных по мутации в гене гистонметилтрансферазы dSETDB1, но не *Su(Var)3-9*, вследствие кодминантности аллелей, наблюдается воспроизводимое снижение метилирования *Stellate*. Известно, что dSETDB1

присутствует как в ядре, так и в цитоплазме (Yoon et al., 2008), что согласуется с нашими данными по метилированию как ядерной, так и цитоплазматической популяций *Stellate*.

Эпигенетическая модификация H3K9me3 узнается белком HP1, несущим хромодомен и ответственным за формирование участков транскрипционно репрессированного гетерохроматина (Fishle et al., 2005; Kouzarides, 2007). Мы предположили, что триметилированный *Stellate* также способен привлекать к себе HP1 или другие хромодомен-содержащие белки. Анализируя результаты химического кросс-линкинга целых ядер, мы детектировали ковалентно сшитый комплекс с Мм около 65 кДа, содержащий как *Stellate*, так и HP1, но отсутствующий в семенниках мух дикого типа. Полученные нами предварительные данные по хроматин-иммунопреципитации семенников (X-ChIP) показали обогащение HP1 в прицентромерном гетерохроматине при дерепрессии *Stellate*, по сравнению с семенниками мух дикого типа. Формирование гетерохроматина в прицентромерных районах необходимо для корректного образования кинетохора и последующей сегрегации хромосом при клеточном делении (Kellum and Alberts, 1995; Ekwall et al., 1996; Pidoux and Allshire, 2005). Как недостаточность, так и гиперэкспрессия HP1 приводят к нарушениям в компактизации прицентромерного гетерохроматина и аномалиям в центромерной когезии и сегрегации хромосом (Inoue et al., 2008).

Наши результаты позволяют предложить модель патогенетического действия *Stellate* в семенниках *D. melanogaster*. HP1 в норме является мишенью фосфорилирования, осуществляемого CK2, которое важно для связывания части ядерного пула HP1 с гетерохроматиновыми локусами, в том числе с прицентромерным (Eissenberg et al., 1994; Zhao et al., 1999 and 2001; Shimada et al., 2009). Мы полагаем, что *Stellate* в ядрах сперматоцитов выполняет функцию регуляторной β -субъединицы CK2, эффективно привлекая HP1 при помощи триметиллизиновой метки к гетеротетрамерному комплексу CK2 и способствуя гиперфосфорилированию HP1. Избыток фосфорилированного HP1, в свою очередь, вызывает гиперконденсацию прицентромерного гетерохроматина, что может служить причиной мейотических нарушений и некорректного сперматогенеза у *D. melanogaster* при дерепрессии *Stellate*.

В ближайшем будущем для подтверждения нашей модели мы планируем изучить влияние дерепрессии *Stellate* на уровень фосфорилирования HP1, а также проследить изменение транскрипции уникальных генов, расположенных в прицентромерном хроматине.

Литература

1. Egorova K.S., Olenkina O.N., Kibanov M.V., et al. (2009). *J. Mol. Biol.*, **389**, 895-906.

REVEALING THE MECHANISM OF PATHOGENETIC ACTION OF STELLATE PROTEIN IN TESTES OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Egorova K.S., Kibanov M.V., Olenkina O.N., Gvozdev V.A., Olenina L.V.

Institute of Molecular Genetics RAS

E-mail: danamad@gmail.com

Fax: (499) 196-02-21; tel.: (499) 196-08-09

The X-chromosome-linked clusters of the tandemly repeated testis-specific *Stellate* genes control spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Stellate* genes encode protein homologous to the regulatory β -subunit of the protein kinase CK2 (CK2 β) and are repressed in wild-type males. In the absence of the Y chromosome or Y-linked *Su(Ste)* locus (*Suppressor of Stellate*), derepression of *Stellate* genes lead to accumulation of needle- or stellate-shaped crystals in testes and also to abnormalities in chromosome segregation and partial or complete male sterility (Livak, 1984; Bozzetti et al., 1995). Normally, the expression of *Stellate* genes are suppressed by short RNAs provided by anti-sense transcription of the highly homologous *Su(Ste)* locus, via piRNA-silencing mechanism (Aravin et al., 2001; Vagin et al., 2006). However, the mechanism of *Stellate*-induced pathogenesis has been unclear until now.

To understand causes of the observed abnormalities in spermatogenesis consequently to the hyper-expression of *Stellate*, we raised high-avid anti-*Stellate* antibodies and studied the subcellular localization of *Stellate* protein using methods of biochemical fractionation and whole-mount testis immunostaining. We showed, that, along with the known accumulation of crystal *Stellate* protein detected mainly in the cytoplasm, there was also soluble *Stellate* located exclusively in the nucleoplasm of spermatocytes. The co-immunoprecipitation experiments revealed that the soluble nuclear *Stellate* interacted with the catalytic α -subunit of CK2 (CK2 α) *in vivo*. We also showed that derepression of *Stellate* in testes led to modulations in phosphorylation of nuclear proteins on serine residues.

According to our immunochemical and mass-spectrometric data, both soluble and crystal forms of the endogenous *Stellate* are trimethylated on lysine residue, K92. It should be noted that *Stellate*K92me3 is specifically recognized by anti-H3K9me3 (trimethylated K9 lysine residue of histone H3) antibodies. This observation supposes the structural mimicry of the epigenetic H3K9me3 modification. The sequence alignment of *Stellate* and CK2 β subunits, including the supposed predecessor of *Stellate*, β CK2tes (Kalmykova et al., 1997), revealed that the motif for methylation on lysine residue has emerged and been evolutionally fixed only in *Stellate*. We showed that in the flies heterozygous on histone methyltransferase dSETDB1, but not *Su(var)3-9*, due to the allele codominance, there was the reproducible decrease in the *Stellate* methylation. It was shown earlier that dSETDB1 presented both in the nucleus and cytoplasm (Yoon et al., 2008), which correlates with our data on methylation of both nuclear and cytoplasmic populations of *Stellate*.

The epigenetic H3K9me3 modification is recognized by HP1 protein bearing chromodomain and being responsible for the formation of regions of

transcriptionally repressed heterochromatin (Fishle et al., 2005; Kouzarides, 2007). We suggested that trimethylated *Stellate* also could attract HP1 or other chromodomain-containing proteins. By analyzing the results of chemical cross-linking of the whole nuclei, we detected the covalently linked complex about 65 kDa containing both *Stellate* and HP1 proteins, but absent in the testes from the wild-type flies. The preliminary data from chromatin immunoprecipitation in testes (X-ChIP) showed the enrichment of HP1 in the pericentromeric heterochromatin against the background of *Stellate* derepression, as compared with the wild-type flies. The correct heterochromatin formation in the pericentromeric regions is necessary for the forming of cohesin complexes and following chromosome segregation during cell division (Kellum and Alberts, 1995; Ekwall et al., 1996; Pidoux and Allshire, 2005). Both hypo- and hyperexpression of HP1 lead to disturbances in compacting of pericentromeric heterochromatin and abnormalities in centromeric cohesion and segregation of chromosomes (Inoue et al., 2008).

So far, our results allow to develop a model of pathogenic action of the soluble *Stellate* in testes of *D. melanogaster*. It was shown that HP1 normally was a target of multiple phosphorylation conducted by CK2, and that abnormalities in this phosphorylation led to the disturbances in HP1 binding to the heterochromatic loci, including pericentromeric one (Eissenberg et al., 1994; Zhao et al., 1999 and 2001; Shimada et al., 2009). We suggest that *Stellate*, simultaneously interacting with CK2 α and HP1, functions as a regulatory β -subunit of CK2, attracting HP1 via trimethyllysine mark to heterotetrameric complex CK2 and thus promoting its hyper-phosphorylation in the nuclei of spermatocytes. This, in turn, may promote the hyper-condensation of the pericentromeric heterochromatin which leads to the meiotic disturbances and incorrect spermatogenesis in *D. melanogaster*.

In the nearest future, to prove our model, we will measure the degree of HP1 phosphorylation against the background of *Stellate* derepression, and also estimate changes in the levels of transcription of the unique genes located in the pericentromeric heterochromatin.

Reference

1. Egorova K.S., Olenkina O.N., Kibanov M.V., et al. (2009). *J. Mol. Biol.*, **389**, 895-906.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ПЕРЕСТРОЙКИ У ТЕРМОФИЛЬНЫХ СУЛЬФОБАЦИЛЛ, ИНДУЦИРУЕМЫЕ РАЗЛИЧНЫМИ ФАКТОРАМИ

Журавлева А.Е., Цаплина И.А., Каравайко Г.И.

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва

E-mail: zhuravleva-inmi@mail.ru

Факс: (499) 135-65-30; тел.: (499) 135-03-20

Хемолитотрофные термоацидофильные бактерии рода *Sulfobacillus* – универсальная группа организмов, способных в аэробных условиях к окислению Fe(II), восстановленным соединений серы, сульфидных минералов и органических веществ, в условиях гипоксии – к окислению серосодержащих и органических субстратов с сопряжением восстановления Fe(III). Разнообразие типов метаболизма и устойчивость к экстремальным воздействиям позволяют сульфобациллам занимать экологические ниши, различающиеся составом/соотношением субстратов и физико-химическими характеристиками, а также с успехом использоваться в биогеотехнологии металлов.

Показано, что одной из стратегий выживания умеренно термофильных и термотолерантных штаммов сульфобацилл в экстремальных условиях является изменение физиологического состояния организмов – приобретение стрессоустойчивости. Последнее сопровождается не только изменением процессов энергетического и конструктивного метаболизма (времени генерации, клеточного урожая, спектра/активности карбоксилирующих ферментов, переключения (торможения) путей центрального метаболизма углерода, функционирования дополнительных электроннотранспортных цепей (ЭТЦ) (Журавлева, 2009; Кондратьева и др., 2009)), но и изменением морфогенетических программ с образованием различных клеточных морфотипов. Для *S. thermotolerans*, *S. thermosulfidooxidans*, *S. sibiricus* установлены факторы, влияющие на переключение указанных программ: экстремально высокие концентрации H^+ , SO_4^{2-} , CO_2 , защелачивание жидкой фазы пульпы, неоптимальные ростовые температуры, лимитирование клеточных процессов недостатком O_2 , концентрацией пула АТФ, факторов роста.

Для бактерий рода *Sulfobacillus* показана высокая пластичность их метаболизма, направленная на приобретение устойчивости к стрессовым воздействиям. На примере *S. thermotolerans* Kг1 было продемонстрировано, что такой фактор, как температура, близкая к предельной для роста, вызывал увеличение времени генерации в несколько раз и утрату одного из трех путей катаболизма углеводов – окислительного пентозофосфатного. Однако жизнедеятельность и окислительная способность сульфобацилл сохранялись, что обеспечивалось ферментными системами двух других путей – Эмбдена-Мейергофа-Парнаса и Энтнера-Дудорова. Оптимальный миксотрофный тип питания у сульфобацилл обеспечивает максимальный уровень пула АТФ в клетках и выживание бактерий при многократных пересевах, тогда как лимитирование процессов низким уровнем пула АТФ при неоптимальных

литоавто- и органогетеротрофном типах питания коррелируется с прекращением роста вегетативных клеток бактерий после нескольких пассажей. Данные о синтезе АТФ, ингибиторного анализа и определения скорости дыхания клеток сульфобацилл свидетельствуют о том, что при окислительном фосфорилировании источником энергии и донором электронов для ЭТЦ могут служить органические и неорганические вещества, а также их смеси в зависимости от таких факторов, как доступность субстрата, рН, концентрация O_2 в среде и др. В аэробных условиях при окислении клетками Fe(II) показано функционирование разветвленной ЭТЦ. Одним из факторов, влияющих на состав переносчиков транспортной цепи, является концентрация O_2 в среде, которая постепенно снижается с ростом клеточной популяции. В условиях лимитирования роста по кислороду бактерии могут переходить на брожение. При значительном лимитировании клеточных процессов недостатком O_2 (условия гипоксии) сульфобациллы переключаются на использование альтернативного кислороду акцептора электронов – Fe(III).

Важную роль в приобретении клетками устойчивости к экстремальным условиям среды играет формирование новых морфотипов. Уменьшение размеров палочковидных клеток, характерных для бактерий, до мелких или кокковидных наблюдали при переключении метаболизма с окисления Fe(II) на окисление S^0 или сульфидных минералов при длительном культивировании, при рН выше оптимальных, при высоких температурах и концентрациях CO_2 . Переключение миксотрофного типа метаболизма на литоавтотрофный вело вначале к падению скорости роста, клеточного урожая, содержания АТФ, уменьшению размеров клеток, в конце роста - к появлению нанобактерий, ультрамикробактерий (совместные данные с Сузиной Н.Е., Дудой В.И.). Высокие концентрации H^+ (рН 1.2), Zn^{2+} (0.5-0.8 М) индуцировали образование нитевидных или длинных тонких клеток, цепочек из них. Ионы Sb и As, выщелачиваемые из сульфидных руд, а также лимитирование по кислороду служили толчком для запуска механизмов споруляции или постепенного превращения вегетативных клеток в рефрактерные (одиночные или цепочки), как правило, сохраняющие связь с вегетативными. Уменьшение O_2 в жидкой фазе 11%-ной пульпы при окислении в аэролитном режиме концентрата сульфидных минералов Неждановского месторождения сопровождалось формированием сложных клеточных комплексов, объединенных единым полисахаридным матриксом.

Показанная лабильность путей метаболизма сульфобацилл, индуцируемая различными факторами, может быть использована в биогидрометаллургических технологиях извлечения золота из сульфидных руд. Полученные данные о морфогенезе сульфобацилл служат основой контроля процессов биоокисления золотосодержащих сульфидных руд при оценке физиологического состояния микробной популяции и корректировки технологических режимов в оптимальном направлении с целью возврата к активному исходному фенотипу популяции.

PHENOTYPIC REORGANIZATION INDUCED BY VARIOUS FACTORS IN THERMOPHILIC SULFOBACILLI

Zhuravleva A.E., Tsaplina I.A., Karavaiko G.I.

Winogradsky Institute of Microbiology RAS, Moscow

E-mail: zhuravleva-inmi@mail.ru

Fax: (499) 135-65-30; tel.: (499) 135-03-20

Chemolithotrophic thermoacidophilic bacteria of the genus *Sulfobacillus* form a universal group capable of oxidation of Fe(II), reduced sulfur compounds, sulfide minerals and organic substances under aerobic conditions and are able to oxidize sulfur-containing and organic substrates with Fe(III) reduction coupling during hypoxia. The variety of metabolism types enables sulfobacilli to occupy ecological niches, differing in substrate composition/ ratio and in physicochemical parameters, and to be successfully used in biogeochemistry of metals.

It has been shown, that one of the survival strategies of moderate thermophilic and thermotolerant sulfobacilli strains under extreme conditions is physiological state change - stress stability acquisition. The latter is accompanied not only by constructive and energy metabolism changes (in generation time, cell yield, carboxylase spectrum/activity, by switching (inhibition) of carbon metabolism central pathways, by functioning of additional electron transport chains (Zhuravleva, 2009; Kondrat'eva et al., 2009), but also by formation of diverse cell morphotypes. Factors, that influence the switch of morphogenetic programs, have been established for *S. thermotolerans*, *S. thermosulfidoxidans*, and *S. sibiricus*: extremely high H^+ , SO_4^{2-} , CO_2 concentrations, pulp liquid phase alkalization, non-optimal growth temperatures, limitation of cellular processes by O_2 deficiency, ATP pool and growth factor concentration.

For bacteria of the genus *Sulfobacillus* great metabolism plasticity has been shown, which is directed to acquiring of stability to stress effects. By the example of *S. thermotolerans* such factor as a temperature close to limiting growth temperature has been demonstrated to cause several times higher generation time and the loss of one of three carbon catabolism pathways – oxidative pentose-phosphate pathway. Nevertheless vital functions and oxidative activity of sulfobacilli remained, supplemented by enzyme systems of two other pathways – Embden-Meyerhof-Parnas and Entner-Doudoroff ones. Optimal mixotrophic nutrition type provides maximal ATP pool in cells and bacterial survival during multiple reinoculations, whereas limitation of processes by low ATP level at non-optimal lithoauto- and organoheterotrophic nutrition types correlates with termination of bacterial vegetative cell growth after several passages. The data about ATP synthesis, inhibitory analysis and determination of respiration rate in sulfobacilli cells are evidence that organic substrates, inorganic compounds and their mixtures can serve as sources of energy and electron donors during oxidative phosphorylation, depending on such factors as substrate availability, pH, O_2 medium concentration and others. Under aerobic conditions branch electron transport chain functioning has been shown during Fe(II) oxidation in sulfobacilli cells. One of the factors, which has an influence on composition of electron chain carriers is O_2 concentration, decreasing gradually with cell population growth. Under conditions

of growth limitation by oxygen bacteria can convert to fermentation. At considerable limitation of cell processes by shortage of O₂ (hypoxic conditions) sulfobacilli switch to the use of acceptor, alternative to oxygen, which is Fe(III).

Decrease in size of rod-like cells, typical for bacteria, to tiny or coccus-shaped cells has been observed when switching metabolism of sulfobacilli from Fe²⁺ oxidation to S⁰ or sulfide mineral oxidation during prolonged cultivation, as well as at pH values higher than optimal ones, high temperatures and CO₂ concentrations. Switching from mixotrophic type of metabolism to lithoautotrophic one led to decrease of growth rate, cell yield, ATP content and cell size at first, and at the end of growth it resulted in the appearance of nanoforms, ultramicrobacteria (combined data with Suzina N.E. and Duda V.I.). High H⁺ and Zn²⁺ concentrations (pH 1.2 and 0.5-0.8 M respectively) induced formation of thready or long thin cells and development of cell chains. Sb and As ions, being leached from sulfide ores, as well as O₂ limitation, stimulated sporulation mechanism starting or gradual cell conversion into refractive cells, usually retaining connection with vegetative ones. O₂ decrease in liquid pulp phase during oxidation of sulfide mineral concentrate from Nezhdaninskoe deposit in air lift mode was accompanied by formation of complicated cell complexes, combined by united polysaccharide matrix.

Lability demonstrated for metabolic pathways of sulfobacilli, which is induced by various factors, can be applied in bihydrometallurgy technologies of gold recovery from sulfide ores. Obtained data about sulfobacilli morphogenesis serve as the basis of process control of gold-containing sulfide ore biooxidation, evaluating of physiological microbial population state and technological mode correcting in optimal direction for the purpose of returning to the active initial population phenotype(s).

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРЕКРЕСТНО-СШИТОГО ГИДРОГЕЛЯ

Зараева Г.А.

Тульский государственный университет, Тула

E-mail: jose_mail@mail.ru

Факс: (4872) 33-13-05; тел.: (4872) 20-63-96

Гиалуроновая кислота (ГК) является важным природным защитным и биологически активным веществом. Это один из основных компонентов межклеточного вещества дермы, во многом определяющий структуру, свойства и функционирование кожного покрова. Физико-химические и биологические свойства ГК позволяют использовать ее в различных областях медицины, например хирургии, дерматологии, офтальмологии а также в косметологии и косметической хирургии. Для успешного применения ГК в медицинских и косметических целях весьма существенным является разработка различных способов модификации ее макроструктуры, в частности, организация сшивки макромолекул. Химически модифицированная ГК в организме подвергается деградации с меньшей скоростью, а сшитые молекулы ГК образуют плотные гидрогели, поддерживающие заданный объем и форму. В то же время они сохраняют биосовместимость природной гиалуроновой кислоты. Такие биополимеры могут быть использованы в пластической хирургии для мягкого увеличения тканей, в хирургии в качестве среды для проведения офтальмологических операций. Они могут служить заменителем синовиальной жидкости суставов, средой для сохранения и транспортировки клеток. Пленки, изготовленные на их основе, могут быть использованы в хирургии в качестве раневых и противовоспалительных покрытий. Практическому применению перекрестно-сшитых гидрогелей ГК предшествуют исследования по получению биоматериалов с заданными потребительскими свойствами.

В работе исследованы три способа химической модификации гиалуроновой кислоты с целью получения поперечно-сшитого полимера, способного образовывать плотные гидрогели: химическая модификация дигидразидом с последующей перекрестной сшивкой; перекрестное сшивание дивинилсульфоном; этерификация. Проведены исследования реологических свойств и биологической устойчивости полученных биополимеров. Исходная ГК, использованная для модификации, выделена и очищена на базе ООО НПП "Тульская индустрия ЛТД" из гребней кур.

Гидразид-модифицированный гиалуронат натрия, сшитый диметилсуберимидатом. Химическая модификация проходила в две стадии. На первом этапе использовали карбодимид-опосредованную реакцию взаимодействия карбоксильных групп ГК с дигидразидом адипиновой кислоты. Реакция протекает в водной среде в мягких условиях (комнатная температура, pH 4,75), что позволяет уменьшить деградацию природного полимера. Адипиновый дигидразид использовали как бифункциональный реагент в реакциях нуклеофильного замещения для последующего проведения поперечной сшивки. Степень конверсии карбоксильных групп

оценивали с использованием ^1H -ЯМР в растворе D_2O . Конверсия карбоксильных групп в амидные производные составила 80%, в изоуреидкарбонильные производные – 12%. На второй стадии модификации использовали диметилсуберимидат, как бифункциональный сшивающий агент. При определенных условиях химической модификации удалось получить целевой перекрестно-сшитый полимер ГК, который нерастворим в органических растворителях, а в водных средах набухает, образуя гидрогели.

Гиалуронат натрия, модифицированный дивинилсульфоном.

Модификация ГК дивинилсульфоном является наиболее простой в технологическом плане и экономически выгодна для производства. Реакция основана на перекрестном связывании дивинилсульфоном свободных гидроксильных групп ГК в щелочной среде. В ходе исследований изучено влияние мольного соотношения реагентов на коэффициент набухания перекрестно-сшитого биополимера. Оптимизированы условия проведения реакции, позволяющие получить гидрогели с заданными потребительскими свойствами.

"Внутренние эфиры" гиалуроната натрия.

Синтез "внутренних" эфиров ГК – перспективное направление химической модификации, позволяющее получить производные, в которых отсутствуют дополнительно введенные в структуру "связывающие мостики", являющиеся при попадании в организм своеобразным фактором риска появления аллергических и других негативных реакций организма. Химическую модификацию ГК проводили в неводной среде под действием четвертичных солей – производных пиридина (реактив Мукаемы). Полученные образцы модифицированной ГК в воде ограниченно набухали, образуя прозрачные гидрогели.

Образцы перекрестно-сшитой гиалуроновой кислоты, полученные всеми тремя способами, охарактеризовали с использованием ИК- и ЯМР-спектроскопии. Получены значения динамической вязкости и коэффициентов набухания в воде и изотоническом буферном растворе. Исследована устойчивость полученных образцов модифицированной ГК к действию деградирующего фермента – тестикулярной гиалуронидазы, по сравнению с природной ГК. Все образцы показали повышенную устойчивость к действию фермента.

На основании проведенных исследований выбраны два образца модифицированной ГК, проявляющие необходимые реологические свойства для создания инъекционных препаратов на базе ООО НПП "Тульская индустрия ЛТД".

CHEMICAL MODIFICATION OF HYALURONIC ACID FOR CROSS-LINKED HYDROGELS

Zaraeva G.A.

Tula State University, Tula

E-mail: jose_mail@mail.ru

Fax: (4872) 33-13-05; tel.: (4872) 20-63-96

Hyaluronic acid (HA) is an important natural protective and bio-active substance. This is a major component of the extracellular matrix, largely determines the structure, properties and functioning of the skin. The unique rheological and biological properties of HA indicate the use it in various fields of medicine, such as surgery, dermatology, ophthalmology as well as in cosmetics and cosmetic surgery.

For successful application of HA in the medical and cosmetic purposes it is necessary to research the different ways of the modification its macrostructure, in particular, organization of cross-linked macromolecules. Such macromolecular network could be swollen in water to several times its original volume and could be expected to have superior rheological and viscoelastic properties compared to solutions of native HA. In addition, these derivatives would be expected to show increased resistance to degradation *in vivo* by hyaluronidases. At the same time, they retain the biocompatibility of natural hyaluronic acid. Such biopolymers can be used in plastic surgery as dermal fillers, in ophthalmic procedures for the replacement of the natural vitreous. Its can serve as a replacement for synovial fluid of joints, as well as the matrix for the preservation and transportation of a cells. Films made on their basis, can be used in surgery as a wound-healing and anti-adhesion coatings. Practical application of the cross-cross-linked hydrogels of HA are preceded by research to obtain a biomaterials with a given specifications.

In this study we investigated three methods of chemical modification of hyaluronic acid in order to obtain cross-linked polymer that can form dense hydrogels: chemical modification of hyaluronic acid with dihydrazide followed by cross-linking, cross-linking with divinylsulfone, etherification. Also were investigated the rheological properties and resistance to degradation of the HA hydrogels.

Hydrazide-functionalized hyaluronic acid, cross-linked with dimethyl suberimidate.

Chemical modification was consisted of two stages. In the first stage was used carbodiimide-activated reaction between carboxyl groups of HA and adipic dihydrazide. The reaction proceeds at mild, aqueous conditions (room temperature, pH 4.75), which reduces degradation of the natural polymer. Adipic dihydrazide was used as a bifunctional reagent in the substitution nucleophilic reaction for the further cross-linking. The degree of carboxyl group conversion was evaluated using ^1H NMR in D_2O solution. Conversion of carboxyl groups in the amide derivative was 80%, in *N*-acylurea derivatives was 12%. At the second stage of modification dimethylsuberimidat was used as the bifunctional cross-linking agent. Under certain conditions of chemical modification was received the required cross-linked derivative of HA, which is insoluble in organic solvents but swell in water to form hydrogels.

Hyaluronic acid, cross-linked with divinylsulfone.

Modification of the HA with divinylsulfone is the most technologically simple and economically advantageous. The reaction is based on cross-linking of free hydroxyl groups of HA with divinylsulfone in alkaline medium. The effect of reagent molar ratio on the swelling rate of cross-linked HA was studied. Optimal conditions for the reaction to obtain hydrogels with a given consumer properties were found.

"Internal" esters of hyaluronic acid.

Synthesis of "internal" esters of HA is advanced way of chemical modification. In this derivatives imposed to structure "linking bridges" – risk factor for the appearance of allergic and other adverse reactions of the organism – are absent. Chemical modification of HA proceeds in non-aqueous solvent under the action of quaternary salts – derivatives of pyridine. The obtained samples of the modified HA limited swell in water to form transparent hydrogels.

The samples of cross-linked hyaluronic acid, obtained by all three methods, were characterized by IR and NMR spectroscopy. Values of dynamic viscosity and the swelling ratio in water and isotonic buffer solution obtained. All derivatives showed increased resistance to degradation *in vivo* by hyaluronidases.

Based on the study were selected two samples of the modified HA having appropriate rheological properties for the production of injections at the base of "Tulskaya Industry Ltd".

БИКОНЬЮГАТЫ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК *IN VITRO* И *IN VIVO*

Здобнова Т.А., Балалаева И.В.*, Деев С.М.

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

*Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород

E-mail: t.zdobnova@mail.ru

Факс: (495) 429-88-10; тел.: (495) 330-63-92

Введение. Целью работы было создание специфически связывающихся с опухолевыми клетками флуоресцентных конструкций, применимых для ранней диагностики онкологических заболеваний.

Полупроводниковые нанокристаллы или "квантовые точки" (QD) – флуорофоры, обладающие некоторыми интересными физико-химическими свойствами и перспективные для использования в методах молекулярной диагностики. Для их направленной доставки к определенным мишеням успешно используют антитела.

Получение флуоресцентных комплексов направленного действия. Для связывания QD с антителами была использована система модулей барназа-барстар, описанная нами ранее [1]. Барназа и барстар – небольшие белки бактериального происхождения (12 and 10 кДа), обладающие высоким сродством друг к другу ($K_d \sim 10^{-14}$ М). Конъюгация одного из этих белков с QD, а другого – с различными антителами позволяет создавать флуоресцентные комплексы с разной специфичностью. В этом контексте, модуль барназа-барстар аналогичен стрептавидин-биотиновой системе [2].

Специфичность действия таких комплексов была продемонстрирована на примере клеток, гиперэкспрессирующих на своей поверхности онкомаркер HER2/neu. В качестве направляющего агента был использован рекомбинантный белок, состоящий из анти-HER2/neu мини-антитела 4D5 scFv и барназы. Ранее нами было показано, что такие молекулы эффективно связываются с внешним доменом HER2/neu [1,3,4]. Квантовые точки с максимумом флуоресценции в ближней инфракрасной области спектра (Invitrogen) были конъюгированы с барстаром с использованием EDC в качестве сшивающего реагента. Было показано, что барстар и нанокристаллы сохранили свои физико-химические свойства и активность после конъюгации. Полученные конъюгаты образовывали самособирающиеся комплексы с рекомбинантным белком 4D5scFv-барназа.

Визуализация *in vitro*. Полученные флуоресцентные конструкции [4D5 scFv-барназа-барстар-QD] эффективно окрашивали поверхность клеток карциномы молочной железы человека SKBR-3, гиперэкспрессирующих рецептор HER2/neu. После инкубации этих же клеток с конъюгатами QD-барстар характерное свечение на поверхности клеток было на уровне шума или отсутствовало. Только небольшой сигнал или его отсутствие, свидетельствующие о специфичности действия полученной системы, наблюдались после инкубации HER2/neu-отрицательных клеток CHO с направленными комплексами [4D5 scFv-барназа-барстар-QD].

Визуализация *in vivo*. Для исследования возможности визуализации опухолей с помощью полученных направленных комплексов в организме *in vivo* были использованы иммунодефицитные мыши линии nu/nu. Мыши с модельной опухолью молочной железы человека были получены после подкожной имплантации клеток SKBR-3. Комплексы квантовых точек с антителами (0.14 нмоль в 100 мкл PBS) вводили в хвостовую вену. Особям контрольной группы вводили квантовые точки без антитела в той же концентрации. Для получения прижизненного изображения животных использовали установку для флуоресцентной диффузионной томографии, разработанную в Институте прикладной физики РАН (г. Н. Новгород). Через три часа после инъекции конъюгатов квантовых точек с антителами наблюдался значительный флуоресцентный сигнал в районе опухоли. Результаты флуоресцентной микроскопии опухолевой ткани *post mortem* подтвердили, что этот сигнал обусловлен накоплением квантовых точек в опухолевых клетках. Ненаправленные квантовые точки также частично накапливались в опухоли за счет так называемого EPR эффекта (Enhanced Permeability and Retention effect), однако наблюдаемый в этом случае флуоресцентный сигнал был заметно ниже.

Заключение. Созданы флуоресцентные комплексы направленного действия на основе квантовых точек и противоопухолевых мини-антител и показано их эффективное использование для визуализации опухолевых клеток, экспрессирующих онкомаркер HER2/neu, как *in vitro*, так и *in vivo*.

Литература

1. S.M. Deyev, R. Waibel, E. N. Lebedenko, et al. *Nat. Biotechnol.* **21**(12), 1486-1492 (2003).
2. S.M. Deyev and E.N. Lebedenko. *Bioessays.* **30**(9), 904-918 (2008).
3. E.N. Lebedenko, T.G. Balandin, E.F. Edelweiss, et al. *Dokl. Biochem. Biophys.* **414**, 120-123 (2007).
4. T.A. Zdobnova, S.G. Dorofeev, P.N. Tananaev, et al. *J. Biomed. Opt.* **14**, 021004 (2009).

BIOCONJUGATED QUANTUM DOTS FOR *IN VITRO* AND *IN VIVO* CANCER CELLS IMAGING

Zdobnova T.A., Balalaeva I.V.*, Deyev S.M.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

*Institute of Applied Physics, Russian Academy of Sciences, Nizhny Novgorod

E-mail: t.zdobnova@mail.ru

Fax: (495) 429-88-10; tel.: (495) 330-63-92

Introduction. The goal of this work was to create tumor-targeted fluorescent molecular complex for cancer imaging both *in vitro* and *in vivo*.

Semiconductor quantum dots (QDs) are fluorophores with unique physical and chemical properties that greatly extend the possibilities for fluorescence imaging of cells and aliving animals. Some antibodies can be successfully used for directed delivery of QD to target of interest.

Design of QD-conjugates. The previously described barnase-barstar module [1] was used for binding QDs to scFv antibody. Barnase and barstar are small-size bacterial proteins (12 and 10 kDa, respectively) that are highly affine to each other ($K_d \sim 10^{-14}$ M). Conjugation of one of these proteins to QD and the other to an antibody provides a directed delivery of QDs to different targets. In this context, barnase-barstar module can be compared to the biotin-streptavidin system [2].

The applicability of such fluorescent targeted complexes for tumor cells imaging was examined by the example of HER2/neu-overexpressing cells.

Anti-HER2/neu 4D5 scFv mini-antibodies fusion to barnase was used as targeting carrier for QD. We have shown earlier that such molecules high-efficiently bind to the external domain of HER2/neu cancer marker [1,3,4].

Near IR-emitting QDs (Invitrogen) were conjugated to the barstar protein, a component of the barnase-barstar module, using EDC as a cross-linker. It was shown that barstar and nanocrystals retained their physico-chemical properties and activity. The conjugation allows QDs binding to 4D5scFv-barnase fusions.

***In vitro* imaging.** The [QD-barstar-barnase-4D5 scFv] complex effectively stained HER2/neu on the surface of human breast cancer SKBR-3 cells. When the cells were incubated with QD-barstar alone, weak or no detectable signal was observed on the cell surface, indicating that the QD-barstar conjugates have very low non-specific binding. Studies using HER2/neu-negative CHO cancer cell line, also showed the absence of QD-4D5 binding.

***In vivo* imaging.** To investigate the specific binding of QDs labeled with the anti-HER2/neu mini-antibody to breast cancer *in vivo*, we used nude mouse model. Tumor-bearing mice were prepared with SKBR-3 s.c. implantation. Non-targeted QDs or QD-antibody complexes were injected into tail vein of mice at a concentration of 1.4 μ M and a volume of 100 μ l. Live mice whole-body images were obtained by fluorescence diffuse tomography setup, created at the Institute of Applied Physics, RAS. In 3h after QD-4D5 complexes injection the bright fluorescence signal from mice tumor region was detected. It was confirmed by fluorescence microscopy that the signal is determined by QDs accumulation in cancer cells due to specific interaction of antibodies with receptor on the cells surface. Non-targeted QDs accumulation in tumor tissue due to Enhanced

Permeability and Retention (EPR) effect was much worse compared with targeted QDs.

Conclusions. We have created fluorescent QD and mini-antibody complex and demonstrated its effective application for HER2/neu-overexpressing cancer cells *in vitro* and *in vivo* imaging.

References

1. S.M. Deyev, R. Waibel, E. N. Lebedenko, et al. *Nat. Biotechnol.* **21**(12), 1486-1492 (2003).
2. S.M. Deyev and E.N. Lebedenko. *Bioessays.* **30**(9), 904-918 (2008).
3. E.N. Lebedenko, T.G. Balandin, E.F. Edelweiss, et al. *Dokl. Biochem. Biophys.* **414**, 120-123 (2007).
4. T.A. Zdobnova, S.G. Dorofeev, P.N. Tananaev, et al. *J. Biomed. Opt.* **14**, 021004 (2009).

ОДНОВРЕМЕННЫЙ АНАЛИЗ ДЕВЯТИ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ОНКОМАРКЕРОВ НА БИОЛОГИЧЕСКОМ МИКРОЧИПЕ

Зубцова Ж.И., Савватеева Е.Н., Филиппова М.А., Цыбульская М.В., Рубина А.Ю.

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

E-mail: zubtsova.z.i@gmail.com

Факс: (499) 135-14-05; тел.: (499) 135-99-80

В настоящее время для ранней диагностики первичной опухоли и ее метастаз, а также мониторинга проводимой терапии широко используется определение опухолевых маркеров в сыворотке крови. Идеальный онкомаркер должен обладать высокой специфичностью и чувствительностью в отношении определенного вида опухоли, однако большинство известных опухолевых маркеров не отвечает этим критериям. Одновременное определение нескольких онкомаркеров повышает эффективность скринингового анализа и увеличивает возможности дифференциальной диагностики заболеваний. Большинство иммунохимических методов позволяет выявлять содержание только одного маркера в одном клиническом образце, поэтому в настоящее время большие надежды в области диагностики рака связывают с использованием мультиплексных систем, таких как микрочипы. В Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН разработаны биологические микрочипы на основе трехмерных гидрогелей. Биочип представляет собой матрицу регулярно расположенных на подложке полусферических гелевых элементов. Технология изготовления гидрогелевых биочипов основана на полимеризационной иммобилизации молекулярных зондов в ходе формирования гелевых ячеек микрочипа и позволяет создавать биочипы, содержащие молекулярные зонды различной природы (ДНК, РНК, белки, олигосахариды).

На основе созданной технологии был разработан метод, позволяющий проводить одновременное количественное определение девяти онкомаркеров в сыворотке крови человека на биологическом микрочипе: альфа-фетопротейна, хорионического гонадотропина человека, ракового эмбрионального антигена, раковых антигенов 125, 15-3, 19-9, простата-специфического антигена в общей и свободной формах, нейрон-специфической энолазы.

В качестве метода анализа был выбран "сэндвич"-иммуноанализ с флуоресцентной регистрацией сигнала. В качестве проявляющей системы использовали смесь моноклональных антител против девяти маркеров, конъюгированных с флуоресцентным красителем Су-5.

При проведении "сэндвич"-иммуноанализа антиген, находящийся в исследуемом образце, связывается со специфическими антителами, иммобилизованными в ячейках биочипа, после чего образовавшийся *in situ* бинарный комплекс взаимодействует с проявляющими антителами. После отмывки биочипа производят регистрацию флуоресцентных сигналов. Интенсивность флуоресцентных сигналов от гелевых ячеек с соответствующими иммобилизованными антителами пропорциональна

концентрации онкомаркера в образце. Для количественного определения концентрации онкомаркеров методом иммуноанализа на биочипе получают графики зависимости флуоресцентных сигналов гелевых элементов, содержащих иммобилизованные антитела, от концентрации соответствующего антигена в калибровочной пробе (калибровочную кривую), по которой затем рассчитывают неизвестную концентрацию аналита в образце. Результаты анализа регистрируют и обсчитывают с помощью универсального аппаратно-программного комплекса для анализа изображений биочипов, разработанного в ИМБ РАН.

Для разработки метода анализа девяти онкомаркеров на биочипе необходимо было для каждого из антигенов выбрать пары моноклональных антител, не дающих неспецифических перекрестных взаимодействий; подобрать составы блокирующих и инкубационных растворов; определить оптимальные концентрации для иммобилизованных и проявляющих антител; выбрать время и температуру инкубации; выбрать параметры контроля качества получаемых биочипов. Нами также был разработан набор калибровочных проб на основе сывороток здоровых доноров и стабилизирующих добавок. Каждая из калибровочных проб содержит девять анализируемых онкомаркеров в известных концентрациях. Концентрации всех онкомаркеров в калибровочных пробах верифицированы независимым методом иммуоферментного анализа (ИФА). Разработанный набор калибровочных проб позволяет получать в ходе одного эксперимента девять калибровочных кривых для одновременного количественного определения каждого из анализируемых онкомаркеров.

Была проведена оценка аналитических и диагностических характеристик разработанного метода и показано, что биочипы позволяют проводить определение онкомаркеров в диапазоне, необходимом для клинического анализа; при этом специфичность, воспроизводимость и чувствительность метода удовлетворяют требованиям, предъявляемым к традиционным ИФА-системам.

Проведено тестирование разработанного метода с использованием сывороток крови больных онкологическими заболеваниями и здоровых доноров и показано, что результаты одновременного количественного определения девяти онкомаркеров в образцах сывороток крови на биочипах хорошо коррелируются с результатами коммерческих ИФА тест-систем. В настоящее время разрабатывается набор реагентов для одновременного количественного определения девяти онкомаркеров в сыворотке крови человека ОМ-(9)-БИОЧИП, экспериментальная эксплуатация которого проводится сотрудниками учреждения "Центральная клиническая больница с поликлиникой" Управления делами Президента РФ.

SIMULTANEOUS ANALYSIS OF SEROLOGICAL ONCOLOGICAL MARKERS ON BIOLOGICAL MICROCHIP

Zubtsova Z.I., Savvateeva E.N., Filippova M.A., Tsybul'skaya M.V., Rubina A.Yu.

Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow

E-mail: zubtsova.z.i@gmail.com

Fax: (499) 135-14-05, tel.: (499) 135-99-80

Testing of tumor markers in blood serum is widely used today for early diagnosing of primary tumors and their metastases as well as for monitoring of tumor therapy. Ideal oncological marker should have high specificity and sensitivity with respect to certain tumor form but the majority of tumor markers known at the present time doesn't meet these requirements. Simultaneous detection of several tumor markers improves the efficiency of screening test and increases the possibilities of differential diagnosing of diseases. The majority of immunochemical methods allows detecting the presence of only a single marker in one clinical sample, therefore, at the present time the multiplex systems, such as microchips, are challenging in the sphere of cancer diagnosing. In the Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS biological microchips on the basis of three-dimensional hydrogels are developed. Biochip is a matrix of hemispherical gel elements regularly arranged on a substrate. The technology of hydrogel biochips production is based on polymerization immobilization of molecular probes in the course of forming of microchips gel pads and it enables to create biochips that contain molecular probes of different nature (DNA, RNA, proteins, oligosaccharides).

On the basis of the created technology we have developed a method that allows one to make simultaneous quantitative measurement of nine oncological markers in human blood serum using biological microchips: α -fetoprotein, human chorionic gonadotropin, carcinoembryonic antigen, cancer antigens 125, 15-3, 19-9, prostate-specific antigen in total and free forms, neuron-specific enolase.

"Sandwich-type"-immunoassay with fluorescent registration of the signal has been chosen as the assay method. The developing system is a mixture of monoclonal antibodies against nine assayed markers labeled with Cy-5 fluorescent dye.

In the "sandwich" immunoassay, an antigen in analyzed probe binds with specific antibody immobilized in microchip pads. After that the generated in situ binary complex interacts with developing antibodies. After washing of biochip, fluorescent signals are recorded. The intensity of fluorescent signal from gel pads with appropriate immobilized antibodies is proportional to concentration of the oncomarker in the sample. For quantitative determination of oncomarker concentration, a dependence of fluorescent signals from gel pads containing immobilized antibodies versus concentration of the appropriate antigen in a calibration solution is constructed (calibration curve). Using this plot, unknown concentration of the analyte in the sample is calculated. The results of the analysis are recorded and processed using the universal computer software that had been developed in the IMB RAS for the analysis of fluorescence images from biochips.

During the development of the method for the on-chip analysis of nine oncomarkers several problems have been solved: pairs of monoclonal antibodies to every antigen that did not show non-specific cross-reactions have been selected,

composition of blocking and incubation solutions has been determined, optimal concentrations for immobilized and developing antibodies have been chosen, time and temperature of the incubation have been determined, parameters of quantity control of biochips after manufacturing have been established. We have also developed a set of calibrators on the basis of blood sera of healthy donors and stabilizing additives. Every calibrator contains nine oncomarkers in known concentrations. Concentration of every oncomarker was verified by the independent method (enzyme immunoassay (EIA)). The developed set of calibration probes allows obtaining nine calibration curves simultaneously from one experiment for quantitative determination of nine oncomarkers.

Analytical and diagnostic characteristics of the developed method have been estimated. It was shown that biochips allow testing oncomarkers within the clinically meaningful range and the specificity, repeatability and sensitivity of the method satisfy the requirements for traditional EIA-systems.

The biochip-based method has been tested using blood sera of oncological patients and healthy donors. The results of the on-chip simultaneous quantitative detection of nine oncomarkers in blood serum samples correlated well with the results obtained using commercial EIA test-systems. At the present time we are developing a kit of reagents for the simultaneous quantitative detection of nine oncomarkers in human blood serum OM-(9)-BIOCHIP. The kit now undergoes experimental trial in the "Central clinical hospital and polyclinic" of the Department for Presidential Affairs of the Russian Federation.

НОВЫЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ ХИРУРГИЧЕСКИЙ ШОВНЫЙ МАТЕРИАЛ

Кабешев Б.О., Бонцевич Д.Н., Гуреев С.А., Васильков А.Ю.*

Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь
*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва
E-mail: 6733866@mail.ru
Тел.: (+37529) 609-62-71

Цель нашего исследования – получение нового антибактериального хирургического шовного материала. В качестве основы использованы крученные капроновые нити 3 метрического размера. В качестве универсального антибактериального компонента выбраны наночастицы серебра. Суспензия наночастиц серебра получена путем совместной конденсации паров серебра и изопропанола на стенках стеклянного реактора, охлаждаемого жидким азотом. Распределение размеров частиц серебра носит бимодальный характер и характеризуется средним размером 4 и 30 нм. Для нанесения на нити использовали два вида растворов наночастиц серебра: 1) раствор наночастиц в изопропиловом спирте; 2) раствор наночастиц в смеси изопропилового спирта с поливинилпирролидоном. Покрытия наносили "растворным" методом, избыток органозоля удаляли, а нити сушили в течение часа при температуре 80...100°C. Проведено исследование механических, гемолитических и токсических свойств капроновых нитей с покрытиями из наночастиц серебра. Определение прочности нитей при растяжении, в том числе с узлами, в сухом и влажном состоянии до и после модификации наночастицами серебра, проводили на автоматизированном испытательном стенде ComTen 94C, предназначенном для высокоточного определения механических характеристик полимерных материалов при статическом нагружении по ГОСТ 396-84. При проведении фрикционных испытаний регистрировали усилие, необходимое для протягивания шовной нити по мокрой или сухой замшевой поверхности образца выделанной кожи как имитатору биоткани.

Для исследования гемолитических свойств использовали методику определения гемолитического действия полимерных материалов *in vitro*. Принцип метода – определение гемолитического действия вытяжек из модифицированных нитей по 100% гемолизу. Для определения токсических свойств применяли методику определения токсического действия вытяжек из материалов на половых клетках крупного рогатого скота. Принцип методики – в визуальном наблюдении двигательной активности сперматозоидов быка, подвергшихся воздействию водных экстрактов модифицированных нитей.

Механические свойства нитей с покрытиями относительно исходных изменились. У капроновых нитей с покрытием из наночастиц серебра разрывная прочность выросла, а жесткость снизилась. В случае с использованием раствора с поливинилпирролидоном отмечено изменение фрикционных свойств. В ходе исследования гемолитических свойств оказалось, что исследуемый нами шовный материал, модифицированный наночастицами серебра, не имеет гемолитического действия. Изучение токсического действия вытяжек из данного шовного материала на половых клетках крупного рогатого скота показало, что время подвижности сперматозоидов в опытных пробах больше, чем в контрольных.

Таким образом, мы можем констатировать, что исследуемый нами шовный материал обладает удовлетворительными механическими, гемолитическими и токсическими свойствами.

NEW ANTIBACTERIAL SURGICAL SUTURAL MATERIAL

*Kabeshev B.O., Bontsevich D.N., Gureev S.A., Vasilkov A.U.**

Gomel State Medical University, Belarus

*Lomonosov Moscow State University, Moscow

E-mail: 6733866@mail.ru

Tel.: (+37529) 609-62-71

The aim of our research is obtaining a new antibacterial surgical sutural material. 3 metric size lisle capron threads have been used as a base. In the capacity of a universal antibacterial component nanoparticles of silver have been selected. The suspension of silver nanoparticles has been obtained by cojoint condensation of silver and isopropanol vapor on the walls of a glass reactor chilled by liquid nitrogen. The distribution of silver particles sizes has a bimodal pattern and is characterized by an average size of 4 and 30 nm. Two kinds of silver nanoparticles solutions have been used to apply on threads: 1) nanoparticles solution in isopropyl alcohol; 2) nanoparticles solution in the compound of isopropyl alcohol with polyvinylpyrrolidone. The coatings have applied by "solution" method, the surplus of orgazol being removed and threads being dried within an hour at the temperature of 80-100°C. The investigation of mechanical, hemolytic and toxic properties of capron threads with silver nanoparticles coatings has been carried out.

The identification of strength of threads on tension including nodes both in dry and moist state before and after modification with silver nanoparticles has been performed on test stand ComTen 94C, designed for high-precision evaluation of mechanical characteristics of polymeric materials under static loading in accordance with GOST 396-84.

While performing friction tests we recorded force necessary for extending sutural thread on moist or dry chamois surface skin test sample as an imitator of biotissue. To investigate hemolytic properties we used the methods of determining hemolytic action of polymeric materials *in vitro*. The concept of the method is to determine hemolytic action of extracts from modified threads by 100% hemolysis. To identify toxic properties, the methods of evaluating toxic action of extracts from materials on reproductive cells of cattle have been used. The concept of the method is in visual observation of motion activity of a bull's spermatozooids exposed to aqueous extracts of modified threads.

Mechanical properties of threads with coatings in regard to original ones have changed. In capron threads with silver nanoparticles tearing strength has increased, and inflexibility decreased. In case of using polyvinyl solution changing friction properties has been marked. In the course of investigating the hemolytic properties the sutural material under our study proved to have no hemolytic action. During our investigating the toxic action of the extracts of sutural material on reproductive cells of cattle it turned out that the movability time of spermatozooids in test samples is longer than in control ones.

Thus, we can state that the sutural material under our study possesses satisfactory mechanical, hemolytic and toxic properties.

РАЗРАБОТКА МАКЕТА БПК-БИОСЕНСОРА ПРОТОЧНО-ИНЖЕКЦИОННОГО ТИПА НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕВЫХ ШТАММОВ *CANDIDA MALTOSA*, *CANDIDA BLANKII* И *DEBARYOMYCES HANSENI*

Каманин С.С., Юдина Н.Ю., Арляпов В.А.

Тульский государственный университет, Тула

E-mail: chem@tsu.tula.ru

Факс: (4872) 33-13-05; тел.: (4872) 35-18-40

В настоящее время имеет место жесткое ограничение потребности человека в водных ресурсах. Масштабные объемы потребления воды для удовлетворения бытовых нужд, применение воды в технологических процессах приводят к истощению водных запасов и острой необходимости производить регенерацию использованных объемов воды. Для оценки степени загрязненности/чистоты воды в настоящее время применяется параметр, определенный как "индекс БПК". Существующий метод определения БПК основан на тестах, продолжительность которых составляет 5, 10 или 20 суток. В силу значительной продолжительности процедуры метод не является адекватным в современных условиях жизни, поскольку представляет результаты анализа со значительной задержкой (минимум 5 суток от момента поступления пробы). По указанной причине возникают экологически опасные ситуации, при которых остаются незамеченными поступление на водоочистные сооружения аварийно загрязненных вод или наоборот, недоочистка их в процессе регенерации. Сегодня все водоочистные сооружения РФ используют для повседневного рутинного анализа сточных вод упомянутый метод БПК₅.

В данном проекте предлагается разработка прибора, предназначенного для экспресс-оценки индекса БПК. В основу прибора положена автоматизированная многоканальная биосенсорная установка амперометрического типа, интегрированная с персональным компьютером. Датчиками являются кислородные электроды с иммобилизованными клетками микроорганизмов. В работе были использованы дрожжевые штаммы *Candida maltosa* ВКМ-У-2359, *C. blankii* ВКМ У-2675 и *Debaryomyces hansenii* ВКМ У-2482. Штаммы получены во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН в г. Пушкино.

В ходе выполнения работы определены кинетические параметры (удельная скорость роста клеточной культуры, предельная максимальная удельная скорость роста, константа, характеризующая сродство субстрата к клеткам культуры) роста культуры дрожжевых штаммов. Установлено, что у дрожжей *D. hansenii* сродство к ростовым субстратам выше, чем у остальных дрожжей.

С использованием модельной системы на основе глюкозо-глутаматной смеси определены аналитические и метрологические характеристики биосенсора на основе используемых дрожжевых штаммов. По большинству параметров (операционная и долговременная стабильности, субстратная

специфичность, широкий рабочий диапазон концентраций, чувствительность) наилучшие значения показал биосенсор на основе дрожжей *D. hansenii*.

Изучено влияние негативных факторов (рН, ионная сила, соединения тяжелых металлов) на окислительную активность иммобилизованных дрожжей в биораспознающем элементе биосенсора. Выявлено, что дрожжи *C. maltosa* не меняют активности в диапазоне рН (6-7), а у дрожжей *D. hansenii* и *C. blankii* наблюдается экстремальный характер зависимости в области рН 7. Увеличение ионной силы раствора практически не изменяет активности дрожжей *D. hansenii* и *C. blankii*, но ингибирует дыхательную активность *C. maltosa*. Показано, что присутствие в среде ионов Ni^{2+} и $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ в диапазоне концентраций $0\text{-}6 \times 10^{-4}$ моль/дм³ не оказывает существенного влияния на окислительную способность на *C. maltosa* и *D. hansenii*, а *C. blankii* подвергается негативному воздействию соединений тяжелых металлов.

Проведено сравнительное определение БПК сточных вод очистных сооружений стандартным методом и с применением разработанных биосенсоров. Впервые показано, что использование дрожжевых клеток *D. hansenii* как основы рецепторного элемента биосенсора для определения БПК стоков очистных сооружений позволяет получать данные с высокой корреляцией к стандартному методу, при этом ошибка составила не более 7% (стандартный метод – не более 13%).

Время анализа с использованием данного оборудования не превышает 10 мин. Для измерения не требуется привлечения высокоспециализированного персонала. Следует отметить также возможность повышения уровня автоматизации производства при использовании данной аппаратуры. Применение новой методики не только не приведет к снижению, но и повысит такие параметры анализа как точность и чувствительность.

Анализаторы нового поколения могут быть использованы для оснащения промышленных предприятий и систем водоочистки РФ, для использования станциями санитарно-эпидемиологического контроля, службами МЧС, МинПрироды, экологическими структурами.

DEVELOPMENT OF FLOWING-INJECTIVE BOD-BIOSENSOR MODEL ON BASIS OF YEAST STRAINS *CANDIDA MALTOSA*, *CANDIDA BLANKII* AND *DEBARYOMYCES HANSENI*

Kamanin S.S., Yudina N.Yu., Arlyapov V.A.

Tula State University, Tula

E-mail: chem@tsu.tula.ru

Fax: (4872) 33-13-05; tel.: (4872) 35-18-40

Now rigid restriction of requirement of the person in water resources takes place. Scaling volumes of consumption of water for satisfaction of household needs, water application in technological processes leads to an exhaustion of water stocks and to sharp necessity to make regeneration of the used volumes of water. Now for estimation of degree of water impurity/cleanliness is applied the parameter defined as "biological oxygen demand". The existing method of "biological oxygen demand" determination is based on the tests which duration makes 5, 10 or 20 days. Owing to considerable duration of procedure the method is not adequate in modern conditions of a life as represents results of the analysis with a considerable delay (a minimum of 5 days from the moment of receipt of test). For the specified reason there are ecologically dangerous situations at which there is not noticed a receipt on water-purifying constructions of abnormal condition polluted waters or underrefining them in the course of regeneration on the contrary. Now all water-purifying constructions of the Russian Federation use the mentioned method "biological oxygen demand," for the daily routine analysis of sewage.

In the project working out of the device intended for an express estimation of index BOD is offered. The automated multichannel biosensor installation is put in a basis of amperometric type device, integrated with the personal computer. Transducers are oxygen electrodes with immobilized cells of microorganisms. Yeast strains *Candida maltosa* ACM Y-2359, *C. blankii* ACM Y-2675 and *Debaryomyces hansenii* ACM Y-2482 were used during this work. Strains were given by All-Russian Collection of G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS in Pushchino.

Kinetic parameters of yeast strain's growth (specific growth rate, limiting maximum specific growth rate, substratum affinity constant) were estimated. Established that substratum affinity of yeast strain *D. hansenii* is higher than substratum affinity of other strains used in this work.

By using model system on basis of glucose-glutamate mixture analytic and metrological characteristics of biosensor containing investigated strains, were determined. Biosensor on basis of yeast strain *D. hansenii* had the best magnitudes of most parameters (operational stability, long-term stability, substratum specificity, worker concentration range, sensitivity).

Effect of negative factors, such as pH, ionic strength, heavy metals compounds was investigated. Established that yeasts *C. maltosa* don't change their activity in pH range 6-7, *C. blankii* and *D. hansenii* have extremal type of dependence near pH 7. Increasing ionic strength has practically no effect on *C. blankii* and *D. hansenii* strains, but inhibits oxidating activity of *C. maltosa*. Showed that existence of Ni^{2+} and $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ions in medium in range of concentration $0\text{-}6 \times 10^{-4}$ mol/l has no essential

effect on oxidating activity of *C. maltosa* and *D. hansenii*, but *C. blankii* takes negative exposure of heavy metals compounds.

Comparative determination of BOD of drain waters of treatment facilities by standard method and using developed biosensors has been carried out. For the first time showed that using yeast strain *D. hansenii* as a basis for receptor element of biosensor for determination of BOD of drains of treatment facilities allows to get data with high correlation to the standard method. Error was not higher than 7% (by using standard method – not higher than 13%).

Time of the analysis using mentioned equipment does not exceed 10 minutes. There is no need in attraction high specialized personnel for measurement. A possibility of increasing of automation level of manufacture using mentioned equipment should be noted. Application of a new technique leads not only to end of decreasing, but also to raising such parameters of the analysis as accuracy and sensitivity.

Analyzers of new generation can be used at stations of the sanitary and epidemiologic control, services of the Ministry of emergency measures, Ministry of nature, ecological structures and for acquisition of the industrial enterprises and water purification systems of the Russian Federation.

**СИНТЕТИЧЕСКИЙ ФРАГМЕНТ 173-193
АЛЬФА7-СУБЪЕДИНИЦЫ АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА
В НЕКОНЪЮГИРОВАННОЙ ФОРМЕ ОКАЗЫВАЕТ
ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ НА МЫШЕЙ С
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ИНДУЦИРОВАННОЙ БОЛЕЗНЬЮ
АЛЬЦГЕЙМЕРА**

***Камынина А.В., Медвинская Н.И. *, Александрова И.Ю. *,
Шалгунов В.С., Волкова Т.Д., Короев Д.О., Самохин А.Н. *,
Нестерова И.В. *, Шелухина И.В., Крюкова Е.В., Цетлин В.И.,
Бобкова Н.В. *, Вольпина О.М.***

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

*Институт биофизики клетки РАН, Пущино

E-mail: aneskaminina@mail.ru

Тел.: (495) 336-57-77

Одними из признаков развития болезни Альцгеймера (БА) являются формирование амилоидных бляшек, а также снижение количества ацетилхолиновых рецепторов (АХР) альфа7-типа в мозгу пациентов. По одной из гипотез развития БА патогенный пептид бета-амилоид связывается с альфа7-типом АХР на поверхности нейронов мозга. Такой комплекс проникает внутрь нейронов, приводя к лизису клетки и формированию на ее месте амилоидной бляшки. Современная терапия БА носит лишь симптоматический характер. В медицине пока отсутствует препарат, способный полностью излечивать БА. В связи с этим чрезвычайно актуальна разработка новых подходов к терапии этого тяжелого заболевания.

Мы предложили принципиально новый подход для лечения БА, основанный на выработке антител, направленных к альфа7-субъединице АХР, которые, связываясь с рецептором, препятствовали бы его взаимодействию с бета-амилоидом и таким образом предохраняли нейрон от гибели. В качестве животной модели БА были использованы мыши линии NMRI, которым проводили операцию бульбэктомии, или удаления обонятельных луковиц. После такой операции бульбэктомированные (БЭ) животные развивают признаки БА, характерные для человеческой формы, а именно, у таких мышей наблюдается ухудшение пространственной памяти в водном лабиринте Морриса, увеличение уровня бета-амилоида и формирование амилоидных бляшек в мозгу, а также гиподисфункция холинэргической системы. Для индукции специфических к альфа7-субъединице антител были использованы четыре неконъюгированных фрагмента альфа7-субъединицы. В качестве контроля был взят фрагмент 171-199 белка OMP1 из *Neisseria meningitidis*. Иммуногенными на данной линии мышей оказались только два фрагмента альфа7-субъединицы последовательности 1-23 и 173-193, а также контрольный пептид 171-199. Способность фрагмента 173-193 стимулировать иммунный ответ была выше, чем фрагмента 1-23. Исследование терапевтического действия иммунизации иммуноактивными пептидами БЭ

мышей показало, что восстановление памяти наблюдалось только у мышей, иммунизированных фрагментом 173-193. Иммунизация пептидом 173-193 снижала уровень бета-амилоида в мозгу БЭ мышей до 11 нг/г ткани по сравнению с неиммунизированными БЭ животными, у которых уровень бета-амилоида в мозгу составляет 38 нг/г. Было показано, что БЭ мышей имеют пониженный уровень альфа7-типа АХР в коре мозга (9.8 ± 1.0 фмоль/мг белка) по сравнению со здоровыми мышами (14.7 ± 1.9 фмоль/мг белка). Иммунизация фрагментом 173-193 приводила к восстановлению уровня АХР до нормы (15.1 ± 1.5 фмоль/мг белка). Пептид 173-193 стимулировал выработку антител, которые у БЭ мышей проникали через гематоэнцефалический барьер. Пассивная иммунизация сывороткой крови мышей, иммунизированных пептидом 173-193, содержащей антитела к данному фрагменту, предотвращала снижение обучаемости БЭ мышей. Таким образом, показано, что именно антитела к альфа7-субъединице АХР оказывают терапевтическое действие на состояние памяти мышей с экспериментально индуцированной формой БА. Полученные нами результаты демонстрируют принципиальную возможность использования фрагмента 173-193 для профилактики и лечения БА.

SYNTHETIC FRAGMENT 173-193 OF THE ALPHA7 NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR IN A NON-CONJUGATED FORM INDUCES IMMUNETHERAPEUTIC EFFECT IN MICE WITH EXPERIMENTALLY INDUCED ALZHEIMER'S DISEASE

Kamynina A.V., Medvinskaya N.I., Aleksandrova I.Ju.*, Shalgunov V.S., Volkova T.D., Koroev D.O., Samokhin A.N.*, Nesterova I.V.*, Shelukhina I.V., Krukova E.V., Tsetlin V.I., Bobkova N.V.*, Volpina O.M.*

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

*Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino

E-mail: aneskaminina@mail.ru

Tel.: (495) 336-57-77

Alzheimer's disease (AD) is accompanied by significant increase of brain amyloid level and down regulation of the acetylcholine receptor (AChR) alpha7-type in the hippocampus and in the temporal cortex in patients. One of the hypotheses of AD neuropathology involves high affinity binding of beta-amyloid to the nicotinic acetylcholine receptor alpha7-subunit. The complex penetrates into a neuron and leads to cell lysis and amyloid plaque formation. Current AD therapeutics provide mainly symptomatic short-term benefit, rather than targeting disease mechanisms. Thus, development of effective AD therapy requires further effect.

We proposed a new approach to AD treatment based on induction of antibodies to alpha7-subunit AChR which could bind to the receptor and prevent it from binding to beta-amyloid and from development of neurodegenerative processes. As a model of AD we used NMRI mice with olfactory bulb removed. After the operation bulbectomized (BE) mice demonstrate morphological, biochemical and behavioral features of AD, such as memory impairment, higher level of brain beta-amyloid and cholinergic deficiency. Four non-conjugated alpha7-subunit fragments of the nicotinic acetylcholine receptor and a control peptide (the 171-199 fragment of Outer Membrane Protein 1 from *Neisseria meningitides*) were studied to induce immune response in mice. Only two fragments of alpha7-subunit (amino acids 1-23 and 173-193) and the control peptide induced antibody formation in mice. Immunogenicity of peptide 173-193 was higher than of 1-23 fragment. We showed that vaccination with fragment 173-193 of alpha7-subunit restored spatial memory of BE mice, whereas, immunization with peptide 1-23 as well as with the control peptide did not improve mice memory. Immunization with fragment 173-193 decreased the level of beta-amyloid in the brain of BE mice to 11 ng/g of brain tissue compared with 38 ng/g for non-immunized BE mice. We showed that BE mice have lower level of the neuronal AChR alpha7-type in the cortex (9.8 ± 1.0 fmol/mg protein) in comparison with healthy animals (14.7 ± 1.9 fmol/mg protein). Immunization with synthetic peptide 173-193 led to recovery of the AChR alpha7-type up to normal level in the cortex of BE animals (15.1 ± 1.5 fmol/mg protein).

Peptide 173-193 stimulated formation of antibodies which penetrate the blood-brain barrier in BE animals. Passive immunization with blood sera containing antibodies to peptide 173-193 suppressed cognitive decline in mice with experimentally induced AD. Thus, we confirmed that mainly antibodies to alpha7-subunit caused the therapeutic effect on the memory of mice with experimentally induced Alzheimer's disease. The results obtained provide new arguments favouring the immunotherapeutic approach to treatment of AD based on vaccination with fragments of the alpha7-subunit of the nicotinic AChR.

КОЛОНИЗАЦИЯ РАСТЕНИЙ ТОМАТА АССОЦИАТИВНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

*Карнова Л.С., Чепурнова М.А., Захарченко Н.С.**, *Музафаров Е.Н., Бурьянов Я.И.**

Тульский государственный университет, Тула

*Филиал Института биоорганической химии им. академиком

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино

E-mail: chepurnovama@ Rambler.ru

Использование химических средств защиты растений от болезней наносит значительный ущерб окружающей среде и здоровью людей. Альтернативным, экологически безопасным микробиологическим методом защиты культурных растений от фитопатогенов является колонизация растений полезными микроорганизмами. Отдельные представители микробных агробиоценозов, существующие в тесной взаимосвязи с растениями, стимулируют их рост и развитие, а также повышают устойчивость растений к различным биотическим и абиотическим стрессовым факторам внешней среды за счет синтеза различных метаболитов. В настоящее время ризобактерии, способствующие росту растений, принято обозначать как PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Потенциальными объектами агробиотехнологии являются бактерии рода *Pseudomonas*, доминирующие в ризосфере растений и вызывающие вышеперечисленные эффекты. Ассоциация растение-микроорганизм является взаимовыгодной связью, т.к. с одной стороны, микроорганизмы синтезируют необходимые для растения соединения (фитогормоны, антибиотики) и способствуют мобилизации питательных элементов из почвы (фосфора, железа, азота), а с другой стороны, растения снабжают микроорганизмы источниками азота, энергии и другими веществами.

Целью нашей работы было исследование эффекта колонизации растений томата сорта "Космос" бактериями *Pseudomonas aureofaciens* BS1393 (их влияние на рост и развитие растений, на адаптацию в системе *in vivo* и защитные свойства растений от фитопатогенов).

Колонизацию стерильных растений томата, выращенных *in vitro*, проводили однократным опрыскиванием суспензией бактерий *P. aureofaciens* BS1393 с титром клеток 10^3 - 10^5 . Тестирование растений на установление ассоциативной связи с бактериями показало, что содержание микроорганизмов во всех последующих пассажах микроразмножения в растительных эксплантах стабильно сохранялось. При этом количество бактерий *P. aureofaciens* в листьях в первом пассаже микроразмножения составляло 1-3 тыс. колониеобразующих единиц на 1 см², а в корнях – 10-20 тыс./см², что указывает на ризосферную специфичность штамма.

Известно, что штамм *P. aureofaciens* BS1393 синтезирует феназинкарбоновую кислоту, обладающую антибиотическими свойствами и подавляющую рост фитопатогенной микрофлоры. Для проверки устойчивости колонизированных растений к фитопатогенам использовали бактерии вида *Erwinia carotovora* B15 и микромицеты вида *Sclerotinia*

sclerotiorum. Микроорганизмы использовали как для инфицирования отдельных листьев, так и целых растений. Листья инкубировали в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге при температуре 22-24°C. Степень повреждения растительных тканей оценивали через 1-14 суток после заражения *E. carotovora* и через 1-30 суток – *S. sclerotiorum*. В обоих вариантах опыта уже в первые дни эксперимента на неколонизированных листьях были заметны симптомы поражения фитопатогенами (разрушение мезофилла листа, дальнейшее загнивание тканей при заражении *E. carotovora* и образование темных некротических пятен при заражении *S. sclerotiorum*). Колонизированные листья оставались без признаков повреждения в течение всего опыта. Аналогичная ситуация наблюдалась при заражении целых растений. Колонизированные растения проявляли устойчивость к патогенам в течение всего времени эксперимента, в то время как контрольные – полностью сгнили.

При пересадке колонизированных растений из культуры *in vitro* в закрытый грунт теплицы нами были отмечены их быстрая приживаемость в корневой зоне (100 % укоренение, контроль – 64%), активный рост и развитие растений (высота растений в 1,5 раза выше контрольных), более раннее образование завязей (на 4 суток по сравнению с контролем) и созревание плодов, высокая урожайность, а также лучшая устойчивость к поражению почвенными фитопатогенами.

Колонизация растений томатов полезными микроорганизмами в условиях отсутствия конкуренции последних с нежелательной микрофлорой позволила получить достаточно продуктивную ассоциацию растение-микроорганизм для их культивирования в природных условиях. Использование таких ассоциаций является перспективным экологически безопасным методом выращивания культурных растений, в том числе устойчивых к фитопатогенам.

COLONIZATION OF TOMATO PLANTS ASSOCIATIVE MICROORGANISMS

*Karnova L.S., Chepurnova M.A., Zakharchenko N.S.**, *Muzafarov E.N., Buryanov Ya.I.**

Tula State University, Tula

*Branch of Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino

E-mail: chepurnovama@rambler.ru

Using chemicals to protect plants from diseases causes significant damage to the environment and human health. One of the most effective and environmental friendly method of protecting plants from phytopathogenic is the usage of microorganisms associated with plants. Individual representatives of microbial agrocoenosis exist in close interconnection with plants. They promote the development of plants and also improve their stability to various biotic and abiotic stressful environment causes at the expense of the synthesis of different metabolites. Nowadays Plant Growth-Promoting Rhizobacteria is given abbreviation PGPR. Potential objects of agrobiotechnology are *Pseudomonas* bacteria, which dominate in the rhizosphere of plants and cause the effects mentioned above. The association of plant-microorganism is mutually beneficial connection. On the one hand, microorganisms synthesize combinations required for plants (phytohormones and antibiotics) and promote mobilization of nourishing components from soil (phosphorus, iron, nitrogen). On the other hand, plants provide microorganisms with source of nitrogen, energy and others.

The aim of the present work was the research of colonization of tomato plants "Kosmos" by the bacteria *Pseudomonas aureofaciens* BS1393 (their influence on growth and development of the plants, adaptation in the system *in vivo* and also plant protective properties from phytopathogens).

The colonization of the non-bacterial tomato plants, grown *in vitro* was made with single-phase spraying by bacteria *P. aureofaciens* suspension. The cell titer was equal to 10^3 - 10^5 . The plant test devoted to the identification of the associative connection with bacteria showed that microorganism substance in all the following passages of microgeneration in vegetation explants was maintained invariably. In this case the number of bacteria *P. aureofaciens* in the leaves in the 1st passage of microgeneration was equal to 1000-3000 of colony forming unit for 1 cm² and 10000-20000 of colony forming unit for 1 cm² in the roots. It indicates the rhizosphere of the strain of peculiarity.

It is well known that the strain *P. aureofaciens* BS1393 synthesizes phenazinecarboxylic acid. It is possessed of antibiotic properties and represses the growth of phytopathogenic microflora. The bacteria *Erwinia carotovora* B15 and micromycet *Sclerotinia sclerotiorum* were used in order to check up the stability of the colonized plants. Microorganisms were used for infection of separate leaves as well as whole plants. The leaves were incubated in the Petri dish on the wet filter paper at the temperature of 22-24°C. The degree of the damage of plant tissue was estimated in 1-14 days after the infection *E. carotovora* and also in 1-30 days – *S. sclerotiorum*. In both cases on the first days of the experiment there

were the symptoms of phytopathogen damage on uncolonized leaves (the damage of mesophyll of the leaf, further rotting of tissue with the *E. carotovora* infection and formation of dark necrotic spots with the *S. sclerotiorum* infection). The colonized leaves remained without any signs of damage during the whole experiment. The situation was identical when the whole plants were infected. The colonized plants displayed stability to the pathogens throughout the experiment and the control plants rotted completely.

Replanting the colonized plants from the culture *in vitro* into the hothouses we noticed their rapid establishment in the root zone (100% rootage, the control plants – 64%), active growth and development of the plants (the height of the plants was 1,5 times more than of the control ones), quicker formation of ovaries (4 days quicker in comparison with the control plants), bearing aging, good crop capacity and better stability to soil phytopathogen damage.

The association of the microorganisms with the tomato plants made it possible to receive rather productive unit plant-microorganism for their cultivation in the natural conditions. The usage of these units is the perspective environmentally safe method of the growth of the cultivated plants, including plants stable to phytopathogens.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕЖХРОМОСОМНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИ ТРАНС-ДЕЙСТВУЮЩЕМ ЭФФЕКТЕ ПОЛОЖЕНИЯ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Кибанов М.В., Лавров С.А., Абрамов Ю.А., Гвоздев В.А.

Институт молекулярной генетики РАН, Москва

E-mail: mkibanov@gmail.com

Факс: (499) 196-02-21; тел.: (499) 196-08-09

Экспрессия генов контролируется на многих уровнях реализации генетической информации, и все больше данных свидетельствуют о том, что архитектура ядра и структура генома, в целом, оказывают значительное влияние на этот процесс. *Drosophila melanogaster* представляет собой удобный модельный объект для исследования подобных явлений. Одним из наиболее изученных примеров инактивации гена в результате взаимодействия удаленных областей генома является мутация *brown*^{Dominant} *D. melanogaster*, которая вызвана инсерцией блока гетерохроматина в кодирующую последовательность гена *brown* на дистальном конце второй хромосомы. В гетерозиготах *bw^D/bw⁺* данный блок гетерохроматина приводит к перемещению аллеля дикого типа гена *brown* (*bw⁺*) в гетерохроматиновый компартмент ядра и выключению гена.

Другой подобный пример транс-взаимодействия удаленных областей генома был недавно обнаружен в нашей лаборатории: хромосомная перестройка А4 вызывает транс-инактивацию репортерных конструкций, расположенных на нормальной хромосоме, в линиях *D. melanogaster*, гетерозиготных по перестройке. Данная хромосомная перестройка представляет собой инверсию фрагмента левого плеча второй хромосомы, в результате которой участок эухроматина размером в миллион пар нуклеотидов оказывается окруженным блоками гетерохроматина. Цель настоящей работы заключается в исследовании молекулярных основ наблюдаемого эффекта транс-инактивации.

С помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации на политепных хромосомах из слюнных желез линии *D. melanogaster*, гомозиготной по инверсии, и метода ПЦР было определено положение эухроматической точки разрыва (ТР) инверсии на конце гена *Mcm10*. С помощью рестрикционного анализа и гибридизации по Саузерну область была сужена до 200 пар нуклеотидов. В настоящее время с использованием метода обратной ПЦР ведется работа по определению последовательностей гетерохроматина, прилежащих к эухроматической ТР, для лучшего понимания природы наблюдаемого эффекта транс-инактивации.

Картировать эухроматическую ТР было важно и для того, чтобы правильно выбрать положение ДНК-пробы для изучения изменений в пространственном расположении перестроенного фрагмента хромосомы в ядре: участок посадки зонда должен обязательно располагаться до ТР и в то же время достаточно близко к ней, что позволит детектировать малейшие изменения в архитектуре ядра. Подход для определения пространственного расположения инвертированного фрагмента хромосомы внутри ядра

заклучался в гибридизации имагинальных дисков *D. melanogaster* с двумя пробами к границам инверсии, сканирования по объему ядер с помощью конфокальной микроскопии и обработке данных при помощи специализированного программного обеспечения, позволяющего восстанавливать трехмерное изображение и производить измерение абсолютных расстояний между участками гибридизации зондов. При сканировании готовых препаратов с помощью конфокального микроскопа был использован нестандартный метод "спектрального разделения сигналов", так как обычный "многоканальный" режим не позволял добиться полного разделения спектров эмиссии флуорохромов.

В результате удалось обнаружить, что в ядрах имагинальных дисков из линии, гомозиготной по инверсии, наблюдается уменьшение расстояния между сигналами по сравнению с контролем (линия без инверсии). Полученные данные говорят о перемещении района инверсии в гетерохроматиновый компартмент ядра.

В настоящее время проводится работа по гибридизации и иммуноокрашиванию имагинальных дисков линий *D. melanogaster*, гетерозиготных по инверсии. Кроме того, планируется одновременно провести ДНК- и РНК-гибридизацию, чтобы исследовать влияние перемещения в гетерохроматиновый компартмент ядра на экспрессию репортерных генов. Количество РНК будет также оцениваться с помощью обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени.

Теоретически перемещение инвертированного фрагмента в гетерохроматиновый компартмент ядра должно сопровождаться появлением в составе хроматина соответствующих белков, например, белка HP1, и характерных модификаций гистонов, таких как гистон H3, диметилированный по лизину 9 (H3K9me2). Анализ белкового состава района инверсии проводили с помощью иммунопреципитации хроматина. Исследовали распределение белка HP1 и гистона H3, диметилированного либо по лизину 9 (H3K9me2), либо по лизину 4 (H3K4me2), на нормальной и перестроенной хромосомах. Модификация H3K9me2 и белок HP1 характерны для гетерохроматина, тогда как модификация H3K4me2 – для "активного" хроматина. Согласно полученным данным, значимые изменения в сторону обогащения наблюдаются только для белка HP1, в то время как для рассматриваемых модификаций гистона H3 существенных различий не выявлено.

Показанное нами перемещение района инверсии в гетерохроматиновый компартмент ядра в случае линий *D. melanogaster*, гетерозиготных по инверсии, может реализовываться только в результате образования хромосомной петли; следствием этого, по-видимому, и является транс-инактивация генов репортеров.

STUDYING THE LONG-RANGE CHROMOSOMAL INTERACTIONS IN THE CASE OF TRANS-ACTING POSITION EFFECT IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Kibanov M.V., Lavrov S.A., Abramov Y.A., Gvozdev V.A.

Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow

E-mail: mkibanov@gmail.com

Fax: (499) 196-02-21; tel.: (499) 196-08-09

Gene expression is regulated at many levels. Accumulating evidences point to the nuclear architecture and the spatial organization of genome as the major factors in regulation of a single gene expression. Fruit fly *Drosophila melanogaster* is a convenient model system for investigation of such interactions. One of the best-known examples of gene inactivation consequently to the trans-interactions between extensive regions of genome is a mutation *brown*^{Dominant} in *D. melanogaster*, which is caused by insertion of a large block of heterochromatic satellite sequence into the coding region of *brown* gene on the distal end of chromosome 2. In *bw^D/bw⁺* flies, heterozygous on the insertion, this block of heterochromatin acts *in trans* and inactivates wild-type (*bw⁺*) allele of *brown* gene by bringing it into a 'silencing compartment' of the nucleus.

Another example of the long-range chromosomal interactions has been recently described in our laboratory. This genetic system is based on an inversion in the left arm of the chromosome 2, titled A4. In heterozygous, this inversion causes trans-inactivation of the reporter genes located on the normal homologous chromosome. The main purpose of our survey is to investigate molecular bases of this new trans-inactivation phenomenon.

First of all, using methods of fluorescence *in situ*-hybridization on the polytene chromosomes from *D. melanogaster* salivary glands (strain homozygous on the inversion) and PCR technique, we detected the position of an euchromatic breakpoint (BP) at the end of *Mcm10* gene. Then this region was narrowed to 200 bp by means of restriction analysis and Southern hybridization. Now we are using inverse PCR technique to reveal the heterochromatic sequences that have been juxtaposed to the euchromatic BP consequently to the inversion, for better understanding of their possible role in the phenomenon.

The mapping of the euchromatic BP was also important for further studies of the perturbations in nuclear architecture in the event of the inversion, because it allowed us to choose an appropriate DNA probe. This probe, on one hand, must hybridize with the region of the chromosome 2 left unaffected by the chromosomal rearrangement – or we would get artificial data; and, on the other hand, it must be directly juxtaposed to the BP for achieving maximal sensitivity. The approach for determination of spatial location of the inverted chromosomal fragment within the nuclei included hybridization of *D. melanogaster* imaginal disks with two probes against inversion borders, volume scanning of the nuclei by means of confocal microscopy, and data processing using specialized software that allowed reconstruction of 3D-images and measuring of absolute distances between regions of probes hybridization. During scanning of the preparations, we used the nonstandard method of 'online fingerprinting', as a standard 'multi-channel' mode did not achieve complete resolution of fluorophore emission spectra.

As the result, we detected the decrease in a distance between signals in the nuclei of the imaginal disks form the strain homozygous on the inversion, as compared with the control (strain without the inversion). These data suggest a translocation of the inversion region into the heterochromatic compartment of the nucleus.

Now we are working on hybridization and immunostaining of the *D. melanogaster* imaginal disks heterozygous on the inversion. We are also going to conduct a simultaneous RNA-/DNA-hybridization to study the effect of the translocation into the heterochromatic compartment of the nucleus on the expression of reporter genes. The RNA amount will also be measured by reverse transcription and Real-Time PCR.

Theoretically, the translocation of the inverted fragment into the heterochromatic compartment of the nucleus must be accompanied by appearance of the corresponding chromatin proteins, for example, HP1 protein, and of the characteristic histone modifications, such as dimethylation on lysine 9 of histone H3 (H3K9me2). The analysis of the protein composition of the inversion region was carried out using chromatin immunoprecipitation (ChIP). We investigated the distribution of HP1 and histone H3, dimethylated on lysine 9 (H3K9me2) or lysine 4 (H3K4me2), on the rearranged and normal chromosomes. H3K9me2 modification and HP1 protein are characteristic features of heterochromatin, whereas H3K4me2 modification is of 'active' chromatin. According to our data, the significant enrichment was observed only for HP1, whereas there were no essential differences in histone H3 modifications between flies bearing the inversion and wild-type ones.

The detected translocation of the inversion region into the heterochromatic compartment of the nucleus in *D. melanogaster* strains heterozygous on the inversion, may be realized only consequently to the chromatin loop formation. The trans-inactivation of the reporter genes seems to be the consequence of such event.

ИЗМЕНЕНИЕ ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫХ СВЯЗЕЙ В БЕЛКАХ КЛЕЙКОВИНЫ ПРИ ВЛАГО-ТЕПЛОВОЙ ОБРАБОТКЕ ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ УЗБЕКИСТАНА

Кораблёва Н.В., Касымова Т.Д.

Институт химии растительных веществ им. акад. С.Ю. Юнусова АН РУз,
Ташкент, Узбекистан

E-mail: nadya1477@yahoo.com

Факс: (99871) 120-64-75

Внутримолекулярные связи выполняют важные функции по поддержанию нативной конформации белков клейковины, однако механизм их участия в формировании и изменении ее реологических свойств в результате влажно-тепловой обработки зерна пшеницы Узбекистана изучен недостаточно. Среди внутримолекулярных связей в клейковине пшеницы наиболее изучены ковалентные дисульфидные связи, образующиеся за счет остатков цистеина и играющие важную роль в определении структуры и функциональных свойств клейковины. Данные связи являются основной мишенью большинства окислительно-восстановительных реакций, протекающих во время созревания зерна, хранения, помола, приготовления теста и выпечки. В то же время, ковалентная структура клейковинной сети поддерживается за счет нековалентных связей: водородных, ионных и гидрофобных. Этот класс химических связей обладает гораздо меньшей энергией, чем ковалентные связи, но очень важен в обеспечении агрегации белков клейковины и стабилизации структуры теста.

Целью нашей работы было показать влияние различной температуры процесса при влажно-тепловой обработке зерна пшеницы на белки клейковины во взаимосвязи ее реологических свойств, содержания свободных сульфгидрильных групп, дисульфидных, гидрофобных и водородных связей.

Исследование проводили на пшенице сорта Крошка, выращенной в природно-климатических условиях Узбекистана, урожая 2006 и 2008 гг. Влажно-тепловую обработку проводили в интервале температур от 40 до 80°C. Отмечено, что увеличение температуры обработки пшеницы способствует укреплению клейковины и снижению ее гидратационной (водопоглотительной) способности. Показания прибора ИДК-1 изменялись от 110 ед. (III группа качества) в исходной клейковине до 90 ед. (II группа качества) при температуре 70°C.

Методами обращенно-фазовой и эксклюзионной хроматографии установлено, что проведение процесса влажно-тепловой обработки вызывает уменьшение экстрактивности и изменение соотношения высоко- и низкомолекулярных белковых компонентов. При этом повышение температуры обработки выше 60°C во всех случаях, за исключением фракции глютеинов, приводило к уменьшению содержания высокомолекулярных компонентов с одновременным увеличением количества низкомолекулярных. Глютеиновая фракция была более подвержена воздействию высоких температур и обладала большей способностью к агрегации, происходящей, в основном, за счет компонента с молекулярной массой 113,42 кДа.

Полученные данные хорошо согласуются с результатами по исследованию микроструктуры белковых фракций клейковины при проведении процесса влажно-тепловой обработки.

При помощи сканирующей электронной микроскопии было отмечено исчезновение мембраноподобной белковой сети исходной клейковины и ее уплотнение с образованием ровной платоподобной поверхности при 60°C с последующим разрушением и образованием белковой сети с крупными ячейками с многочисленными разрывами стенок при 80°C. Также наблюдали изменения, происходящие с глиадиновой и глютеиновой фракциями. При этом большие сферические частицы глиадина в форме октаэдров при 60°C становились мелкими частицами неправильной формы при 80°C, а ровная платоподобная структура глютеина при 50-60°C изменялась в пористую и неоднородную при 80°C.

Изучена зависимость реологических свойств клейковины пшеницы и ее фракций от наличия свободных сульфгидрильных групп и дисульфидных связей, а также их соотношения при различных режимах влажно-тепловой обработки. Показано, что укрепление клейковины при повышении температуры сопровождается уменьшением количества свободных сульфгидрильных групп и увеличением количества реологически-активных дисульфидных связей, что прослеживается как в самой клейковине, так и в ее белковых фракциях. Увеличение количества реологически-активных дисульфидных связей при увеличении температуры влажно-тепловой обработки возможно связано с частичной денатурацией белковых компонентов клейковины и, как было показано, их расщеплением на компоненты с более низкой молекулярной массой, дисульфидные связи в которых гораздо легче поддаются анализу. Увеличение температуры обработки пшеницы во всех случаях приводило к увеличению соотношения SS/SH-групп.

Методом ИК-спектроскопии установлено, что повышение температуры обработки выше 60°C вызывает увеличение относительной интенсивности полос поглощения, ответственных за водородные связи.

Таким образом, установлено, что при проведении процесса влажно-тепловой обработки происходят значительные изменения во внутримолекулярных связях белковых молекул клейковины, приводящие к существенным изменениям ее реологических свойств, а именно - ассоциации (агрегации) и диссоциации ее основных белковых фракций за счет реакций тиол-дисульфидного обмена, усиления прочности водородных связей и уменьшения гидрофобности.

CHANGES INTRAMOLECULAR BANDS IN THE GLUTEN PROTEINS DURING WATER-THERMAL PROCESSING OF THE WHEAT OF UZBEKISTAN

Korablyova N.V., Kasimova T.D.

Institute of the Chemistry of Plant Substances, A.S. of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Republic of Uzbekistan

E-mail: nadya1477@yahoo.com

Fax: (99871) 120-64-75

Intramolecular bonds realize the important functions to save the natural conformation of the protein's molecules, however, the mechanism of their participation in formation and its change as a result of water-thermal processing is studied insufficiently. Among intramolecular bonds in gluten of the wheat are most studied covalent disulphide bonds formed due to the rests cysteines and playing the important role in definition of structure and functional properties of gluten. These bonds are the main target for the most oxidation-reduction reactions that occur during maturing of grain, storage, milling, dough preparation and a baking. At the same time, covalent structure of gluten networks is supported due to non-covalent bonds: hydrogen bonds, ionic bonds and hydrophobic bonds. This class of chemical bonds is less energetic, than covalent bonds, but is very important in aggregation of gluten proteins and stabilization of dough structure.

The aim of our work was to show influence of various temperature of water-thermal processing of wheat on gluten proteins in its interrelation reological properties, the quantity free sulphhydryl groups, disulphide bonds, hydrophobic and hydrogen bonds.

We studied of the soft wheat, grown up in climate of Uzbekistan, harvest of 2006 and 2008 years. Water-thermal processing spent in an interval of temperatures from 40 up to 80°C.

It is noted, that the increase in processing temperature of wheat promotes strengthening gluten and to its decrease hydration (water-absorbing) ability. Instrument readings of IDK-1 changed from 110 units (III group of quality) in initial gluten up to 90 units (II group of quality) at temperature 70°C.

By methods rapid-phase and size-exclusion HPLC have been established, that carrying out of water-thermal processing are causes change of correlation high- and low-molecular components. Thus, rise of the process temperature above 60°C in all cases, except for glutenin fraction, led to reduction of high-molecular components and simultaneous increase in quantity of low-molecular components. Glutenin fraction has been more subject to influence of heats and possessed greater ability to aggregation occurring, basically, due to a component with Mm 113,42 kDa. Obtained data coordinated well with the results on research of gluten microstructure and its fractions during of water-thermal processing.

The changes occurring in a microstructure of gluten and its fractions at the various temperature modes of conditions process in a range from 40-80°C have been investigated by scanning electronic microscopy. Thus marked disappearance membrane structure protein network initial gluten and its condensation with formation equal sheetlike surfaces at the 60°C with the subsequent destruction,

and formation of the protein network with large cells with their numerous breaks at the 80°C. Also the changes occurring in fractions of gliadin and glutenin at the conditions process have been observed. The greater spherical particles in the form of octahedrons of gliadin transformed at the 60°C into fine particles of the wrong form at the 80°C, and equal sheetlike structure of glutenin at the 50-60°C changed in porous and non-uniform at the 80°C.

Dependence reological properties of gluten and its fractions from presence free sulphhydryl groups and disulphide bonds, and also their correlations is studied at the various temperatures modes of water-thermal processing. It is shown, that strengthening of gluten at rise in temperature is accompanied by reduction of quantity free sulphhydryl groups and increase in quantity reological-active disulphide bonds that is have place both in gluten and in its protein fractions. The increase in quantity of reological-active disulphide bonds at the increasing temperature is probably relation with the partial denaturation of gluten protein components and their splitting on components with lower Mm (as was shown earlier), in which disulphide bonds give in to the analysis is much easier. The increase in temperature of processing of wheat in all cases led to increase in correlation of SS/SH-groups.

By method of IR-spectroscopy it is established, that the increase in temperature of water-thermal processing above 60°C causes increase in relative intensity of absorption strips responsible for hydrogen bonds.

Thus, it is established, that at carrying out of water-thermal processing have place significant changes in intramolecular bonds of protein molecules of gluten, leading to its essential changes of reological properties, associations (aggregation) and dissociation its basic protein fractions due to reactions of sulphhydryl/disulphide exchange, strengthening of durability of hydrogen bonds and reduction of hydrophobic capacity.

**ПОИСК НОВЫХ МИШЕНЕЙ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ ПУТЕМ
АНАЛИЗА ПРОФИЛЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ
В ГЕРМИНАЛЬНЫХ ТКАНЯХ ДРОЗОФИЛ, МУТАНТНЫХ
ПО ГЕНУ *SPN-E***

Корбут А.П., Лавров С.А., Гвоздев В.А.

Институт молекулярной генетики РАН, Москва

E-mail: alincha@yandex.ru

Факс: (499) 196-00-12, тел.: (499) 196-81-73

Значительная часть эукариотических геномов представлена повторяющимися последовательностями ДНК, в том числе мобильными элементами. Избыточная экспрессия таких элементов приводит к мутациям и хромосомным перестройкам, поэтому клетка контролирует ее с помощью специальных механизмов. Подавление экспрессии геномных повторов в зародышевой линии *Drosophila melanogaster* происходит при участии коротких интерферирующих РНК, связанных с повторами – так называемых *gasi*РНК (от *repeat-associated short interfering RNA*). Механизм сайленсинга, опосредованного *gasi*РНК, отличается от механизмов подавления экспрессии при участии *micro*РНК и *si*РНК. *gasi*РНК длиннее, чем *si*РНК и *micro*РНК, и взаимодействуют с другими белками *Argonaute* – белками подсемейства *Piwi*. Регуляция экспрессии при участии *gasi*РНК показана для множества мишеней, но все они представляют собой различные типы повторов. Задействован ли этот механизм или его компоненты в регуляции каких-либо уникальных клеточных генов, на сегодняшний день не известно. Биогенез *gasi*РНК пока изучен слабо, но есть данные о том, что у дрозофилы продукты генов *spn-E* и *armi* играют в нем важную роль. Мутации в этих генах приводят к резкому возрастанию количества транскриптов мобильных элементов в клетках зародышевой линии дрозофилы и исчезновению соответствующих им *gasi*РНК. Мухи, гомозиготные по мутации в *spn-E*, стерильны, у них наблюдаются множественные нарушения гаметогенеза, в том числе миграции, поляризации ооцита и реорганизации цитоскелета цисты.

Идентификация новых партнеров *SPN-E* по взаимодействиям может прояснить связь между двумя известными функциями этого белка – подавлением экспрессии геномных повторов в зародышевой линии и участием в гаметогенезе. Одним из возможных подходов для идентификации новых взаимодействий компонентов системы *gasi*РНК-опосредованного сайленсинга является анализ профилей экспрессии генов в герминальных тканях дрозофил, несущих мутации в генах, необходимых для этого типа сайленсинга. Для этого нами были использованы транскриптомные микрочипы. Была оптимизирована методика амплификации и непрямого мечения РНК из яичников мух, так что соотношение уровней экспрессии генов у мух, гомо- и гетерозиготных по мутации, практически не меняется в ходе амплификации РНК для гибридизации ее с микрочипами. Мы провели экспрессионный анализ РНК из яичников мух, гомо- и гетерозиготных по мутации в *spn-E*. Анализ результатов выявил существенные различия в количестве транскриптов ряда генов между гомо- и гетерозиготами по

мутации. Гены, экспрессия которых увеличивается в герминальных тканях гомозигот по сравнению с гетерозиготами по мутации, возможно, подвергаются подавлению при участии *gasi*РНК. Увеличение экспрессии некоторых генов в яичниках гомозигот по мутации может отражать не исследованные ранее активирующие свойства *SPN-E* или же какие-либо опосредованные взаимодействия. Некоторые из генов, экспрессия которых меняется при мутации *spn-E*, участвуют в метаболизме РНК в яичниках дрозофилы.

Верификация выявленных различий в экспрессии генов проводилась методом количественной ОТ-ПЦР и подтвердила наличие значимых различий в уровне экспрессии ряда генов. В дальнейшем предполагается провести исследования других мутаций, нарушающих *gasi*РНК-опосредованный сайленсинг. В случае совпадения обнаруженных генов-мишеней для разных мутаций можно предположить, что вероятна регуляция при участии *gasi*РНК. Также планируется изучение возможной роли коротких РНК в регуляции экспрессии идентифицированных генов.

SEARCH FOR NEW TARGETS OF RNA INTERFERENCE BY EXPRESSION PROFILING OF GERMINAL TISSUES OF *DROSOPHILA SPN-E* MUTANTS

Korbut A.P., Lavrov S.A., Gvozdev V.A.

Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow

E-mail: alincha@yandex.ru

Fax: (499) 196-00-12, tel.: (499) 196-81-73

Repetitive sequences, including transposable elements, form a considerable part of eukaryotic genome. Overexpression of transposable elements usually results in mutations and chromosomal rearrangements, so they should be under keen cellular control. Silencing of genomic repeats, including mobile elements, in *Drosophila melanogaster* germline is mediated by repeat-associated short interfering RNAs (rasiRNAs) interacting with Argonaute proteins of the Piwi subfamily. rasiRNA-based silencing differs from both the siRNA and microRNA pathways. rasiRNAs are longer than miRNAs and siRNAs and interact with different Argonaute proteins. rasiRNA-mediated regulation of expression has been shown for many target sequences but all of them represent different types of repeats, including transposable elements. It is not known whether some unique cellular genes are regulated by this pathway. Biogenesis of rasiRNAs is still understood poorly but it is known that in *Drosophila spn-E* and *armi* gene products play an important role in it. Mutations in the *spn-E* gene lead to drastic increase of amount of transcripts from repetitive elements. Flies homozygous for mutations in the *spn-E* gene are sterile and manifest multiple aberrations in gametogenesis, including disturbance of oocyte migration, polarization and reorganization of the cyst cytoskeleton.

Identification of new interaction partners of *spn-E* gene product could reveal a linkage between the processes of repeat silencing and correct gametogenesis. A possible approach for identification of new targets of the rasiRNA-mediated silencing machinery is expression profiling of germinal tissues of flies carrying mutations in genes that are necessary for this type of silencing. We optimized the RNA amplification and indirect labeling protocol so that ratios between gene expression levels in flies homozygous and heterozygous for the mutation remained unaffected during amplification. Then we performed expression profiling of ovaries of flies carrying mutations in *spn-E* gene using *Drosophila* transcriptome microarrays. Our analysis revealed significant alterations in abundance of some transcripts in homozygous mutant flies in comparison to heterozygous control flies. We identified genes that are upregulated and downregulated in homozygous mutant flies. Upregulated genes may be subjected to rasiRNA-mediated silencing. Downregulation may reflect unexplored activating function of the rasiRNA pathway components or some type of indirect interactions. Several affected genes participate in RNA metabolism in *Drosophila* ovary. Validation of putative targets was performed by quantitative RT-PCR and confirmed transcript abundance differences for some genes. We are going to analyse other mutations that disrupt rasiRNA-mediated silencing. If same targets for different mutations are found, regulation by the rasiRNA pathway is plausible for such targets. Further research includes investigation of the role of rasiRNA-mediated silencing machinery in regulation of their expression.

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ЛИПОСОМЫ С ДИГЛИЦЕРИДНЫМИ КОНЬЮГАТАМИ МЕТОТРЕКСАТА И МЕЛФАЛАНА: ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ С КОМПОНЕНТАМИ КРОВИ

Кузнецова Н.Р., Кандыба А.Г., Бовин Н.В., Севрин Ш., Леснино Д.*, Гранфис К.*, Водовозова Е.Л.*

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

*Центр исследования биоматериалов Университета Льежа, Бельгия

E-mail: natalia@lipids.ibch.ru

Факс: (495) 330-66-01; тел.: (495) 330-66-10

Наноразмерные системы доставки лекарств, в том числе липосомы – это многообещающий подход к лечению онкологических и воспалительных заболеваний. Эффективность терапии в данном случае повышается за счет уменьшения общей токсичности препаратов и увеличения их накопления в очагах патологии (*пассивный транспорт*). Однако, технологичные методы включения в состав липосом водорастворимых лекарств разработаны лишь для ограниченного круга препаратов, имеющих амфифильную катионную или анионную структуру молекул [1]. Способ получения лекарственных липосом существенно упрощается, если включать в них препараты в виде липофильных пролекарств (расщепляемых внутриклеточными ферментами с высвобождением исходного агента) [2]. Более того, известно, что липофильные пролекарства обладают улучшенной фармакокинетикой. Для достижения *активного транспорта* липосомы могут быть оснащены углеводными лигандами семейства сиалил Льюис, которые специфичны к селектинам – углеводсвязывающим гликопротеинам, повышенно экспрессирующимся на поверхности клеток эндотелия, активированного в очагах воспаления и неоваскуляризации [2, 3].

Нами исследована физико-химическая стабильность липосом, нагруженных 1,2-диолеилглицеридными сложноэфирными производными широко применяемых в клинике препаратов метотрексата и мелфалана (**MTX-DG** и **Mlph-DG**, соответственно). Липосомы получали методом экструзии через мембранные фильтры с порами 100 нм из смеси яичный фосфатидилхолин (**PC**) – фосфатидилинозит (**PI**) из пекарских дрожжей – **MTX-DG/Mlph-DG**, 8:1:1 (мол.). По данным динамического лазерного светорассеяния, электронной микроскопии, гель-хроматографии, спектрофотометрии и элементного анализа на фосфор, пролекарства полностью (10 мол. %) встраиваются в липидный бислой моноамеллярных липосом среднего размера, менее 100 нм [4]. Нами также установлено, что **MTX-DG** и **Mlph-DG** в липосомальных формах устойчивы к преждевременному гидролизу внеклеточными эстеразами крови человека: с помощью ВЭЖХ-анализа показано, что при инкубации липосом в плазме *in vitro* при 37°C вплоть до 24 ч расщепления пролекарств не происходит [5].

Липосомальные препараты **MTX-DG** и **Mlph-DG** предназначены для системного введения, поэтому исследования их гемосовместимости являются

обязательными. Нами проведена серия испытаний липосом *in vitro*, включающая следующие эксперименты: тесты на гемолиз; исследования морфологии, распределения по размерам и количеству эритроцитов и тромбоцитов; анализ степени активации системы комплемента, а также каскада коагуляции. Исследовали также препараты лекарственных липосом с углеводными лигандами семейства сиалин Льюис (диолеилглицеридные ПЭГ-содержащие конъюгаты **SiaLe^a/SiaLe^x-PEG-DG**, 2 мол %). Тесты на гемосовместимость проводили в соответствии с рекомендациями Международной организации по стандартизации ISO (10993-4).

Липосомы, нагруженные **Mlph-DG**, как с углеводными лигандами, так и без них, не проявили значительной реактивности по отношению к компонентам крови ни в одном из тестов. В отличие от них, **MTX-DG** в липосомальной форме замедлял коагуляцию и вызывал активацию системы комплемента, причем в концентрационно-зависимой форме. На гемореактивность липосом не влияли структура углеводного лиганда, а также наличие или отсутствие **PI**, выполняющего роль поверхностно-стабилизирующего фактора в составе липосом. Угнетение коагуляционной активности и активация системы комплемента, вероятно, связаны с адсорбцией на отрицательно заряженной поверхности **MTX**-липосом белковых компонентов, вовлеченных во взаимосвязанную сеть каскадов систем активации коагуляции и комплемента. Важно, что влияние на системы коагуляции и комплемента значительно уменьшалось при понижении нагрузки липосом **MTX-DG** от 10 до 2.5 мол. %.

Проведенная серия тестов на гемосовместимость является скрининговой и предназначена для исключения абсолютно неприемлемых препаратов. Наши данные свидетельствуют в пользу относительной толерантности липосомальной системы по отношению к компонентам крови, несмотря на некоторые нежелательные эффекты, обусловленные природой самого исходного лекарства. Дальнейшие исследования профиля белков, связываемых липосомами, позволят выявить природу обнаруженной активности **MTX**-липосом и оптимизировать препарат.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 06-04-49432) и FEBS Collaborative Experimental Scholarships for Central & Eastern Europe.

Литература

1. Zucker D., Marcus D, Barenholz Y. et al. (2009) *J. Control Release*. [Epub ahead of print].
2. Vodovozova E.L., Moiseeva E.V., Grechko G.K. et al. (2000) *Eur. J. Cancer*. **36**, 942-949.
3. Ehrhardt C., Kneuer C., and Bakowsky U. (2004) *Adv. Drug Del. Rev.* **56**, 527-549.
4. Vodovozova E.L., Kuznetsova N.R., Kadykov V.A. et al. (2008) *Nanotechnologies in Russia*. **3**(3-4), 228-239.
5. Kuznetsova N., Kandyba A., Vostrov I. et al. (2009) *J. Drug Deliv. Sci. Techn.* **17**(1), 51-59.

ANTITUMOR LIPOSOMES LOADED WITH DIGLYCERIDE ESTERS OF METHOTREXATE AND MELPHALAN: STUDIES ON STABILITY AND HEMOCOMPATIBILITY

*Kuznetsova N.R., Kandyba A.G., Bovin N.V., Sevrin C. *, Lespineux D. *, Grandfils C. *, Vodovozova E.L.*

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

*Research Center of Biomaterials, University of Liège, Liège, Belgium

E-mail: natalia@lipids.ibch.ru

Fax: (495) 330-66-01; tel.: (495) 330-66-10

Nanoscale drug delivery systems, including liposomes, offer promising approaches for the treatment of cancers and inflammatory diseases as they allow for increased therapeutic efficacy through lower systemic toxicity and higher rates of drug accumulation at pathology sites (*passive targeting*). However, efficient technology of liposome loading with water-soluble drugs has been developed for a limited number of molecules of amphiphilic cationic or anionic nature [1]. Meanwhile, liposome preparation procedure is significantly simplified through incorporation of lipophilic prodrugs into the lipid bilayer, free drug being released upon enzymatic cleavage of the prodrug inside target cells [2]. Besides, lipophilic prodrugs are known to exhibit improved pharmacokinetics. *Active targeting* may be achieved through grafting of carbohydrates of sialyl Lewis (SiaLe) family onto the surface of liposomes, as they are known to be ligands to selectins, a group of cell adhesion glycoproteins expressed on activated endothelium cells at inflammatory and neovascularization sites [2,3].

Liposomes loaded with 1,2-dioleoylglyceride esters of widely used chemotherapeutics methotrexate and melphalan (**MTX-DG** and **Mlph-DG**, respectively) were studied in terms of their physicochemical stability. Liposomes composed of egg phosphatidylcholine (**PC**) – phosphatidylinositol (**PI**) of baker's yeast – **MTX-DG/Mlph-DG**, 8:1:1 (by mol), were prepared by extrusion through polycarbonate membrane filters with mean pore diameter of 100 nm. According to dynamic laser light scattering, electron microscopy, gel filtration, spectrophotometry, and elemental analysis of phosphorus concentration data, the prodrugs incorporate completely into lipid bilayer of monolamellar liposomes less than 100 nm in diameter [4]. We have also demonstrated **MTX-DG** and **Mlph-DG** liposomal formulations to be stable towards premature hydrolysis by extracellular esterases during incubation in human plasma at 37°C up to 24 h *in vitro* [5].

As liposomes are to be administered systemically, there is no doubt hemocompatibility studies of the liposomal formulations are obligatory. In this respect, the following panel of tests was performed: hemolysis test; red blood cell morphology, counting, and size distribution; platelet counting and size distribution; complement activation; and coagulation cascade activation. Liposomes loaded with **MTX**- or **Mlph-DG** either equipped with glycoconjugate vectors (diglyceride-PEG conjugates of **SiaLe^a/SiaLe^x**, 2 mol %) or not, were studied. *In vitro* hemocompatibility tests of the liposomal formulations were performed according to ISO standards (10993-4).

Liposomes loaded with **Mlph-DG**, either targeted or not, didn't exhibit any significant hemoreactivity. On the opposite, liposomes containing **MTX-DG** induced elevated C3a levels and abnormal coagulation times in a concentration dependent manner. The reactivity of liposome surface wasn't influenced by the structure of carbohydrate ligand attached (SiaLe^x versus SiaLe^e) or by the presence or absence of **PI**, an anti-opsonizing component of the formulation. So far, reduction in coagulation activity in the presence of MTX-liposomes and their interference with the complement cascade may be ascribed to physical adsorption of at least one of the protein components involved in the interrelated coagulation and complement activation cascades on the negatively charged surface of MTX-liposomes. In this respect, important is the fact that the effect produced on complement and coagulation systems was considerably reduced by decrease of liposome loading with **MTX-DG** from 10 to 2.5%.

These hemocompatibility tests are of screening nature, meaning they are designed to distinguish between tolerated and unsustainable candidates for drug delivery systems. The data obtained so far proved the relatively good hemotolerance of the liposomes loaded with lipophilic prodrugs despite of some undesirable yet manageable effects on coagulation and complement activation linked to the nature of the drug. Further studies on liposome-plasma protein binding profiles are required for elucidating the effect of coagulation and complement cascades promotion by MTX-liposomes.

The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 06-04-49432) and FEBS Collaborative Experimental Scholarships for Central & Eastern Europe.

References

1. Zucker D., Marcus D, Barenholz Y. et al. (2009) *J. Control Release*. [Epub ahead of print].
2. Vodovozova E.L., Moiseeva E.V., Grechko G.K. et al. (2000) *Eur. J. Cancer*. **36**, 942-949.
3. Ehrhardt C., Kneuer C., and Bakowsky U. (2004) *Adv. Drug Del. Rev.* **56**, 527-549.
4. Vodovozova E.L., Kuznetsova N.R., Kadykov V.A. et al. (2008) *Nanotechnologies in Russia*. **3**(3-4), 228-239.
5. Kuznetsova N., Kandyba A., Vostrov I. et al. (2009) *J. Drug Deliv. Sci. Techn.* **17**(1), 51-59.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ, НЕСУЩИХ СУИЦИДАЛЬНЫЙ ГЕН ПОД КОНТРОЛЕМ ОПУХОЛЬ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПРОМОТОРА НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ ЧЕЛОВЕКА

Кузьмин Д.В., Митяев М.В., Виноградова Т.В., Копанцев Е.П., Свердлов Е.Д.

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

E-mail: denisk@list.ru

Факс: (495) 330-65-38; тел.: (495) 330-69-92

Цель исследования. Одним из наиболее перспективных подходов к лечению онкологических заболеваний является использование стратегии суицидальной генотерапии, которая основывается на избирательной экспрессии генов терапевтического вмешательства в опухолевых клетках. Группа генов суицидального воздействия способна превращать нетоксичное для человека соединение в потенциальный цитостатик, вызывая тем самым гибель раковых клеток. Главным ограничением в использовании суицидальной генотерапии является отсутствие генно-инженерных векторов невирусного происхождения, которые могли бы обеспечить высокую эффективность доставки, а также отсутствие специфической экспрессии суицидальных генов в раковых клетках. Одним из возможных вариантов решения данной проблемы является создание терапевтических систем, в которых использовались бы гены суицидального воздействия под контролем опухоли- и тканеспецифичных регуляторных элементов. Цель исследования - создание и анализ эффективности генно-инженерных конструкций, несущих суицидальный ген гибридной дрожжевой цитозиндезаминазы/урацил фосфорибозилтрансферазы (*yCD/yUPRT*) под контролем конститутивного и опухолиспецифического промоторов.

Материалы и методы. Фрагменты генов цитозиндезаминазы (*yCD*) и урацил фосфорибозилтрансферазы (*yUPRT*) были амплифицированы на матрице геномной ДНК штамма *Saccharomyces cerevisiae* arg4 и клонированы в вектор pGL3-Basic Vector ("Promega") таким образом, чтобы оба гена находились в одной рамке считывания. Гибридный ген *yCD/yUPRT* клонировали под контролем двух промоторов: конститутивного промотора CMV и опухолиспецифического промотора гена *BIRC5* (*Baculoviral Inhibitor of Apoptosis Repeat-Containing Type 5*). Функциональную активность созданных экспрессионных конструкций анализировали методами трансфекции клеток и Western blot анализа с антителами к цитозиндезаминазе. Для повышения активности промотора гена *BIRC5* использовали модифицированную систему Cre-LoxP. Количественную оценку цитотоксического эффекта созданных экспрессионных конструкций проводили при помощи ММТ теста клеток линий НЕК293 и Calu1, предварительно трансфицированных генно-инженерными конструкциями и последующей обработкой клеток 5-фторцитозином.

Результаты. Были созданы экспрессионные конструкции на основе вектора pGL3-Basic Vector ("Promega"), несущие гибридный ген цитозиндезаминазы-урацил фосфорибозилтрансферазы под контролем двух промоторов: CMV и pSurv4. Была продемонстрирована эффективность полученных экспрессионных конструкций в фторцитозин-зависимой супрессии клеточного роста на модели клеток линий HEK293 и Calu1. Показано, что с помощью Cre-LoxP-системы можно существенно усилить активность раковоспецифичного промотора и, как следствие, повысить опухольнаправленную цитотоксичность киллерного агента цитозиндезаминазы/урацил фосфорибозилтрансферазы. Подобраны оптимальные условия для использования данной терапевтической системы (концентрация 5-фторцитозина, время инкубации с пролекарством, соотношение киллерного и активационного векторов).

Заключение. Полученные данные по количественной оценке цитотоксического эффекта созданных генно-инженерных конструкций указывают на высокий терапевтический потенциал данных экспрессионных конструкций в экспериментах *in vitro*. Созданная в рамках экспериментальной работы генно-инженерная система может лечь в основу перспективных таргетных лекарственных противораковых препаратов. Разработанная терапевтическая система в дальнейшем может быть испытана на различных культурах раковых клеток и на экспериментальных животных.

Работа выполнена в рамках Федеральной программы 2007-2012 (Государственный контракт 02.522.11.2005).

STUDY OF THE INFLUENCE OF GENE-ENGINEERED CONSTRUCTS, CARRIING GENE OF SUICIDAL ACTION UNDER THE CONTROL OF TUMOR SPECIFIC PROMOTER IN THE HUMAN CANCER CELL LINES

Koozmin D.V., Mityaev M.V., Vinogradova T.V., Kopantsev E.P., Sverdlov E.D.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: denisk@list.ru

Fax: (495) 330-65-38; tel.: (495) 330-69-92

The aim of the research. Using of the strategy of suicide gene therapy, based on selective expression of genes of therapeutic action in tumor cells, is one of the most promising approaches for cancer treatment. The group of genes of suicidal action are able to convert of a non-toxic for human prodrug into potential cytostatic drug, thereby kills the tumor cells. The major obstacle for using of suicide gene therapy is the lack of suitable non-viral based vectors for tumor specific gene delivery and tumor specific expression of suicide genes. One of the possible approaches to solve this problem is constructing of therapeutic system, which use suicide genes under the control of tumor and tissue specific regulatory elements. The aim of our research was construction and efficiency evaluation of gene-engineered vectors, carrying fusion suicide gene, composed of the yeast cytosine deaminase (*yCD*)/yeast uracil phosphoribosyltransferase (*yUPRT*) under the control of constitutive and tumor specific promoters.

Materials and methods. Genomic DNA of *Saccharomyces cerevisiae*, strain arg4, was employed to amplify *yCD* and *yUPRT* fragments. The products of amplification were cloned to the pGL3-Basic Vector ("Promega"). Both genes were in the same reading frame. Bifunctional fusion gene *yCD/yUPRT* was placed under the control of two promoters: constitutive CMV promoter and tumor specific *BIRC5* (*Baculoviral Inhibitor of Apoptosis Repeat-Containing Type 5*) promoter. To analyze the functional activity of engineered vectors a Western blot analysis was done for yeast CD. To enhance *BIRC5* promoter activity we used modified Cre-loxP system. We transfected HEK293 and Calu1 cells with engineered vectors in combination with 5-fluorocytosine (5-FC) and used MTT-assay for quantitative evaluation of cytotoxic effects.

Results. We generated therapeutic plasmids based on pGL3-Basic Vector ("Promega"), carrying fusion gene *yCD/yUPRT* under the control of CMV and *BIRC5* promoters. We demonstrated the efficiency of generated vectors in 5-FC-dependent suppression of cell growth on HEK293 and Calu1 cell models. It was shown, that Cre-LoxP system may significantly enhance tumor-specific promoter activity, thereby evaluate tumor-directed cytotoxicity of the *yCD/yUPRT* killer agent. We developed optimal conditions for employment of this therapeutic system (5-FC concentration, prodrug incubation time, ratio between killer and activation vectors).

Conclusion. Data obtained on quantitative evaluation of cytotoxic effect for generated vectors demonstrate their high therapeutic potential in experiments *in vitro*. Generated in this experimental work vector based system may serve as the platform for perspective target antitumor drugs. In future, this designed therapeutic system could be tested on different tumor cell lines and on experimental animals.

This work was performed as part of Federal program 2007-2012 (National contract 02.522.11.2005).

СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ И РЕФОЛДИНГ G-БЕЛОК СОПРЯЖЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Кузьмищев П.К., Чупин В.В., Петровская Л.Е.*, Арсеньев А.С.**

Московский физико-технический институт (Государственный университет), Долгопрудный МО

*Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

E-mail: pavel.kuzmichev@gmail.com

Факс: (495) 335-50-33; тел.: (495) 335-27-33

G-Белок-сопряжённые рецепторы (GPCRs) представляют собой семейство порядка 800 трансмембранных белков. Все молекулы GPCRs состоят из одной полипептидной цепи, содержащей 7 трансмембранных альфа-спиральных участков. GPCRs участвуют в передаче сигналов через клеточную мембрану и регулируют многие физиологически важные процессы. Рецепторы семейства GPCR являются мишенями для многих лекарственных препаратов. Для понимания механизмов функционирования клетки и создания новых лекарственных препаратов необходимо знание пространственной структуры GPCRs. В связи с этим, в последнее десятилетие проводились интенсивные исследования по разработке методологии получения GPCRs и определения их пространственной структуры. В результате, недавно методами рентгеноструктурной кристаллографии определена пространственная структура двух представителей семейства GPCRs. Необходимо отметить, что данный подход позволяет получить лишь статическую структуру рецепторов в кристалле, а не в мембранном окружении. В принципе, эта проблема может быть решена методами ЯМР спектроскопии, которые позволяют определить не только пространственную структуру, но и динамику белковых молекул в средах, моделирующих мембранное окружение. Необходимым условием проведения таких ЯМР экспериментов является возможность получения изотопно-меченных рецепторов в миллиграммовых количествах, и сольюбилизация их в средах, имитирующих окружение биологических мембран, обеспечивающих фолдинг белка. Была разработана технология получения целого ряда GPCRs, включая изотопно-меченные, путем экспрессии рецепторов в бактериях *E.coli*. К сожалению, все полученные рецепторы образовывали олигомеры. В то же время известно, что рецепторы функционально активны в мономерной или димерной формах.

Целью данной работы явилась разработка технологии сольюбилизации и рефолдинга GPCRs в форме мономера в составе мицелл из детергентов, имитирующих свойства мембраны. Отработка условий сольюбилизации проводилась на примере одного из представителей семейства GPCRs, β -2-адренергического рецептора (β 2AR).

β -2-AR рецептор получали экспрессией в тельца включения в бактериях *E.coli*, сольюбилизировали в лаурилсаркозине и выделяли с помощью металлохелатной хроматографии. Данные гель-электрофореза и

динамического светорассеяния свидетельствовали о том, что рецептор в мицеллах лаурилсаркозина находился в олигомерной форме.

Образование олигомеров рецептором обусловлено межмолекулярными гидрофобными взаимодействиями и образованием межмолекулярных дисульфидных связей. Для разрушения гидрофобных взаимодействий использовался избыток различных детергентов и их смесей, проводилась длительная обработка ультразвуком. Дисульфидные связи восстанавливались различными агентами, из которых наиболее эффективным оказался гидрофобный триметилловый эфир трис(2-карбоксиэтил)фосфина. Однако, получить рецепторы в мономерной форме не удалось. Вероятно, дисульфидные связи в гидрофобных трансмембранных областях молекулы белка малодоступны для восстановителей. В связи с этим были сделаны замены "функционально незначимых" остатков цистеина из мембранных доменов белка на структурно аналогичные остатки валина и серина, не вступающие в образование межмолекулярных ковалентных связей. Для данной мутантной формы β -2-AR нами были исследованы различные методы сольюбилизации в различных детергентах и их смесях, подобраны условия восстановления дисульфидных связей. В итоге был разработан протокол сольюбилизации, основанный на встраивании в мицеллы полностью развёрнутой в растворе муравьиной кислоты белковой глобулы с предварительно разомкнутыми дисульфидными связями, удалением остатков муравьиной кислоты лиофилизацией и регидратацией образца. Данные электрофореза и динамического светорассеяния свидетельствуют о том, что сольюбилизированная в мицеллах по нашему протоколу мутантная форма рецептора β -2-AR находится преимущественно в виде мономера, а данные спектроскопии кругового дихроизма показывают, что белок-рецептор сформировал необходимые элементы вторичной структуры. В качестве детергентов наиболее эффективными оказались структурно близкие аналоги липидов додецилфосфохолин, тетрадецилфосфохолин, гексадецилфосфохолин, 1-миристоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-[фосфо-*rac*-(1-глицерин)] и их смеси. Мицеллы со встроенным рецептором имеют относительно небольшой размер, стабильны во времени и могут использоваться для проведения структурных исследований методами ЯМР высокого разрешения.

Разработанная технология успешно использовалась также для сольюбилизации другого представителя GPCRs – меланокортинового рецептора MC2R.

SOLUBILIZATION AND REFOLDING OF G-PROTEIN COUPLED RECEPTORS

Kuzmichev P.K., Chupin V.V., Petrovskaya L.E.*, Arseniev A.S.**

Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudnij Moscow reg.

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: pavel.kuzmichev@gmail.com

Fax: (495) 335-50-33; tel.: (495) 335-27-33

G-Protein coupled receptors (GPCRs) are a large family of about 800 transmembrane proteins. All GPCRs molecules consist of polypeptide chain with 7 transmembrane helix segments. GPCRs are taking part in signal transduction through the cell membrane and regulating numerous significant physiological processes. GPCRs are targets for lots of commercial drugs. It is necessary to know three-dimensional structures of GPCRs to understand cell functioning mechanisms and create novel drugs. Last 10 years there were intensive investigations to developing methodology of obtaining GPCRs and estimating their structures. Lately, structures of two members of GPCR family were resolved by X-ray crystallography. It should be noted that with this method we can only determine the static structure of receptors in crystal, not in membrane environment. This problem could be solved by NMR spectroscopy methods which allow us to find the structure and dynamics of protein molecules in membrane mimetic environment. For NMR experiments we need to obtain milligrams of isotopic labeled receptors and solubilize proteins in membrane mimetic media providing protein folding. New technology producing a number of GPCRs in *E.coli* was developed, including isotopic labeled samples. Unfortunately all receptors formed oligomers. Coincidentally it is known that GPCRs functionally active in monomeric or dimeric stage.

The goal of this work was developing new technique of solubilization and refolding GPCRs in monomeric form in membrane mimetic detergent micelles. Conditions optimization was performed on the member of GPCRs family, β -2-adrenergic receptor (β 2AR).

β -2-AR receptor was obtained by expression in inclusion bodies in *E.coli*, solubilized in lauroyl sarcosine and separated with Ni-affinity chromatography. Gel-electrophoresis and dynamic light scattering data were suggesting that receptor in lauroyl sarcosine micelles was in oligomeric stage.

Oligomers formation attributed to intermolecular hydrophobic interactions and intermolecular disulfide bonds formation. For destruction hydrophobic interactions excess of different detergents and ultrasonic treatment were used. Disulfide bonds were deoxidized with different reducing reagents, the most effective agent was trimethyl ether of tris(2-carboxyethyl)phosphine. However we do not succeeded to obtain receptors in monomeric form again. Probably disulfide bonds in hydrophobic transmembrane domains of protein globule are difficult to access for reducing reagents. As a result exchanges of "functional not significant" amino acid residues cysteines from transmembrane domains to structural similar residues valine and serine were taken, which are not leading to intermolecular covalent

bonds formation. For this mutation form β 2AR we investigated different solubilization methods in various detergents and their mixture, checked the conditions for reducing disulfide bonds. As a result we had developed the solubilization protocol which based on building into micelles full-unfolded in formic acid protein globule with preliminary reducing disulfide bonds, removing formic acid by lyophilizing and rehydration the sample. Gel-electrophoresis and dynamic light scattering data were suggesting that solubilized by our protocol mutant receptor β 2AR was predominantly in monomeric stage. And circular dichroism data were saying that protein-receptor formed all secondary structure. The most effective detergents were lipid-structural analogs: dodecylphosphocholine, tetradecylphosphocholine, hexadecylphosphocholine, 1-myristoyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)] and their mixtures. Micelles with receptor were small, stable in time. Thus they were convenient for structural investigations by NMR spectroscopy.

This technique was successfully used to another member of GPCRs family – melanocortin-2 receptor (MC2R).

ТРЕХМЕРНЫЕ ХИТИНОВЫЕ МАТРИЦЫ ИЗ МОРСКИХ ГУБОК И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Курек Д.В.***, Варламов В.П.*, Эрлих Г.**

*Центр "Биоинженерия" РАН, Москва, Россия

**Институт биоаналитической химии, Технический университет Дрездена,

Дрезден, Германия

E-mail: svoboda_rus@mail.ru

Начиная с 1823 года, различные авторы показали присутствие хитина во всех видах беспозвоночных. Однако, этот биополимер вряд ли ассоциируется с морскими губками (Porifera) – первыми известными представителями царства животных (Metazoa). Наши недавние исследования губок *Verongula gigantea* [1] показали наличие хитина в скелетных структурах и свидетельствуют о фундаментальной роли хитина в эволюции самого раннего представителя царства животных и их скелетов. Основываясь на этом наблюдении, мы расширили наши исследования, касающиеся идентификации хитина в других губках класса Веронгид. Внутренние скелеты губок *Aplysina aerophoba*, *A. cavernicola*, *A. gerardogreeni*, *A. fulva*, *A. cauliformis* и *Ianthella basta* [2], собранных в различных регионах мира, были изучены с использованием целого ряда аналитических методов (ИК-спектрометрия, Раман-спектрометрия, твердофазная ЯМР-спектроскопия, окрашивание селективным реагентом Calcofluor White и хитиназный тест). Впервые было показано, что хитин является основным компонентом в скелетных структурах этих морских губок. Хитин в морских губках представляет собой особый интерес, поскольку его присутствие в скелете подтверждает существование этого важного биополимера на несколько сотен миллионов лет ранее, чем он появился в скелетах членистоногих. Аналитические исследования показали, что губочный хитин ближе к альфа-хитину, чем к бета-хитину, присутствующему в других беспозвоночных. Нановолокнистая организация, трехмерная структура, большая внутренняя емкость таких матриц являются теми определяющими свойствами, из-за которых такой новый биоматериал из морских губок будет широко использоваться в биотехнологии. Например, сейчас проводятся эксперименты по частичному деацетилированию этих матриц. Получение свободных NH₂-групп на поверхности трехмерной структуры скелета позволит иммобилизовать различные функциональные белки или другие полезные макромолекулы в целях получения, так называемых, биофабрик. Например, иммобилизованные ферменты могут быть использованы для проведения высокоселективных реакций, которые не могут быть выполнены химическим путем. Такие случаи характерны для фармацевтики, требующей высокой селективности и минимального вмешательства посторонних химических реагентов. Кроме того, хитиновые матрицы могут быть использованы в качестве сорбентов для удаления тяжелых металлов или в качестве аффинных сорбентов для очистки рекомбинантных белков [3].

Литература

1. H. Ehrlich et al. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)*, 2007, **308B**, 347-356.
2. E. Brunner et al. *J. Str. Biol.*, 2009, in press.
3. Д. В. Курек, С. А. Лопатин В. П. Варламов. *Прикл. биохимия и микробиология*. 2009. **45**(1), 5-13.

THREE-DIMENSIONAL CHITINOUS MATRICES FROM MARINE SPONGES AND THEIR FUTURE APPLICATIONS FOR BIOTECHNOLOGY

Kurek D.V.***, Varlamov V.P.*, Ehrlich H.**

*Centre "Bioengineering" RAS, Moscow, Russia

**Institute of Bioanalytical Chemistry, Dresden University of Technology,

Dresden, Germany

E-mail: svoboda_rus@mail.ru

Since 1823, different authors have demonstrated the presence of chitin in all kind of invertebrates. In contrast, this biopolymer could not be identified within sponges (Porifera) – the first known representatives of Metazoa. Our recent observation of endogenous chitin within skeletal formations of *Verongula gigantea* [1] highlights the fundamental role of chitin in the evolution of the earliest metazoans and their skeletons. Based on this observation, we have extended our studies concerning chitin identification to other verongid sponges. The internal skeletons of *Aplysina aerophoba*, *A. cavernicola*, *A. gerardogreeni*, *A. fulva*, *A. cauliformis* and *Ianthella basta* [2] collected in different regions of the world were studied using different analytical techniques (FTIR, Raman and solid-state NMR spectroscopy, Calcofluor White staining, and chitinase test). It could be shown for the first time that chitin is an integral main component of the skeletal fibers of these marine sponges. Chitin as a skeletal material in sponges is of special interest as its presence proves the existence of this important biopolymer several hundred million years before the appearance of chitin in arthropod skeletons. Analytical results revealed that sponge chitin is closer to alpha-chitin known from other invertebrates than to beta-chitin.

Because of the nanofibrillar organization, and three-dimensional structure we believe that this chitinous matrices will be widely used in the field of biotechnology. For example, partial deacetylation experiments of these matrices are now in progress. Obtaining of free amino-groups on the surface of three-dimensional biomaterial will lead to a possibility of immobilizing of various proteins or other useful macromolecules in order to obtain such a biofactories. For example, immobilized enzymes could be used for performing highly selective reactions, which cannot be accomplished by a chemical synthesis. Such cases are typical for pharmaceuticals requiring high selectivity and minimum interference of extraneous chemicals.

In addition, such chitinous matrices could be used as sorbents for removal of heavy metal ions or as an affinity sorbents for the purification of recombinant proteins [3].

References

1. H. Ehrlich et al. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)*, 2007, **308B**, 347-356.
2. E. Brunner et al. *J. Str. Biol.*, 2009, in press.
3. D. V. Kurek, S. A. Lopatin, V. P. Varlamov. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2009, **45**, 1-8 (in russian).

СИНТЕЗ И ФОТОХРОМНЫЕ СВОЙСТВА ПОЛИЕНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ СПИРОПИРАНОВ

Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Беликов Н.Е., Земцов Р.В., Ходонов А.А., Швец В.И., Барачевский В.А. *, Демина О.В. **

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

*Центр фотохимии РАН, Москва

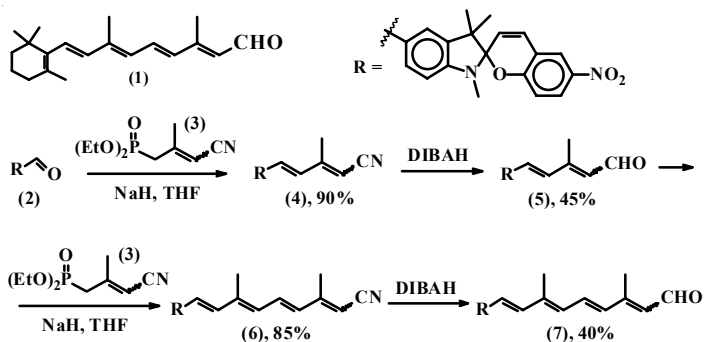
**Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

E-mail: biolara@inbox.ru

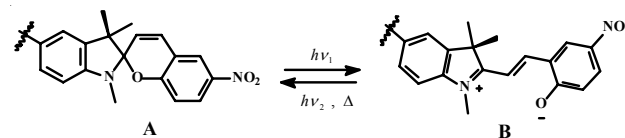
Факс: (495) 434-82-33; тел.: (495) 936-88-96

Синтетические исследования в области получения новых производных фотохромных соединений, являются весьма актуальными в настоящее время. Данная работа посвящена разработке методов получения полиеновых производных фотохромных соединений ряда спиропиранов, содержащих неопределенный фрагмент в пятом положении индолинового фрагмента молекулы.

Опробованная нами ранее универсальная экспериментальная процедура наращивания полиеновой цепи молекулы ретиноидов [1-3] была успешно применена в этом исследовании для синтеза новых производных спиропиранов.



Ключевой стадией синтеза являлось олефинирование по Хорнеру-Эммонсу C_5 -фосфонатным реагентом карбонильного предшественника (2). Полученные промежуточные нитрилы были восстановлены в альдегиды при помощи DIBALH при $-90^\circ C$. Повторение вышеперечисленных стадий олефинирования и восстановления для (5,6) позволило получить целевой аналог ретиналя (7) с общим выходом 14%. Вновь образованные $C=C$ -связи имели *E*-конфигурацию по данным 1H -ЯМР-спектров (J 16.3 Гц). Целевые и промежуточные соединения получены в препаративных количествах, их структуры доказаны набором физико-химических методов анализа.



Было проведено исследование фотохромного поведения набора синтезированных соединений (2,4-7) в полярном растворителе – этаноле и малополярном – толуоле. Выявлена зависимость эффективности фотодеградации полиеновых спиропиранов от природы растворителя.

Нами было обнаружено снижение эффективности фотохромных превращений и скорости темновой циклизации фотоиндуцированной мероцианиновой формы (B) при увеличении длины полиенового заместителя с одновременным повышением устойчивости фотохромных спиропиранов к фотодеградации в этаноле, по сравнению с толуолом. Это явление можно объяснить стабилизацией фотоиндуцированных мероцианиновых форм молекул вследствие образования водородных связей между ними и молекулами растворителя. В отличие от спектральных характеристик спиропирановой формы положение максимумов полос поглощения и мономерной, и агрегированной фотоиндуцированных форм фотохромных ретиналей слабо зависит от природы и длины полиеновых заместителей. Это можно объяснить тем, что сопряжение между полиеновой цепочкой и мероцианиновой формой спиропирана практически отсутствует.

Литература

1. Лаптев А.В., Беликов Н.Е., Лукин А.Ю. и др. *Биоорганическая химия*, 2008, Т. 34, № 2, С. 276-284.
2. Belikov N.E., Lukin A.Yu., Laptev A.V., et al. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, 2008, V. 196, N 2-3, P. 262-267.
3. Khodonov A.A., Shevyakov S.V., Mironova E.V., et al. *Molecular Crystals, Liquid Crystals*, 2000, V. 345, P. 317-322.

SYNTHESIS AND PHOTOCHROMIC PROPERTIES OF POLYENIC SPIROPYRAN DERIVATIVES

Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Zemtsov R.V., Khodonov A.A.,
Shvets V.I., Barachevsky V.A. *, Demina O.V. **

M.V. Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow

*Photochemistry Center RAS, Moscow

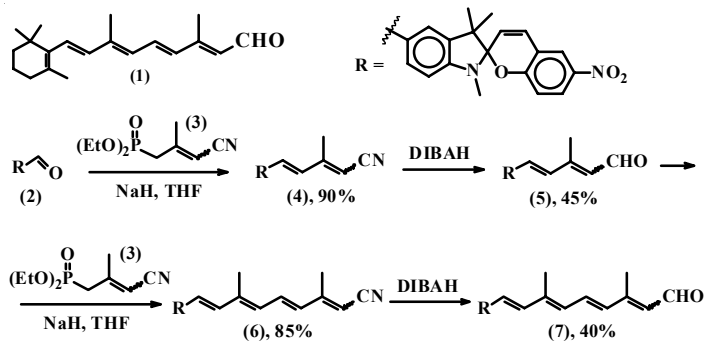
**N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow

E-mail: biolapa@inbox.ru

Fax: (495) 434-82-33; tel.: (495) 936-88-96

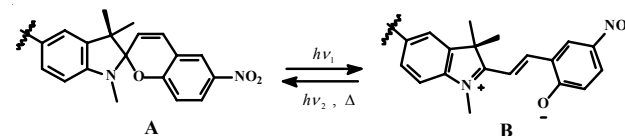
Synthetic studies in field of new derivatives of photochromic compounds are quite topical at present. This study is devoted to development of production methods of polyenic spiropyran derivatives containing unsaturated fragment at 5th position of indole fragment of the molecule.

The all-purpose procedure approved earlier by us for building up a polyenic chain of retinoid molecules [1-3] has been successfully applied in this study for synthesis of new spiropyran derivatives.



The key stage of the synthesis was Horner-Emmons olefination procedure of carbonyl precursor (2) with C₅-phosphonate reagent. Resulting intermediate nitriles were reduced into aldehydes using DIBAH at -90°C. Repeating the olefination and reduction steps for (5,6) allowed to obtain the target retinal analog (7) with overall yield 14%. The newly formed C=C-bonds had *E*-configuration shown by ¹H-NMR spectra (*J* 16.3 Hz). Target and intermediate compounds were obtained in preparative quantities, their structures being confirmed by range of physico-chemical methods of analysis.

Investigation of synthesized compounds' (2,4-7) photochromic behavior in polar solvent – ethanol and low-polar solvent – toluene has been carried out. The dependence of polyenic spiropyrans' photodegradation efficiency on nature of solvent has been revealed.



We have found decrease of photochromic transitions efficiency and photoinduced merocyanin form (B) dark cyclization speed and simultaneous increase of photochromic spiropyran resistance to photodegradation in ethanol compared to toluene with increase of polyenic substituent length. This phenomenon could be explained by photoinduced merocyanine form molecules stabilization as result of hydrogen bond formation between them and solvent molecules. As opposed to spiropyran form spectral characteristics, the absorption band maxima positions of both monomeric and aggregated photoinduced forms of photochromic retinals depends slightly on nature and length of polyenic substituents. This could be accounted for by conjugation between polyenic chain and spiropyran merocyanine form being almost absent.

References

1. Laptev A.V., Belikov N.E., Lukin A.Yu., et al. *Bioorganic chemistry*, 2008, V. 34, No. 2, P. 276-284.
2. Belikov N.E., Lukin A.Yu., Laptev A.V., et al. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, 2008, V. 196, № 2-3, P. 262-267.
3. Khodonov A.A., Shevyakov S.V., Mironova E.V., et al. *Molecular Crystals, Liquid Crystals*, 2000, V. 345, P. 317-322.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКЗОГЕННЫХ И ЭНДОГЕННЫХ НЕЙРОМОДУЛЯТОРОВ НИКОТИНОВОГО АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА

*Люкманова Е.Н., Шулепко М.А., Кашеверов И.Е., Шенкарев З.О.,
Минеев К.С., Парамонов А.С., Арсеньев А.С., Долгих Д.А., Цетлин В.И.,
Кирпичников М.П.*

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
E-mail: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru
Факс: (495) 330-69-83; тел.: (495) 330-69-83

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (нАХР) представляет собой лигандозависимый ионный канал, встроенный в постсинаптическую мембрану нейронов. В зависимости от локализации различают нейрональные и мышечные нАХР. С дисфункцией этих рецепторов связаны многие болезни центральной и периферической нервной системы. Одними из широко изученных ингибиторов нАХР являются α -нейротоксины яда змей, которые представляют собой небольшие белки, имеющие "трехпетельную" β -структурную организацию, стабилизированную 4-5 дисульфидными связями. Со структурной точки зрения, α -нейротоксины можно условно разделить на три больших класса: короткие α -нейротоксины (60-62 а.о., 4 дисульфидные связи), длинные α -нейротоксины (66-75 а.о., дополнительная дисульфидная связь расположена в центральной петле) и "необычные" нейротоксины (62-68 а.о., дополнительная дисульфидная связь расположена в первой, N-концевой, петле). Несколько лет назад было открыто новое семейство эндогенных нейромодуляторов нАХР, Lynx. Последовательности этих белков высоко гомологичны последовательностям "необычных" нейротоксинов яда змей. Однако, в отличие от α -нейротоксинов белки семейства Lynx не блокируют, а наоборот активируют канал нАХР в присутствии агонистов. Другие структурно-функциональные данные о представителях этого семейства нейромодуляторов на данный момент отсутствуют.

Одним из объектов данного исследования является "слабый" токсин из яда кобры *Naja kaouthia* (WTX), экзогенный ингибитор нАХР. WTX, относящийся к семейству "необычных" токсинов, обладает низкой токсичностью *in vivo* и слабой афинностью к нАХР по сравнению с длинными и короткими α -нейротоксинами, хотя в итоге вызывает практически необратимое блокирование как мышечных рецепторов, так и нейрональных нАХР $\alpha 7$ типа. Вторым объектом исследования является белок Lynx1 человека, эндогенный активатор нАХР. Гомология аминокислотной последовательности белков Lynx1 и WTX составляет ~30%.

В данной работе впервые были разработаны бактериальные системы продукции WTX и Lynx1 в виде телец включения *E. coli*. Были опробованы различные методы ренатурации и проведен скрининг условий для

оптимизации выхода ренатурации. Рекомбинантные белки были охарактеризованы с помощью масс-спектрометрии, КД и ЯМР спектроскопии. Были получены ^{15}N -меченные аналоги WTX и Lynx1, что позволило исследовать структуру и динамику этих белков методами ЯМР спектроскопии. Было показано, что оба белка обладают конформационной гетерогенностью. Так, молекула WTX присутствует в водном растворе в виде двух основных конформаций, отличающихся *цис-транс*-изомерией пептидной связи Arg32-Pro33, обмен между этими конформациями происходит с характерными временами более 100 мс. Наблюдаемые в молекуле Lynx1 обменные процессы связаны с динамическими переходами петлевых участков из β -структурной конформации в неструктурированное состояние и протекают с характерными временами в диапазоне 1-50 мс. Методами ЯМР спектроскопии впервые была определена пространственная структура для основного (структурированного) состояния белка Lynx1 в водном растворе. Полученная структура содержит токсиноподобный "трехпетлевой" мотив, стабилизированный двумя антипараллельными β -листами. Первый β -лист образован двумя β -тяжами и включает в себя остатки N-концевой петли белка, а второй β -лист имеет в своем составе четыре β -тяжа, образованные фрагментами всех трех петель белка Lynx1. Полученные данные являются первым экспериментальным подтверждением предположения о схожести пространственной структуры белков семейства Lynx и α -нейротоксинов змей.

Наличие эффективных систем бактериальной продукции WTX и Lynx1 позволило также провести функциональные исследования этих белков. Методами сайт-направленного мутагенеза были получены 11 мутантных форм WTX: C6S/C11S, P7A, P33A, P7A/P33A, W36A, R31A, R32A, R31A/R32A, R31E/R32A, R31A/R32E и Q30-W36/REARGT. Анализ активности полученных мутантов в отношении нАХР мышечного и $\alpha 7$ нейронального типов впервые выявил, что: 1) наличие дополнительной дисульфидной связи в первой петле снижает сродство WTX к обоим типам рецептора; 2) конформационная гетерогенность WTX не оказывает значительного влияния на активность токсина; 3) остаток Trp36, находящийся на конце центральной петли токсина, важен только для взаимодействия с мышечным нАХР; 4) наличие заряженных остатков Arg в центральной петле токсина играет критическую роль при взаимодействии с нАХР $\alpha 7$ типа. Таким образом, в ходе исследования были выявлены детерминанты, ответственные за селективность взаимодействия WTX с различными типами нАХР. Впервые было охарактеризовано взаимодействие Lynx1 с нАХР мышечного и $\alpha 7$ типов. Были определены константы связывания, и было обнаружено, что в отличие от WTX взаимодействие Lynx1 с рецептором носит обратимый характер, что возможно и обуславливает его особую роль модулятора активности нАХР. Впервые было показано, что Lynx1 конкурирует за сайты связывания с нейротоксинами змей, что возможно указывает на частичное перекрытие сайтов связывания этих лигандов на поверхности рецептора.

STRUCTURE-FUNCTIONAL STUDIES OF MOLECULAR MECHANISMS OF INTERACTION BETWEEN EXOGENOUS AND ENDOGENOUS NEUROMODULATORS AND NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR

Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Kasheverov I.E., Shenkarev Z.O., Mineev K.S., Paramonov A.S., Arseniev A.S., Dolgikh D.A., Tsetlin V.I., Kirpichnikov M.P.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) is a ligand-gated ionic channel, located in the postsynaptic membranes of neurons. According to their localization these receptors are subdivided into two types – neuronal and muscle. Many disorders in the central and peripheral nervous systems are connected with disfunctions of nAChRs. α -Neurotoxins from snake venoms, the most studied inhibitors of nAChRs, are small proteins with characteristic "three-finger" β -structural fold stabilized by 4-5 disulfide bonds. Structurally, α -neurotoxins can be subdivided onto three big classes: short-chain α -neurotoxins (60-62 amino acid residues, 4 disulfide bonds), long-chain α -neurotoxins (66-75 amino acid residues, fifth disulfide bond is located in the tip of the central loop) and "unusual" neurotoxins (62-68 amino acid residues, fifth disulfide bond is situated in the first, N-terminal, loop). Several years ago the new family of endogenic neuromodulators of nAChRs – Lynx, was discovered. The amino acid sequences of these proteins are highly homologous to sequences of "unusual" snake neurotoxins. In contrast to α -neurotoxins, proteins from Lynx family activate the nAChR channel in the presence of agonists. Other structural-functional data about Lynx proteins are presently absent.

One of the objects of this study is "weak" toxin from *Naja kaouthia* venom (WTX), exogenic inhibitor of nAChRs. WTX belongs to the family of "unusual" neurotoxins and has low toxicity *in vivo* and weak affinity to nAChRs in comparison with long-chain and short chain α -neurotoxins. In spite of it, WTX irreversibly blocks both muscle type and neuronal $\alpha 7$ type nAChRs. The second object of present investigation is human Lynx1, endogenic activator of nAChRs. The homology of amino acid sequences of Lynx1 and WTX is about 30%.

In the present work the bacterial systems for production of WTX and Lynx1 in the form of *E. coli* inclusion bodies were developed for the first time. Different methods of refolding and the screening of conditions for yield optimization were performed. The recombinant proteins were characterized by means of mass spectrometry, CD and NMR spectroscopy. ^{15}N -labeled analogs of Lynx1 and WTX were produced that allowed NMR investigation of the spatial structure and dynamics of these proteins. It was found that both proteins are conformationally heterogeneous. WTX molecule has two main conformations in water solution differed from each other by *cis-trans*-isomerization of peptide bond Arg32-Pro33. The exchange between these two conformations takes place with characteristic time more than 100 ms. The exchange processes in Lynx are underlain by dynamic

transitions of loop regions from β -structural to random coil conformation and take place with characteristic times in the range of 1-50 ms. For the first time the spatial structure of the major (β -structural) conformation of Lynx1 molecule in water solution was determined by means of NMR spectroscopy. The obtained structure contains toxin-like "three-finger" motif stabilized by two antiparallel β -sheets. The first β -sheet involves two β -strands and is formed by residues from N-terminal loop of the protein. The second β -sheet involves four β -strands formed by the fragments of all three loops of Lynx1. Obtained data experimentally prove the hypothesis about similarity between spatial structure of Lynx proteins and snake α -neurotoxins.

The development of effective bacterial systems for production of WTX and Lynx1 allowed to perform the functional studies of these proteins. Eleven mutant forms of WTX were produced by means of site-directed mutagenesis: C6S/C11S, P7A, P33A, P7A/P33A, W36A, R31A, R32A, R31A/R32A, R31E/R32A, R31A/R32E и Q30-W36/REARGT. The analysis of the activity of these mutants against muscle type and neuronal $\alpha 7$ type nAChRs revealed that: 1) the presence of additional disulfide bond in the first loop decreases the affinity of WTX to both types of receptor; 2) conformational heterogeneity of WTX doesn't effect on the toxin activity; 3) Trp36 residue located in the tip of the central loop of toxin is important only for interaction with muscle type nAChRs; 4) the presence of charged Arg residues in the tip of the central loop is crucial for interaction with neuronal $\alpha 7$ type receptor. Thus for the first time the determinants important for selective action of WTX on different types of nAChRs were revealed. The interaction of Lynx1 with muscle type and neuronal $\alpha 7$ type nAChRs was characterized and binding affinity constants were measured. It was shown, that in contrast to WTX, the interaction of Lynx1 with receptor is reversible. Probably, this feature underlies the special role of Lynx1 as modulator of nAChRs activity. For the first time it was shown that Lynx1 and snake neurotoxins competes for the binding to nAChRs. Probably the binding sites of these ligands are partially overlapped on the receptor surface.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ мРНК ДЛЯ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ СИНДРОМА ДАУНА

Мануйлова Е.Г., Маркова Ж.Г., Шилова Н.В.*, Золотухина Т.В.*, Носиков В.В., Серёгин Ю.А.*

Государственный научный центр РФ "ГосНИИ генетика", Москва
*Государственное учреждение Медико-генетический научный центр РАМН, Москва
E-mail: txt_katya@mail.ru
Факс: (495) 315-05-01; тел.: (495) 315-02-65

Введение. Благодаря успешному развитию цитогенетики, биохимии и молекулярной биологии оказалось возможным выявлять хромосомные и генные мутации у человека не только в постнатальном периоде, но и на разных сроках пренатального развития. В последние годы интенсивно разрабатываются неинвазивные методы дородовой диагностики различной наследственной патологии. Синдром Дауна является самой распространённой хромосомной патологией.

Цель работы. Разработка неинвазивного и доступного генетического теста, позволяющего достоверно определять синдром Дауна (частичную или полную трисомию по хромосоме 21) у плода в первом – начале второго триместра беременности (до 10-15 недель).

Объект исследования и методы. Генетическим материалом являются циркулирующие в плазме крови матери молекулы мРНК трёх генов, транскрибируемых с хромосомы 21, экспрессия которых специфична для клеток плаценты и эмбриона. Для проведения анализа используется РНК, выделенная из плазмы крови беременных женщин, из которой с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) амплифицировали участки выбранных генов. Затем проводится количественный анализ аллелей полиморфных маркеров, лежащих внутри амплифицированных фрагментов, на автоматическом секвенаторе с использованием реакции удлинения праймеров. Соотношения концентраций аллелей должно быть равно 1:1 в норме и 1:2 или 2:1 у носителей трисомий.

Результаты. Проведены предварительные эксперименты по исследованию сохранности РНК в цельной крови и плазме. Сохранность определяли путем специфичной амплификации с ОТ-ПЦР фрагментов трёх генов: генов "домашнего хозяйства" *ACTB* и *B2M*, а также специфичного для плаценты гена *PLAC4*, с полуколичественным анализом результатов. Эксперименты показали высокую сохранность циркулирующей РНК в плазме при +4°C и -70°C и в крови при +4°C в течение 24 часов (снижение уровня сигнала не более 20%). Также на основании экспериментальных данных выбран метод выделения из плазмы, обеспечивающий наибольшее количество и качество РНК. Анализ баз данных и литературных источников

помог выявить 3 гена и 7 полиморфных маркеров, подходящих для проведения исследования. Проведена экспериментальная проверка всех 7 полиморфных маркеров. В частности, генотипирование данных маркеров в группе из 50 человек подтвердило их высокую гетерозиготность, превышающую 30%, и отсутствие неравновесия по сцеплению. С помощью ОТ-ПЦР успешно проведена амплификация фрагментов, фланкирующих 6 из 7 полиморфных маркеров, из РНК, полученной из плазмы крови беременных женщин среднего и длительного сроков хранения (1-6 месяцев).

Выводы. Подтверждена возможность амплификации полиморфных маркеров из РНК плацентарного происхождения. Определены условия хранения образцов плазмы крови, соответствующие возможностям медицинских центров. Составлена панель из 6 полиморфных маркеров, которые были успешно амплифицированы из образцов плазмы крови.

DETECTION OF AN OPPORTUNITY OF CIRCULATING mRNA USAGE FOR PRENATAL DIAGNOSTICS OF DOWN SYNDROME

Manuylova E.G., Markova J.G.*, Shilova N.V.*, Zolotuchina T.V.*, Nosikov V.V., Seryogin Yu.A.

State Scientific Center of RF "GosNII Genetika", Moscow

*State Institution Medical Genetic Scientific Center of RAMS, Moscow

E-mail: txt_katya@mail.ru

Fax: (495) 315-05-01; tel.: (495) 315-02-65

Introduction. Because of successful development of cytogenetics, biochemistry and molecular biology, it became possible to detect human chromosomal and genetic mutations not only during postnatal period but during different prenatal periods. Non-invasive prenatal diagnostics of congenital pathology is intensively developed at last years. Down syndrome is the most widely-distributed pathology.

The objective of investigation. The development of available non-invasive genetic test for reliable detection of fetus Down syndrome (mosaic or full trisomy) during the first – beginning of the second trimester of pregnancy (up to 10-15 weeks).

Object of investigation and methods. Genetic material is extra cellular maternal mRNA molecules of three genes, transcribed from chromosome 21, which expression is specific for cells of both placenta and embryo. RNA isolated from blood plasma of pregnant women is used for the reverse transcription and following amplification (RT-PCR) of sites of chosen genes. Quantitative analysis of polymorphic markers alleles in amplified fragments was held using automatic primer extension reaction and sequenator. The normal ratio of alleles is 1:1 and in case of trisomy it equals 1:2 or 2:1.

Results. Preliminary investigations of RNA integrity in blood and plasma were carried on. Integrity was detected by specific RT-PCR amplification of "household" genes' fragments *ACTB* and *B2M* and specific placenta gene *PLAC4* with semiquantitative analysis of results. The experiments have shown high integrity of extra cellular RNA in plasma at +4°C and -70°C and in blood at +4°C during 24 hours storage (decrease of signal is no more than 20%). The method of RNA isolation from plasma with the maximal quantity and quality of RNA was chosen also on the ground of experimental data. The analysis of data bases and literary sources allowed to find out 3 genes and 7 polymorphic markers. Genetic typing of given markers in the group of 50 people confirmed their high heterozygosity (more than 30%) and the absence of coupling disbalance. Successful amplification of fragments flanking 6 from 7 polymorphic markers was held by RT-PCR from median and prolonged storage life (1-6 months) RNA isolated from plasma of pregnant women.

Conclusion. An opportunity of polymorphic markers' amplification of placenta RNA is confirmed. Storage conditions of plasma samples fitting the facilities of medical centers are described. Six polymorphic markers were successfully amplified from plasma samples.

ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ЛИПИД-ТРАНСПОРТИРУЮЩЕГО БЕЛКА ЧЕЧЕВИЦЫ В КЛЕТКАХ *E. COLI*

Мельникова Д.Н., Финкина Е.И., Баландин С.В., Овчинникова Т.В.

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

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

E-mail: finkina@mail.ru

Факс: (495) 336-43-33; тел.: (495) 335-42-00

Растительные ЛТР (липид-транспортирующие белки) – небольшие основные белки, обладающие способностью транспортировать молекулы липидов между биомембранами *in vitro*. ЛТР относительно стабильны, устойчивы к тепловой и химической денатурации, а также ферментативному расщеплению. ЛТР растений в соответствии с молекулярной массой подразделяются на два подкласса: ЛТР1 (около 9 кДа) и ЛТР2 (около 7 кДа). Данные белки содержат восемь консервативных остатков цистеина, образующих четыре дисульфидные связи. Для пространственной структуры ЛТР характерно наличие гидрофобной впадины, образованной тремя или четырьмя α -спиралями и длинным С-концевым фрагментом.

ЛТР участвуют в таких биологических процессах в растениях, как синтез кутина, эмбриогенез и адаптация к стрессовым факторам окружающей среды. Предполагается, что ЛТР, подавляющие рост бактерий и грибов, являются важным элементом защитной системы растений. Многие представители подкласса ЛТР1 – сильные аллергены, ответственные за развитие иммунных реакций на латекс, пыльцу и растительные пищевые продукты.

Изучение ЛТР растений, обладающих антимикробной активностью и свойствами аллергенов, представляет интерес в связи с возможностью их практического применения как в области сельского хозяйства для создания устойчивых трансгенных растений, так и в области медицины для разработки новых препаратов диагностического и терапевтического применения.

В ходе предшествующей работы были выделены четыре новых липид-транспортирующих белка из пророщенных семян чечевицы *Lens culinaris* (Lc-LTP2,4,7,8) [Е.И.Финкина, С.В.Баландин, М.В.Серебрякова, Н.А.Потапенко, А.А.Тагаев, Т.В.Овчинникова. Выделение и первичная структура новых липид-транспортирующих белков из пророщенных семян чечевицы (*Lens culinaris*). Биохимия, 2007, т.72, №4, с.533-543]. Были установлены их полные аминокислотные последовательности и структуры кДНК. Выделенные белки проявляют антибактериальную активность, в частности, подавляют рост фитопатогена *Agrobacterium tumefaciens*. Для проведения дальнейших структурно-функциональных и предклинических исследований нами были разработаны системы для гетерологической экспрессии Lc-LTP2 в *E. coli*. В качестве родительского штамма использовался штамм *E. coli* BL-21(DE3), экспрессирующий T7 РНК-полимеразу при индукции ИПТГ или лактозой, позволяющий с высокой эффективностью синтезировать целевой белок под контролем T7 промотора. N-Концевой октагистидиновый участок обеспечивал возможность

металлохелатной очистки рекомбинантного белка. Один из двух разработанных вариантов конструкции предусматривал получение Lc-LTP2 в форме гибридного белка с модифицированным тиоредоксином А. Данная система показала более высокий выход целевого продукта и была использована для выделения белка.

Клетки штамма BL-21(DE3)/pET-His8-TrxL-Lc-LTP2 культивировали в богатой питательной среде. Оптимизация состава питательной среды, температуры и других условий экспрессии позволила достичь удовлетворительного выхода ЛТР-содержащего гибридного белка. Клеточный осадок, содержащий продукты экспрессии, лизировали с помощью ультразвука. Полученный в результате центрифугирования осветленный лизат подвергали металлохелатной хроматографии, элюируя гибридный белок градиентом имидазола. Для получения зрелого белка была использована реакция расщепления гибридного белка His8-TrxL-Lc-LTP2 бромцианом по искусственно введенному остатку метионина.

Для разделения смеси, полученной в результате реакции с бромцианом, и в качестве финальной стадии очистки рекомбинантного белка была использована ОФ-ВЭЖХ. Для очистки Lc-LTP2 была выбрана система растворителей ацетонитрил-вода с добавлением 0,1% ТФУ. Разделение проводили в линейном градиенте концентрации ацетонитрила от 5 до 80% за 60 минут. Время удерживания рекомбинантного Lc-LTP2 в условиях заданного градиента соответствовало значению, полученному для природного белка. Молекулярная масса полученного белка, определенная методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, оказалась равной молекулярной массе природного Lc-LTP2 (9282,7 Да).

Идентичность рекомбинантного Lc-LTP2 природному белку была также подтверждена тестированием антимикробной активности методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде. Полученный рекомбинантный Lc-LTP2 обладал антибактериальной активностью и с той же эффективностью, что и природный белок, подавлял рост почвенной фитопатогенной бактерии *A. tumefaciens*, вызывающей опухоли у растений. Очищенный рекомбинантный Lc-LTP2 обладал также противогрибковой активностью и ингибировал рост фитопатогенных грибов *Aspergillus niger* и *Neurospora crassa*, являющихся причиной развития у растений черной и красной гнили.

В рамках данной работы была создана генно-инженерная конструкция для экспрессии Lc-LTP2 в *E. coli* в составе гибридного белка, и получен штамм-продуцент, позволяющий экспрессировать липид-транспортирующий белок чечевицы с выходом не менее 1,5 мг/л культуры в пересчете на чистый Lc-LTP2. Разработанная методика выделения рекомбинантного белка позволяет получать Lc-LTP2, идентичный природному по молекулярной массе, аминокислотной последовательности и антимикробной активности.

HETEROLOGOUS EXPRESSION OF LENTIL LIPID TRANSFER PROTEIN IN *E. COLI*

Melnikova D.N., Finkina E.I., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: finkina@mail.ru

Fax: (495) 336-43-33; tel.:(495) 335-42-00

Plant lipid transfer proteins (LTPs) are small basic proteins that are capable of exchanging lipids between biomembranes *in vitro*. LTPs are relatively stable molecules resistant to thermal and chemical denaturation and enzymatic digestion. Plant LTPs are divided into two subclasses according to their molecular masses: LTP1s (9 kDa) and LTP2s (7 kDa). These proteins contain eight conserved cysteine residues forming four disulfide bonds. The three-dimensional structure of LTPs is characterized by an internal hydrophobic cavity surrounded by three or four α -helices, and a long C-terminal tail.

Plant LTPs are involved in such physiological processes as cutin biosynthesis, embryogenesis and adaptation to environmental stress factors. LTPs exhibiting antibacterial and antifungal activities are considered to be an important component of plant defense system. Many members of the LTP1s subclass are strong allergens responsible for development of immune reactions to latex, pollen and plant food.

Study of plant LTPs possessing antimicrobial and allergenic properties is of special interest in view of their possible application in agriculture, as resistance factors for transgenic plants, and in medicine, as diagnostic and therapeutic agents.

In our previous work, four novel lipid transfer proteins, called Lc-LTP2, 4, 7 and 8, were purified from the lentil *Lens culinaris* germinated seeds [E.I. Finkina, S.V. Balandin, M.V. Serebryakova, N.A. Potapenko, A.A. Tagaev, T.V. Ovchinnikova. Purification and primary structure of novel lipid transfer proteins from germinated lentil (*Lens culinaris*) seeds. Biochemistry (Moscow), 2007, V.72, No.4, pp.430-438]. The complete amino acid sequence and cDNA structure of all the proteins were determined. The purified LTPs showed antibacterial activity, particularly against phytopathogenic *Agrobacterium tumefaciens*. In order to obtain sufficient amounts of LTPs for structure-functional and preclinical investigations, heterologous expression systems for Lc-LTP2 production in *E. coli* have been developed. The target protein was expressed under control of the strong T7 promoter in *E. coli* BL-21(DE3) strain, containing chromosome-integrated T7 RNA polymerase gene activated by IPTG or lactose induction. An octahistidine tag was added to the N-terminus of the fusion protein allowing to use immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) in the purification process. One of the two plasmid variants also included thioredoxin A coding sequence upstream of Lc-LTP2 sequence so that to express the target protein in soluble form and to facilitate its folding. This system demonstrated higher yield of the mature protein and was used for preparative protein purification.

The BL-21(DE3)/pET-His8-TrxL-Lc-LTP2 cells were grown in nutrient rich medium. Optimization of growth medium composition, temperature and other expression conditions allowed to achieve a satisfactory yield of LTP-containing fusion protein. The cells containing expression products were harvested by

centrifugation and lysed by sonication. The cleared lysate was collected, loaded onto IMAC resin, and the fusion protein was eluted using imidazole gradient. The mature protein was obtained by CNBr cleavage of the fusion protein His8-TrxL-Lc-LTP2 at the methionine residue under standard conditions.

Separation of the cleavage products and fine purification of the recombinant Lc-LTP2 were carried out by reverse-phase HPLC. The chromatography was performed in a linear gradient of acetonitrile in 0.1% TFA: from 5% to 80% for 60 min. The recombinant Lc-LTP2 was eluted from the column at the same retention time as the natural protein. Molecular mass of the purified protein, determined by MALDI-TOF mass spectrometry, is equal to that of the natural Lc-LTP2 (9282,7 Da).

Identity of the recombinant and natural Lc-LTP2 was also monitored by antimicrobial activity measurement using twofold serial dilution method. The purified recombinant Lc-LTP2 shows antibacterial activity and suppresses growth of the pathogenic soil bacterium *A. tumefaciens*, which causes root swelling, with the same efficiency as the natural protein. The purified recombinant Lc-LTP2 also inhibits growth of the phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* and *Neurospora crassa*, which cause such plant diseases as black and red bread molds, correspondingly.

In this work, the bacterial expression host strain, translational fusion strategy, and convenient cleavage and purification procedures were optimized to produce a sufficient amount (1,5 mg/l) of a soluble and correctly folded recombinant lentil Lc-LTP2. The described method of purification allows to obtain Lc-LTP2 having molecular weight, amino acid sequence and antimicrobial activity identical to the natural lentil LTP protein.

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ УСИЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ РАКОВО-СПЕЦИФИЧНЫХ ПРОМОТОРОВ НА ОСНОВЕ TAT-TAR-СИСТЕМЫ HIV-1

Мингалеева Р.Н.

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

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

E-mail: min-rimma@mail.ru

Факс: (495) 330-65-38, тел.: (495) 330-70-29

Использование раково-специфичных промоторов в генно-терапевтических системах, направленных на лечение онкологических заболеваний, имеет большую перспективу. С их помощью можно добиться экспрессии трансгена исключительно в опухолевых клетках. Однако известно, что сила промоторов, специфически активных в раковых клетках, зачастую недостаточно высока для проявления необходимого терапевтического эффекта. Вследствие этого возникает необходимость разработки систем, позволяющих усиливать активность таких промоторов. Ранее нами было показано, что уровень экспрессии трансгена, находящегося под контролем раково-специфичного промотора гена сурвивина (*BIRC5*) человека, можно увеличить при использовании Tat-TAR-системы HIV-1. Белок tat специфически связывается с вирусной мРНК в районе TAR-последовательности 5'LTR HIV-1 и активирует транскрипцию подконтрольных генов. Если поместить ген *tat* под контроль раково-специфичного промотора, то можно эффективно увеличить уровень экспрессии трансгена только в опухолевых клетках, при этом в нормальной ткани уровень его экспрессии будет минимальным или отсутствовать совсем.

В качестве гена терапевтического воздействия мы использовали ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (*tk-HSV*). Этот фермент превращает нуклеозидные аналоги, такие как ганцикловир и ацикловир, в монофосфорилированную форму, которую затем эндогенные клеточные киназы преобразуют в токсичную трифосфатную форму, конкурирующую с нормальными нуклеотидами при репликации ДНК. Таким образом, экспрессия гена *tk-HSV* в клетках млекопитающих делает их чувствительными к ганцикловиру, что приводит к остановке синтеза ДНК и к гибели клетки.

Чтобы расширить спектр опухолей, для которых возможно эффективное использование разработанной системы, мы исследовали потенциал двух промоторов, обладающих широкой опухолевой специфичностью (промотор гена сурвивина человека (pSurv) и гибридный промотор гена обратной транскриптазы человека и цитомегаловируса (phTERT-CMV)) в Tat-TAR-системе.

В работе были использованы фрагменты 5'LTR вируса HIV-1, один из которых – Δ LTR_{rep} – содержал вирусный энхансер и промотор; район R, несущий TAR-элемент; U5 область и нуклеотидную последовательность после U5 области до стартового кодона первого гена вируса, а второй - его укороченный вариант без энхансера (Δ LTR_p).

Разработанная система состоит из векторных конструкций, одна из которых несет ген *tat* под контролем раково-специфичного промотора, а вторая – ген тимидинкиназы вируса простого герпеса под контролем Δ LTR_{rep} или Δ LTR_p. Гены *tat* и *tk-HSV*, а также Δ LTR_{rep}, были клонированы в конструкции, при этом ген *tat* находился под контролем pSurv или phTERT-CMV, а ген *tk-HSV* – под контролем Δ LTR_{rep}. Для сравнения и оценки эффективности раково-специфичных промоторов были получены конструкции, в которых ген *tk-HSV* находился под управлением либо pSurv, либо phTERT-CMV, либо под контролем сильного неспецифичного промотора цитомегаловируса (pCMV/E). Эффективность работы Tat-TAR системы была показана при транзientной трансфекции раковых линий клеток человека Calu-1 и HT1080 с последующим иммуноблоттингом клеточных экстрактов с антителами к tk-HSV. Исследуемый белок tk-HSV практически не детектировался, если его ген находился под контролем раково-специфичного промотора или Δ LTR_{rep} и, напротив, синтезировался на очень высоком уровне, если ген *tk-HSV* находился под контролем бинарной системы Tat-TAR и pCMV/E.

Мы показали, что в клетках, несущих ген *tk-HSV* под контролем Tat-TAR-системы и раково-специфичного промотора, происходит фосфорилирование ганцикловира, в количестве, достаточном для их эффективной гибели. При этом эффективность разработанной системы сопоставима с эффективностью промотора цитомегаловируса и существенно выше эффективности работы раково-специфичных промоторов. Однако мы также обнаружили, что Δ LTR_{rep} обладает высокой базальной активностью, в результате которой гибнут клетки, несущие под его контролем ген *tk-HSV*. Нами были исследованы способы понижения такой неспецифической активности и показано, что укороченный вариант (Δ LTR_p) имеет существенные преимущества для использования в разрабатываемой системе.

Таким образом, мы показали, что с помощью Tat-TAR-системы вируса иммунодефицита человека можно в сто и более раз усилить активность раково-специфичных промоторов и тем самым повысить опухоль-направленную цитотоксичность киллерного агента – тимидинкиназы вируса простого герпеса.

DEVELOPMENT OF HIV-1 TAT-TAR-SYSTEMS WITH INCREASED PROMOTER ACTIVITY FOR CANCER GENE THERAPY

Mingaleeva R.N.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: min-rimma@mail.ru

Fax: (495) 330-65-38, tel.: (495) 330-70-29

Application of cancer-specific promoters in gene-therapy systems directed to cancer treatment has a great success. These promoters can induce transgene expression in tumor cells only. However it is known that cancer-specific promoter strength is not enough for efficient therapy effect. Consequently it is necessary to develop new systems allowing to increase a cancer-specific activity. Earlier we had shown that HIV-1 Tat-TAR-system could increase transgene expression under control of cancer-specific human survivin gene promoter (*BIRC5*). Tat protein specifically binds TAR sequence within 5'LTR of viral mRNA HIV-1 and thus participates in transcription activation of under control gene. When *tat* gene is regulated by cancer-specific promoter one can increase transgene expression in tumor cells effectively with minimal level of expression in normal tissue at the same time.

In our experiments herpes simplex virus thymidine kinase (tk-HSV) was chosen as a suicide agent. This protein can convert nucleoside analogues such as ganciclovir and acyclovir in monophosphorylated form being transformed by endogenous cell kinases in toxic form competing with normal nucleotides during DNA replication. Such a way mammalian cells expressing *tk-HSV* become sensitive to ganciclovir that results in stopping of DNA synthesis and cell death.

To broaden tumor diversity for our Tat-TAR-system two promoters with wide spectrum of tumor specificity were investigated. These are a human survivin gene (*BIRC5*) promoter (pSurv) and a hybrid human telomerase reverse transcriptase gene and cytomegalovirus promoter (phTERT-CMV).

We used two fragments of HIV-1 5'LTR, first of that (Δ LTR_{rep}) has viral enhancer and promoter; R region with TAR-element; U5 region and nucleotide sequence downstream U5 region up to start-codon of viral first gene, and the second one – its partly deleted non-enhancer version (Δ LTR_p).

The developed system consists of vector constructions, the first one has *tat* gene under cancer-specific promoter control and the second was *tk-HSV* gene under control of Δ LTR_{rep} or Δ LTR_p.

Tat and *tk-HSV* genes, LTR HIV-1 fragment (Δ LTR_{rep}) were cloned in gene expression constructions. *Tat* gene was controlled by pSurv or phTERT-CMV and *tk-HSV* gene – by Δ LTR_{rep}. For comparison cancer-specific promoter constructions containing *tk-HSV* gene under control of pSurv, phTERT-CMV and strong non-specific promoter of cytomegalovirus (pCMV/E) were prepared. Potential capacities of these constructions for transactivating of *tk-HSV* gene transcription were investigated in transient transfection of human cancer cell lines Calu-1 and HT1080 with following immunoblotting of cell extracts with antibodies against tk-HSV. Tk-HSV protein was hardly detectable when this gene was under control

of cancer-specific promoter or Δ LTRep and vice versa it was synthesized at very high level when *tk-HSV* gene was regulated by binary Tat-TAR-system or pCMV/E.

We have shown also that cells carrying *tk-HSV* gene under Tat-TAR-system control and cancer-specific promoter phosphorylate ganciclovir at a level sufficient for their effective death. Moreover effectiveness of developed system was similar with cytomegalovirus promoter effectiveness and was essentially higher than cancer-specific promoter effectiveness. However we have found that Δ LTRep has high basal activity that results in death of cells transfected by *tk-HSV* under Δ LTRep control. The ways of decreasing such a non-specific activity were investigated and it was shown that short Δ LTRep promoter has some advantages for application in developing system.

Such a way we have demonstrated that Tat-TAR-system can raise a cancer-specific transgene expression in 100 fold and more and thus increase tumor-directed cytotoxicity of suicide gene – herpes simplex virus thymidine kinase.

РЕЦЕПТОРНЫЕ КИНАЗЫ ERBB: АРХИТЕКТУРА МЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ

*Минеев К.С., Пустовалова Ю.Е., Бочаров Э.В., Волинский П.Е.,
Ткач Е.Н., Ефремов Р.Г., Арсеньев А.С.*

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

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

E-mail: mineev@nmr.ru

Факс: (495) 335-50-33; тел.: (495) 330-74-83

Мембранные белки представляют большой интерес для биологии и медицины, однако их пространственные структуры слабо изучены. Рентгеноструктурный анализ испытывает проблемы с их кристаллизацией, в то время как ЯМР-спектроскопия не может иметь дело с комплексами такой большой молекулярной массы и малой подвижности. С учётом того, что мембранные белки являются наиболее популярными мишенями для лекарственных препаратов, мы можем заключить, что принципы, определяющие организацию, сборку и функцию каналов и рецепторов, необходимо исследовать.

Поскольку большая часть мембранных белков состоит из нескольких трансмембранных спиралей, для изучения перечисленных принципов нами был выбран наиболее простой и небольшой объект из класса мембранных белков – димер α -спиралей. Эти комплексы имеют небольшую молекулярную массу и высокую подвижность, однако при этом они являются хорошей моделью для исследования спираль-спиральных взаимодействий. Для расчёта их пространственных структур был разработан специальный протокол с применением ^{13}C -фильтрованных спектров NOESY для детектирования межмолекулярных взаимодействий, особой процедуры калибровки кросс-пиков в ограничения на расстояния, а также неоднозначных ограничений на расстояния для правильной интерпретации данных ЯЭО, полученных из спектров с сильным перекрытием и различными динамическими характеристиками сигналов.

При помощи этого протокола были рассчитаны структуры нескольких димеров трансмембранных (ТМ) сегментов сигнальных киназ семейства ErbB: ErbB2, ErbB4, ErbB1/ErbB2. Пептиды исследовались в растворе бицелл – смеси димиристоил- и дигексаноилфосфатидилхолинов в соотношении 1:4. Как считается, в условиях эксперимента липиды образуют агрегаты дискоидальной формы, представляющие из себя адекватную среду, имитирующую мембранное окружение. Все полученные структуры являются правозакрученными димерами α -спиралей в параллельной ориентации, причём угол между спиралью для всех объектов составлял от 40 до 50 градусов. ТМ-сегменты взаимодействуют через различные варианты гликофориновых G3G мотивов и межмолекулярные водородные связи, образуемые боковыми цепями остатков серинов и треонинов. Во всех трех случаях на интерфейсе взаимодействия находилась относительно полярный регион поверхности ТМ спирали. Эксперименты с ErbB4 показали, что спираль-спиральные контакты могут вызывать небольшие

изменения во вторичной структуре трансмембранных участков, в частности, в расстоянии донор-акцептор для спиральных водородных связей.

Измеренные динамические характеристики исследованных объектов показали, что все они состоят из трансмембранной спирали, которая движется в жестком комплексе с липидами общей массы 30-40 кДа, и подвижных концевых участков. Во всех случаях в стабильную спираль входит несколько заряженных остатков. В случае гетеродимера ErbB1/ErbB2 спираль ErbB1 оказалась дестабилизированной на N-конце, а также была короче на 1 виток, что, скорее всего, говорит о различной ориентации ErbB1 и ErbB2 по отношению к нормали поверхности бицеллы.

TM домен ErbB2 при гомо- и гетеродимеризации с ErbB1 взаимодействовал со второй спиралью по одному и тому же участку поверхности, что подтверждает предложенную ранее для активации тирозинкиназных рецепторов модель "сцепленного вращения", так как наличие второй полярной области необходимо не для гетеродимеризации, а для переключения между активной и неактивной формами. Согласно модели, все полученные структуры соответствуют связанной, активной конформации рецептора, что свидетельствует о том, что внутриклеточные домены взаимодействуют в отсутствие лиганда, а активация рецептора приводит к изменению взаимной ориентации киназных доменов и передаче сигнала. Соответствие полученных структур активной форме рецепторов подтверждается известными для гомологов мутациями, вызывающими рак у крыс. Одной из таких мутаций является замена Val⁶⁵⁹Glu. Результаты моделирования показывают, что подобная замена стабилизирует полученную структуру ErbB2 за счет образования дополнительных межмолекулярных водородных связей в районе интерфейса димеризации.

Это исследование, вместе с биохимическими данными, подтвердило, что мембранные домены могут играть важную роль в функционировании мембранных белков, и предоставило дополнительные свидетельства в пользу механизма "сцепленного вращения", предложенного для активации рецепторов семейства ErbB. Более того, пространственные структуры могут объяснить эффекты ряда мутаций в трансмембранной спирали ErbB2, которые, как полагают, связаны с развитием рака. Дальнейшие исследования в данной области могут позволить создать лекарства, нацеленные не на внеклеточный, а на трансмембранный домен с высокой специфичностью.

ERBB RECEPTOR KINASES: ARCHITECTURE OF MEMBRANE DOMAINS

Mineev K.S., Pustovalova Yu.E., Bocharov E.V., Volynsky P.E., Tkach E.N., Efremov R.G., Arseniev A.S.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: mineev@nmr.ru

Fax: (495) 335-50-33; tel.: (495) 330-74-83

Membrane proteins are now of the great interest in biology and medicine, but their spatial structures are still studied poorly. X-Ray experiences problems with crystallization and NMR cannot deal with high Mm and low mobility of protein-lipid complexes. Taking into account that membrane complexes are the most popular targets for modern drugs, we can postulate that understanding of principles, determining organization, folding and function of channels and receptors, is necessary.

As the major part of membrane proteins consists of several membrane-spanning helices, in order to study such principles, we have chosen the simplest and the smallest object among all membrane proteins – helical dimers. These complexes have low Mm and rather fast dynamics, but they represent a good model for interhelical interaction. For the calculation of protein structure special protocol was developed, employing ¹³C-filtered NOESY techniques for the detection of intermolecular interactions; special peak list calibration procedure and multiple (ambiguous) distance restraints for proper handling of NOE data gathered from spectra with overlapped signals with different dynamical characteristics.

Using the protocol, structures of several dimers of transmembrane (TM) segments of ErbB-family kinase receptors were calculated: ErbB2, ErbB4, ErbB1/ErbB2. Peptides were studied in the bicelles solution – the mixture of a dimiristoyl- and dihexanoylphosphatidylcholines. As supposed, at the experimental conditions these lipids form aggregates with discoidal shape, which represent the adequate lipid mimicking environment. All of them are parallel right-handed dimers with the angle between the axes of helices ranging between 40 and 50 degrees. Helices interact through different variants of G3G motifs and intermolecular hydrogen bonds formed by Ser and Thr sidechains. In all three cases the interaction interface was formed by relatively polar region on the surface of transmembrane helix. Experiments with ErbB4 showed that helix-helix interactions can cause small changes in secondary structure of transmembrane spans, in donor-acceptor distance of hydrogen bonds, for instance.

Measured dynamical features of the objects under the study, revealed that all of them consist of transmembrane helix, which is moving in the rigid complex with lipids, having overall Mm of 30-40 kDa, and mobile terminal regions. In all cases several charged residues are inside the stable helix. In the case of ErbB1/ErbB2 heterodimer the TM helix of ErbB1 was destabilized at the N-terminus and was as well 1 turn shorter, than one of ErbB2, which evidences the different orientation of ErbB1 and ErbB2 TM spans with respect to the bicelle surface normal.

The TM domain of ErbB2 interacted with another helix through the same surface area in the both cases of homo- and heterodimerization. That confirms the "rotation-coupling" model, suggested for the activation of receptor tyrosine kinases, because the second possible dimerization area exists on the surface of the helix not for the heterodimerization, but for the switching between active and inactive forms of the membrane domain. Following the model, we can suppose that the calculated structure corresponds to the active conformation of the receptor and that can confirm that intracellular domains of the receptors interact with each other in the absence of the ligand, and the activation of the receptor causes the changes in the mutual orientation of helical TM spans, and it, in turn, changes the orientation of kinase domains and leads to the signal transduction. The correspondence of the obtained structures to the active state of the receptor can be confirmed by the well-known mutations, found in the homologous proteins, triggering the cancer for rats. One of such mutations is Val⁶⁵⁹Glu. The results of molecular modeling show that such mutations stabilize the calculated structure of ErbB2 via the formation of additional hydrogen bonds on the interfacial region.

This research together with biochemical data proved that membrane domain can play significant role in the function of membrane proteins, and gave additional evidences in the favor of rotational coupling activation mechanism, suggested for ErbB family. Moreover, spatial structures can explain the effects of some mutations in transmembrane helix of ErbB2 which are thought to be cancer-related. Further studies could allow designing drugs which target not extracellular but also membrane domains with high specificity.

МЕХАНИЗМЫ КАТАЛИЗА В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ

Мирополюская Н.А., Кульбачинский А.В.

Институт молекулярной генетики РАН, Москва

E-mail: acetabularia@yandex.ru

Факс/тел.: (499) 196-00-15

Бактериальная РНК-полимераза (РНКП) – это сложная молекулярная машина, которая способна катализировать несколько различных реакций: присоединение нуклеотидов, пирофосфоролиз, эндо- и экзонуклеолитическое расщепление РНК. Эти реакции осуществляются в результате сложных конформационных перестроек в активном центре фермента. Недавние структурные и биохимические исследования показали, что в присоединении нуклеотидов в ходе катализа главную роль играют два элемента β' -субъединицы РНКП: G-петля и F-спираль. Связывание нуклеотида индуцирует "сворачивание" G-петли и образование "закрытой" конформации активного центра, обеспечивающей правильную ориентацию нуклеотида, который напрямую контактирует с G-петлей и F-спиралью. Транслокация РНКП по матрице ДНК, которая происходит после включения нуклеотида, также сопровождается структурными изменениями G-петли и F-спирали. Однако, детальные механизмы структурных перестроек G-петли, F-спирали и других элементов активного центра РНКП на разных стадиях катализа остаются неизвестными.

РНКП термофильных бактерий характеризуются сниженной скоростью катализа (при умеренных и низких температурах) по сравнению с РНКП мезофильных бактерий. В частности, мы показали, что РНКП термофильной бактерии *Thermus aquaticus* обладает гораздо меньшей скоростью катализа, чем РНКП филогенетически близкой мезофильной бактерии *Deinococcus radiodurans* (при 37°C). Таким образом, сравнение мезофильных и термофильных РНКП может быть использовано для поиска структурных элементов РНКП, участвующих в катализе. Целью данной работы был поиск структурных элементов РНКП, обеспечивающих различия в каталитических свойствах РНКП *T. aquaticus* и *D. radiodurans*.

Сравнение последовательностей этих РНКП позволило выявить аминокислотные замены в нескольких элементах активного центра, которые могли бы влиять на скорость катализа. В частности, РНКП *D. radiodurans* содержит 4 замены в G-петле, 1 замену в F-спирали и 8 замен в F-петле – участке, примыкающем к N-концу F-спирали и взаимодействующем со "свернутой" G-петлей в закрытой конформации активного центра. Роль F-петли в катализе ранее не исследовалась. Чтобы установить роль этих замен, мы получили несколько вариантов РНКП *T. aquaticus*, в которых отдельные районы белка были заменены на соответствующие элементы РНКП *D. radiodurans*: (1) РНКП с заменой G-петли (G-Dra), (2) РНКП с заменой F-петли и F-спирали (F-Dra), (3) варианты РНКП с точечными заменами в F-петле и F-спирали, (4) РНКП с делецией центральной части F-петли (ΔF -loop).

Скорости катализа РНКП *T. aquaticus* и *D. radiodurans* и мутантных вариантов РНКП *T. aquaticus* были измерены с использованием искусственных элонгационных комплексов, позволяющих анализировать присоединение одного нуклеотида. Было показано, что при 20°C скорость присоединения нуклеотида РНКП *T. aquaticus* в 320 раз меньше, чем скорость *D. radiodurans* RNAP. Скорость катализа мозаичной РНКП G-Dra не отличалась от скорости катализа РНКП *T. aquaticus*, а скорость катализа мозаичной РНКП F-Dra была больше в 40 раз. Точечные замены в F-петле также приводили к увеличению скорости катализа в несколько раз. Наибольший эффект на скорость катализа оказывала делеция F-петли, которая приводила к падению скорости синтеза РНК РНКП *T. aquaticus* в 70 раз.

Для того чтобы установить, какую роль играет F-петля в катализе, мы исследовали влияние антибиотика стрептолидигина (Stl) на синтез РНК различными РНКП. Stl связывается в середине F-спирали и препятствует сворачиванию G-петли в ходе катализа. Было установлено, что Stl значительно снижает скорость синтеза РНКП *T. aquaticus* и РНКП F-Dra, но не влияет на скорость РНКП Δ F-loop. Примечательно, что в присутствии антибиотика все исследуемые ферменты имеют примерно одинаковую скорость, сравнимую со скоростью фермента с делецией F-петли в отсутствие Stl. Таким образом, Stl, вероятно, оказывает на присоединение нуклеотида тот же эффект, что и делеция F-петли. Это позволяет предположить, что F-петля способствует правильному сворачиванию G-петли и стабилизирует закрытую конформацию активного центра в ходе катализа.

Ранее было показано, что G-петля обеспечивает высокую точность синтеза РНК за счет стимуляции быстрого включения правильных нуклеотидов по сравнению с неправильными субстратами. Мы показали, что делеция F-петли также нарушает эффективную дискриминацию субстратов. Таким образом, по-видимому, F-петля и G-петля совместно влияют на дискриминацию субстратов РНКП.

В отличие от реакции синтеза РНК мутации в F-петле не оказывали значительного эффекта на скорость расщепления РНК бактериальной РНКП. Было установлено, что РНКП *T. aquaticus*, *D. radiodurans* и РНКП с делецией F-петли имеют одинаковую скорость расщепления РНК. Следовательно, F-петля, по-видимому, не участвует в реакции расщепления РНК.

Таким образом, в данной работе мы показали, что F-петля, расположенная в области активного центра РНКП, играет важную роль в процессе катализа бактериальной РНКП. F-петля непосредственно взаимодействует с G-петлей в закрытой конформации активного центра и аллостерически способствует присоединению нуклеотидов. Замены в F-петле могут служить механизмом адаптивной регуляции скоростей катализа у РНКП мезофильных и термофильных бактерий.

MECHANISMS OF CATALYSIS IN THE ACTIVE CENTER OF BACTERIAL RNA POLYMERASE

Miropolskaya N.A., Kulbachinskiy A.V.

Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow

E-mail: acetabularia@yandex.ru

Fax/tel.: (499) 196-00-15

Bacterial RNA polymerase (RNAP) is a remarkable molecular machine that is able to catalyze several different reactions, including nucleotide addition, the reverse reaction of pyrophosphorolysis, and reactions of exo- and endo-nucleolytic RNA cleavage. These reactions occur in the same active center that undergoes complex conformational changes during catalysis. Recent structural and biochemical studies identified two elements in the largest RNAP subunit (β' in bacteria), the G-loop and the F-helix, which appear to play the key role during the nucleotide addition cycle. Binding of an incoming NTP substrate induces folding of the G-loop, creating a closed, catalytically-competent conformation of the active center, in which the substrate directly interacts with the G-loop and the F-helix and is properly aligned with the template DNA and 3'-OH of the nascent RNA for facile catalysis. Following nucleotide incorporation, the enzyme moves one nucleotide downstream the DNA, which is accompanied by coordinated rearrangements of both the G-loop and the F-helix. However, the detailed mechanisms of conformational changes of the G-loop, the F-helix, and other elements of the active center at different steps of catalysis remain unknown.

RNAPs from thermophilic bacteria display much lower catalytic rates at low and moderate temperatures than the enzymes from mesophilic bacteria. In particular, we demonstrated that *Thermus aquaticus* RNAP synthesizes RNA much slower than its closest mesophilic relative, *Deinococcus radiodurans* RNAP, at temperatures below 37°C. Thus, comparison of the mesophilic and thermophilic RNAPs could reveal structural elements of RNAP that are involved in catalysis. In this work, we sought to identify structural elements of RNAP responsible for the observed differences in catalytic properties between RNAPs from *T. aquaticus* and *D. radiodurans*.

Sequence alignments revealed amino acid substitutions in several elements of the active center in these RNAPs that could play a key role in defining the rate of RNA synthesis. In particular, *D. radiodurans* RNAP contained 4 substitutions in the G-loop, 1 substitution in the F-helix, and 8 substitutions in the F-loop, that is adjacent to the N-terminus of the F-helix and directly interacts the folded G-loop in the closed conformation of the active center. The role of F-loop in RNAP function has not been studied. To assess the role of these substitutions, we created several derivatives of *T. aquaticus* RNAP in which the selected regions were replaced with the corresponding sequences from *D. radiodurans*: (1) RNAP with substitution of the G-loop (G-Dra), (2) RNAP with substitution of the F-loop and F-helix (F-Dra), (3) RNAPs with points amino acid substitutions in the F-loop and F-helix, and (4) RNAP with a deletion of the central part of the F-loop (Δ F-loop).

The rates of catalysis by the wild-type *T. aquaticus* and *D. radiodurans* RNAPs and mutant variants of *T. aquaticus* RNAP were measured using artificially assembled elongation complexes, which allow to analyze single nucleotide addition.

At 20°C, the observed rate of single nucleotide addition by *T. aquaticus* RNAP was 320-fold slower than the rate of *D. radiodurans* RNAP. The rate of catalysis by the mosaic G-Dra RNAP was similar to that of the *T. aquaticus* enzyme, whereas the mosaic F-Dra RNAP was 40-fold faster. Point amino-acid substitutions in the F-loop resulted in a several-fold increase in the rate of catalysis by *T. aquaticus* RNAP. Deletion of the F-loop had the most dramatic effect on the rate of single nucleotide addition, which was reduced 70-fold relative to the wild-type *T. aquaticus* RNAP at different conditions.

To study the functional role of the F-loop in catalysis, we tested effects of antibiotic streptolydigin (Stl) on catalysis by *T. aquaticus* RNAP and its mosaic variants. Stl binds in the middle of the F-helix and blocks folding of the G-loop during nucleotide addition. Stl dramatically slowed nucleotide addition by the wild-type *T. aquaticus* RNAP and F-Dra RNAP. In contrast, Δ F RNAP was essentially resistant to Stl. Remarkably, all three enzymes had similar rates of catalysis in the presence of Stl, comparable to the rate of the Δ F-loop RNAP in the absence of the antibiotic. These data suggest that Stl and the deletion of the F-loop may affect the nucleotide addition reaction in a similar fashion. We thus propose that the F-loop promotes the proper folding of the G-loop and stabilizes the closed conformation of the active center during catalysis.

Recently it has been proposed that the G-loop is important for high fidelity of RNA synthesis, by promoting their faster incorporation of correctly matched NTP substrates in comparison with incorrect substrates. We demonstrated that the Δ F-loop RNAP was unable to efficiently discriminate against the non-cognate substrates. Our results therefore suggest that the F-loop, together with the G-loops, contributes to substrate selection by RNAP.

In contrast to RNA synthesis, the RNA cleavage reaction was not significantly affected by substitutions in the F-loop. The wild-type *T. aquaticus* and *D. radiodurans* RNAPs, and Δ F-loop RNAP and by the mosaic *T. aquaticus* RNAP variants possessed similar rates of intrinsic RNA cleavage, indicating that the F-loop is not required for the RNA hydrolysis by RNAP.

In summary, we identify the F-loop as an additional structural element near the active center that plays an essential role in catalysis by bacterial RNAP. The F-loop directly contacts the G-loop in the closed conformation of the active center and allosterically stimulates nucleotide addition. Substitutions in the F-loop may serve as a mechanism of adaptive regulation of the catalytic rates of RNAPs from mesophilic and thermophilic bacteria.

ПОГЛОЩЕНИЕ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК НЕЙТРОФИЛЬНЫМИ ГРАНУЛОЦИТАМИ И ЭФФЕКТЫ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С КЛЕТКАМИ

*Мухеева Э.Р., Плескова С.Н., Балалаева И.В.**

Нижегородский государственный технический университет
им. Р.Е. Алексеева, Н.Новгород

*Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Н.Новгород

E-mail: elya4.ka@list.ru

Факс: (831) 4-36-94-75; тел.: (813) 4-36-93-57

Квантовые точки являются перспективным материалом для биомедицинских исследований благодаря их уникальным свойствам: устойчивости к фотообесцвечиванию, высокому квантовому выходу, широкому спектру поглощения и узкому – эмиссии. Кроме того, квантовые точки могут быть конъюгированы с биологическими молекулами, что позволяет их использовать для создания систем направленной доставки, визуализации трансмембранного и внутриклеточного транспорта веществ. Поэтому целью данной работы являлось исследование поглощения, внутриклеточного передвижения и выделения квантовых точек одним из типов клеток крови – нейтрофильными гранулоцитами. Впервые было проведено исследование взаимодействия нейтрофилов с квантовыми точками методами сканирующей лазерной и сканирующей зондовой микроскопии в режиме реального времени и зафиксированы процессы фагоцитоза, внутриклеточного трейсинга, агрегации и экскреции квантовых точек нейтрофильными гранулоцитами, а также выявлен эффект подавления квантовыми точками респираторной активности фагоцитов.

Нейтрофильные гранулоциты выделяли из крови здоровых доноров на двойном градиенте фикола-урографина. Квантовые точки CdSe/ZnS, покрытые меркаптоуксусной кислотой (МУК), получены в ИБХ РАН и использованы в начальной концентрации 2 мг/мл. Квантовые точки CdSe/CdS, покрытые МУК, получены также в ИБХ РАН и использованы в начальной концентрации 0,06 мг/мл. Квантовые точки CdSe/ZnS, покрытые полиэтиленгликолем (ПЭГ) производства Eugene, USA, использованы в начальной концентрации 40 нМ.

Квантовые точки поглощаются нейтрофильными гранулоцитами. Это поглощение реализуется традиционным для полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) путем – фагоцитозом. За реализацию механизма фагоцитарного захвата свидетельствуют два факта. Во-первых, нейтрофилы активно формируют псевдоподии (феномен образования псевдоподий зафиксирован как методом сканирующей лазерной, так и сканирующей зондовой микроскопии). Во-вторых, методом конфокальной микроскопии установлено, что через несколько минут после добавления к нейтрофильным гранулоцитам квантовых точек практически все они оказываются внутри фаголизосомальных гранул. Этот факт был установлен благодаря окраске лизотрекером: зеленое свечение маркера лизосом практически полностью

накладывалось на красный флуоресцентный сигнал квантовых точек (суммарный сигнал желтого цвета).

Дальнейший путь квантовых точек внутри клетки, по всей видимости, предполагает выход квантовых точек из фаголизосом. Косвенным признаком выхода квантовых точек из фаголизосом является снижение респираторной активности клетки через 70 мин инкубации с квантовыми точками. В работах Nel A. и соавт. (2006) показано, что квантовые точки, как и другие наноматериалы, индуцируют образование в клетках активных форм кислорода (АФК). Но этот процесс возможен только в том случае, если квантовые точки будут обнаружены в объеме цитоплазмы. Токсический эффект образуемых АФК может проявляться при окислении ферментов, катализирующих реакции гексозомонофосфатного шунта – основного источника НАДФН₂ и/или непосредственно НАДФН-оксидазы. Истощение ферментативного резерва клетки регистрируется нами по снижению числа гранул диформаза как в спонтанном, так и в стимулированном НСТ-тесте. Подавление респираторной активности фагоцитов является дозозависимым. В частности, при использовании наименьшей концентрации квантовых точек – 0,003 мг/мл – происходило ингибирование спонтанного НСТ-теста на 19%, а стимулированного на 11%, тогда как при воздействии максимальной концентрации – 0,06 мг/мл показатели спонтанного НСТ-теста снижались на 47%, а стимулированного – на 50%.

Внутриклеточный тре́йсинг квантовых точек мог иметь разный характер. Для подавляющего большинства нейтрофилов отмечено внутриклеточное движение квантовых точек. Оно имело разный характер: часть нейтрофильных гранулоцитов экскретировали агрегаты квантовых точек, для других ПМЯЛ зарегистрирован обмен квантовыми точками, некоторые клетки покрывались сверху квантовыми точками на одном из полюсов. Многие клетки после гибели были окружены ореолом из квантовых точек. Гораздо меньшее количество клеток характеризовалось отсутствием цитоплазматического перемещения квантовых точек: в этом случае наночастицы аккумулировались в одном из компартментов клеток (но всегда вне ядра).

Таким образом, в представленной работе доказана перспективность использования квантовых точек для исследования процессов поглощения, внутриклеточного транспорта и экскреции клеток. Однако данный тип наночастиц не является биоинертным, поскольку при поглощении квантовых точек снижается эффективность респираторного взрыва.

PHAGOCYTOSIS OF QUANTUM DOTS BY NEUTROPHIL GRANULOCYTES AND EFFECTS OF THEIR INTERACTION WITH CELLS

*Mikheeva E.R., Pleskova S.N., Balalaeva I.V.**

Nizhni Novgorod State Technical University of R. Y. Alekseev, N. Novgorod

*Nizhni Novgorod State University of N.I. Lobachevsky, N. Novgorod

E-mail: elya4.ka@list.ru

Fax: (831) 4-36-94-75; tel.: (813) 4-36-93-57

Quantum dots are a perspective particle for biomedical researches, because they have unique properties: stability to photobleaching, a high quantum emission, a wide spectrum of absorption and narrow – emission. Besides quantum dots can be conjugate with biological molecules that allows to use them for creation of the delivery systems, visualization the process of transmembrane and endocellular transports. Therefore the purpose of this presents work was research of phagocytosis, endocellular movement and excretion of quantum dots by one of blood cells types – neutrophils granulocytes. In this work the methods of scanning laser and force microscopy have been used to pioneer for studying the interaction of neutrophils with quantum dots into real time regime. It has been fixed the processes of phagocytosis, endocellular moving, aggregations and excretions quantum dots by neutrophils granulocytes. For the first time has been detected the effect of suppression of phagocytes respiratory activity by quantum dots.

Neutrophils granulocytes were separated from the blood of healthy donors on a double gradient fikoll-uurografin. The quantum dots CdSe/ZnS, which covered mercaptoacetic acid (MAA), was received in Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, were used in initial concentration of 2 mg/ml. The quantum dots CdSe/CdS, which covered MAA, was received in Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, were used in initial concentration of 0,06 mg/ml. The quantum dots CdSe/ZnS, which covered by polyethyleneglycol (PEG), of manufacture Eugene, USA were used in initial concentration of 40 nM.

The neutrophils granulocytes were absorbed quantum dots. This absorption is realised traditionally for polimorfo-nuclear leukocytes (PMNL) by a phagocytosis. The proofs of phagocytosis realization were two facts. First, of all the neutrophils were formed pseudopodia (very the active phenomenon of pseudopodia formation was fixed by two methods: scanning laser and scanning force microscopy). Second, it was established that after addition of quantum dots to neutrophils granulocytes they localize into phagolysosomes granules of cells some minutes late. This fact has been established by using confocal microscopy and stain by lysotrekker: a green luminescence of lysosomes marker was almost completely overlapping on quantum dots red fluorescent signal (a total signal was yellow).

We supposed that the further way of quantum dots inside a cells was concerned with the exit of quantum dots from phagolysosomes. An indirect evidence of quantum dots exit was decrease in cells respiratory activity after 70 min incubation. In paper of Nel A. et al. (2006) it was shown that quantum dots as well as other nanomaterials induce formation in cells of reactive oxygen species (ROS). But

this process is possible only if quantum dots are found out in cytoplasm volume. The toxic effect of forming ROS can be shown in enzymes oxidation. The ROS can destructed the enzymes of hexoso-monophosphate pathway – the basic source NADPH₂ and/or is direct NADPH-oxidase. There was a decrease in the number of cells enzymes was registered because of number of granules dyformazan was decrease both in spontaneous and in stimulation of NBT-test. Suppression of respiratory activity of phagocytes was depended from dose. In particular use of the minimum concentration of quantum dots – 0,003 mg/ml – inhibition of the spontaneous NBT-test on 19 %, and stimulation on 11 % was observed whereas at influence of the maximum concentration – 0,06 mg/ml of the spontaneous NBT-test decreased on 47 %, and stimulation on 50 % was established. Endocellular moving quantum dots could have the different character. For the overwhelming majority neutrophils was noted endocellular movement of quantum dots. It had different character: a part of neutrophils granulocytes excretion conjugates of quantum dots, for others PMNL was registered the exchange of the quantum dots, some cells became covered by quantum dots on one of side. Many cells after destruction have been surrounded by an aureole from quantum dots. Less of cells was characterised by absence of cytoplasmatic moving of quantum dots: in this case a nanoparticle accumulated in one compartment of cells (but always outside a nucleus).

Thus, in the presented work perspective of use of quantum dots for research processes of cells phagocytosis, endocellular transport and excreting was proved. However this type of nanoparticles is not bioinert because at the phagocytosis of quantum dots decrease of neutrophils respiratory burst.

СЕЛЕКЦИЯ ДНК-АПТАМЕРОВ, СПЕЦИФИЧЕСКИ ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С ФИБРИЛЛЯРНОЙ ФОРМОЙ БЕЛКА Sup35 ДРОЖЖЕЙ

Морозкина Е.В., Сурина Е.Р., Марченко А.Н., Антипин А.А.,
Митькевич О.В.**, Кушниров В.В.***, Беневоленский С.В.,
Тер-Аванесян М.Д.***

Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, Москва

*ФГУП "ГосНИИгенетика", Москва

**ФГУ "Российский кардиологический научно-производственный
комплекс" Росмедтехнологий, Москва

E-mail: Morozkina@inbi.ras.ru

Факс/тел.: (495) 648-09-12

Прионы млекопитающих – особый класс инфекционных агентов, вызывающих неизлечимые заболевания центральной нервной системы у людей (болезнь Крейтцфельда-Якоба, куру, синдром Герстмана-Штраусслера-Шейнкера) и животных (губчатая энцефалопатия – "коровье бешенство"). В отличие от всех известных патогенов, прионы не содержат генома, а их инфекционность связана с белком, называемым PrP. Этот белок может существовать в альтернативных конформационных формах – инфекционной (фибриллярной, PrP^{Sc}) и неинфекционной (мономерной, PrP^C), причем инфекционная форма способна катализировать превращение нормальной формы в инфекционную посредством белок-белковых взаимодействий. Создание системы детекции, позволяющей специфически различать фибриллярную и мономерную формы белка, является актуальной задачей, решение которой позволит разработать методы экспресс-диагностики и профилактики прионных заболеваний.

У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, в отличие от млекопитающих, способность белков переходить в прионное состояние не вызывает тяжелых нейродегенеративных заболеваний. Одной из наиболее удобных систем для изучения процесса прионизации белков является нехромосомно наследуемый генетический детерминант [PSI⁺] дрожжей *S. cerevisiae*, чье возникновение и наследование связано с переходом в прионное состояние фактора терминации трансляции Sup35, который может существовать в альтернативных состояниях – в виде функционально-активных мономеров и в фибриллярной (прионной) форме. Белок Sup35 состоит из трех доменов: С-концевой домен отвечает за функцию белка в терминации трансляции, N-концевой домен необходим для наследования [PSI⁺], а роль среднего М-домена до конца не выяснена. В качестве молекулы-мишени был получен рекомбинантный Sup35NM в мономерной и фибриллярной формах.

Известно, что метод SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) позволяет находить фрагменты нуклеиновых кислот (аптамеры), обладающие способностью специфически связываться с белковой мишенью с высокими показателями сродства. Нами было проведено 9 последовательных стадий отбора аптамеров, способных

специфически связываться с фибриллярной формой Sup35NM и не взаимодействующих с мономерным белком. После девятого цикла доля олигонуклеотидов, специфически связывающихся с фибриллами, достигла 40%. Полученные аптамеры в двухцепочечной форме клонировали и секвенировали, анализ нуклеотидных последовательностей показал присутствие довольно протяженных гомологичных участков (до 24 нуклеотидов). Отобранные аптамеры с высокой степенью гомологии в переменных участках (S1-S10) синтезировали химически, помещая биотин на 5'-конец ДНК. Изучение эффективности взаимодействия аптамер-фибрилла показало, что константы диссоциации (K_d) комплексов аптамер-фибриллярный Sup35NM находятся в диапазоне 0,1-1,0 мкМ и сравнимы с величинами, характеризующими взаимодействие белков с антителами. Оценка специфичности связывания синтезированных аптамеров при помощи ИФА-подобной методики обнаружила, что связывание ДНК-аптамеров с полимерной формой Sup35NM происходит в 5-10 раз более эффективно, чем с мономерами этого белка. В ходе предварительных исследований отобранные аптамеры обнаружили способность специфически связываться как с дрожжевыми прионами, так и с образцами прионов животного происхождения, что может стать основой для создания системы диагностики и лечения прионных заболеваний.

Работа была поддержана грантами ISTC 2750, CRDF 2859 и РФФИ №08-04-0062; № 07-04-91105.

Литература

1. Surina E.R., Morozkina E.V., Marchenko A.N., et al. (2009) *Molecular Biology*, **43**(4), 626-631.
2. Antipin A.A., Nadtochei G.A., Ter-Avanesyan M.D., et al. Application for RU patent № 2008136467 from 10.09.2008.

SELECTION OF DNA APTAMERS, SPECIFICALLY INTERACTING WITH FIBRILLAR FORM OF THE YEAST Sup35 PROTEIN

Morozkina E.V., Surina E.R., Marchenko A.N., Antipin A.A.,
Mitkevich O.V.**, Kushnirov V.V.**, Ter-Avanesyan M.D.**,
Benevolensky S.V.*

A.N. Bach Institute of Biochemistry RAS, Moscow

*GosNIIGenetika, State Federal Unitary Enterprise, Moscow

**Russian Cardiology Research and Production Center, Moscow

E-mail: Morozkina@inbi.ras.ru

Fax/tel.: (495) 648-09-12

Prions are a unique class of infectious agents whose infectivity is related solely to protein. The PrP^C refers to the endogenous prion protein, which is found in a multitude of tissues, while PrP^{Sc} refers to the misfolded form of PrP^C, and is responsible for the formation of amyloid plaques that lead to neurodegeneration. The PrP^{Sc} has been implicated in a number of diseases, including bovine spongiform encephalopathy in cattle (also known as "mad cow disease"), Creutzfeldt-Jakob and Gerstmann-Straussler-Scheinker disease in humans. The infectious form PrP^{Sc} can catalyze conversion of the normal cellular form PrP^C into PrP^{Sc}. A related phenomenon was described in *Saccharomyces cerevisiae*. One of the most convenient models for studying the prion transformation of proteins is provided by the *S. cerevisiae* [*PSI⁺*] genetic determinant with a non-chromosomal inheritance; its origin and inheritance is associated with the prion transformation of the translation termination factor Sup35p. The prion transformation of Sup35p leads to its conformational rearrangement and polymerization. Thus, Sup35p occurs in two alternative forms, as functionally active monomers and inactive (prion) fibrils. Sup35p consists of three domains: the C-terminal (C) domain plays a vital role and is responsible for the Sup35p function in translation termination, the N-terminal (N) domain is necessary and sufficient for the origin and inheritance of [*PSI⁺*], that is, for the prion transformation of Sup35p. The role of the middle (M) domain is not completely understood. Recombinant Sup35NM was obtained as monomers and fibrils for using as target for development of DNA aptamers by SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment). SELEX is the procedure of selection from an enormous mixture of short DNA or RNA oligonucleotides with randomized sequence those which can specifically and with high affinity bind to the ligand of interest. We carried out nine consecutive rounds to select the aptamers that specifically interacted with Sup35NM fibrils, but not bind with monomeric form of Sup35NM. The portion of oligonucleotides specifically binding to fibrils reached 40% after round 9. The aptamers were amplified in the doublestranded form, cloned, and sequenced. The nucleotide sequences of 40 aptamers were tested for homology regions. Relatively long (up to 24 bp) homology regions were found in several aptamers. The aptamers that had several homologs among other aptamers were of particular interest. These aptamers (S1-S10) were chemically synthesized and 5'-biotinylated to allow aptamer – target binding assays. The dissociation constant (K_d) was estimated for aptamer-fibrillar Sup35NM complexes. The K_d values obtained for the other

aptamers ranged from 0.1 to 1.0 mkM. Aptamer affinity for target molecules reach values comparable with affinities of antibodies. The binding specificity of the synthetic aptamers was evaluated by an ELISA-like assay. The DNA aptamers bound to polymeric Sup35NM with a five- to tenfold higher efficiency than to monomeric Sup35NM. Selected aptamers demonstrated the possibility to bind specifically protein prion forms both in yeast and in animal samples and become a base for development of diagnostic kits and therapeutic means against prion diseases.

This work was financially supported by the ISTC 2750, CRDF 2859 and RFFI №08-04-0062; № 07-04-91105.

References

1. Surina E.R., Morozkina E.V., Marchenko A.N., et al. (2009) *Molecular Biology*, **43**(4), 626-631.
2. Antipin A.A., Nadtochei G.A., Ter-Avanesyan M.D., et al. Application for RU patent № 2008136467 from 10.09.2008.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ МУТАЦИИ, ПРИВОДЯЩИЕ К ЗАМЕНЕ 72 ЛИЗИНА В МОЛЕКУЛЕ СОМАТИЧЕСКОГО ЦИТОХРОМА С МЫШИ

Муфазалов И.А.^{1,2}, Купраш Д.В.¹, Пеньков Д.Н.¹, Черняк Б.В.³, Плетюшкина О.Ю.³, Высоких М.Ю.³, Черткова Р.В.⁴, Кирпичников М.П.⁴, Долгих Д.А.⁴, Круглов А.А.^{1,2}, Зворыкина С.В.⁵, Анохин К.В.⁵, Скулачев В.П.^{2,3}, Недоспасов С.А.^{1,3}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

²Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

³Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

⁴Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

⁵Институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН, Москва

E-mail: mufazalov-ilg@yandex.ru

Тел.: (499) 135-99-64

В клетках эукариот цитохром *c* выполняет две главные функции: во-первых, находясь на митохондриальной мембране, участвует в переносе электронов по дыхательной цепи, поддерживая жизнедеятельность клетки, и, во-вторых, является важным медиатором апоптотического каскада, приводящего к клеточной гибели. Ранее было установлено, что мыши лишённые цитохрома *c*, гибнут на ранних стадиях эмбриогенеза, в первую очередь, из-за неспособности клеток к окислительному фосфорилированию. Структурно-функциональные исследования позволили определить, какие аминокислотные остатки в молекуле цитохрома *c* важны для про-апоптотической функции белка. Чрезвычайно важным оказался лизин в 72 положении, причем его замена на аланин приводила к повышенной устойчивости эмбриональных фибробластов (МЭФ) к таким видам клеточного стресса как действие ультрафиолетового облучения или обработка стауроспорином. Основываясь на результатах экспериментов *in vitro* с различными мутантными формами цитохрома *c*, перед нами была поставлена задача по получению мутантных мышей, в которых в ген соматического цитохрома *c* была бы внесена мутация, приводящая к замене лизина в 72 положении на триптофан (K72W). Ожидалось, что у таких мышей при нормальной функции переноса электронов будет драматически замедлен апоптоз, осуществляемый через митохондрии, что должно было проявиться во многих тканях, где гомеостаз поддерживается балансом между пролиферацией и клеточной гибелью. Такие мыши были сконструированы с помощью технологии генетического нокаута, и из них, а также из контрольных мышей, были получены первичные культуры МЭФ. В нашей работе были получены первые фенотипические результаты как на самих мышцах, так и при изучении свойств МЭФ. Вопреки ожиданиям, основанным

на данных литературы, оказалось, что как гетерозиготные, так и гомозиготные мыши с мутацией K72W способны достигать зрелого возраста и давать потомство. Однако при скрещивании гомозиготных мышей с гетерозиготными наблюдалось отклонение от ожидаемого расщепления потомства (1:1) в пользу гетерозигот. При анализе выборки из 100 мышей эта разница достигала 33%, что указывало на сниженную выживаемость гомозиготных мышей. Кроме того, 11% рожденных гомозиготных мышей характеризовались ранней постнатальной летальностью, а 33% погибали, не достигнув возраста в 70 дней. Из этих мышей 10% проявляли признаки кахексии, 10% макроцефалии, а оставшиеся 13% погибали без видимых патологических отклонений. В постнатальном онтогенезе можно выделить два периода выраженной смертности мутантных мышей (в первую очередь, самцов) – несколько первых дней после рождения и 3-4 неделя. К моменту достижения полового созревания соотношение самки/самцы соответствует 2,15, при этом значимых отличий в фенотипах самцов и самок обнаружено не было. Примерно половина выживающих гомозиготных мышей неотличима по внешним морфологическим параметрам от мышей дикого типа, более того, несколько гомозиготных мышей уже достигли возраста в 1,5 года, что свидетельствует в пользу порогового эффекта неизвестной пока природы при проявлении данной мутации. В ходе исследования анатомии головного мозга гомозиготных мутантных мышей без видимых фенотипических отклонений найдено, что все характерные структуры имеют нормальное строение и локализацию, хотя пока нельзя исключить более тонких отклонений от нормы. С другой стороны, при гистологическом анализе мышей с макроцефалией было показано аномальное увеличение желудочков мозга, что является характерным признаком гидроцефалии. В результате анатомические структуры мозга имели измененные формы и были смещены друг относительно друга. Эксперименты *in vitro* показали, что МЭФ из гомозиготных мышей неотличимы по внешним морфологическим параметрам от клеток дикого типа и экспрессируют только соматическую изоформу цитохрома *c* (без компенсаторной активации экспрессии тестикулярной формы). Как и ожидалось, внесение мутации не повлияло на локализацию цитохрома *c* в клетке и не нарушило функцию дыхания. Однако при действии индукторов апоптоза, таких как эметин и стауроспорин, гомозиготные клетки в цитотоксическом тесте были значительно устойчивее контрольных. Вместе с тем, количественные различия оказались не столь драматичными, как предсказывали данные литературы. Как и ожидалось, при активации внешнего (немитохондриального) апоптотического каскада с помощью фактора некроза опухолей (ФНО) клетки погибали сходным образом вне зависимости от генотипа.

Таким образом, нами впервые созданы и охарактеризованы мутантные мыши с заменой K72W, часть которых имеет явные анатомические аномалии, а другая - внешне нормальна и будет служить ценной моделью для будущего изучения многих физиологических процессов, в частности, старения. Кроме того, нами создана клеточная модель МЭФ, которая уже выявила интересные отличия от нормы и которая позволит исследовать роль мутантного цитохрома *c* в физиологии клетки, в частности при апоптотических каскадах, запускаемых различными агентами.

BIOLOGICAL EFFECTS OF MOUSE SOMATIC CYTOCHROME C MUTATION RESULTING IN REPLACEMENT OF LYSINE IN 72nd POSITION

Mufazalov I.A.^{1,2}, Kuprash D.V.¹, Penkov D.N.¹, Chernyak B.V.³,
Pletjushkina O.Y.³, Vyssokikh M.Y.³, Chertkova R.V.⁴, Kirpichnikov M.P.⁴,
Dolgikh D.A.⁴, Kruglov A.A.^{1,2}, Zworykina S.V.⁵, Anokhin K.V.⁵,
Skulachev V.P.^{2,3}, Nedospasov S.A.^{1,3}

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow

²Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow State University, Moscow

³Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow

⁴Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

⁵Anokhin Research Institute of Normal Physiology RAMS, Moscow

E-mail: mufazalov-ilg@yandex.ru

Tel.: (499) 135-99-64

Cytochrome *c* has two main functions in eukaryotic cells: it is involved in electron transfer in the respiratory chain thus maintaining life cycle of the cells; it also is an important mediator of apoptotic cascade. Mice lacking cytochrome *c* showed lethality in early embryonic stages mostly due to disruption of oxidative phosphorylation. Structure-functional analysis revealed amino acid residues important for pro-apoptotic function of cytochrome *c*. Particularly, lysine in position 72 was demonstrated to be crucial for this function as its substitution by alanine resulted in increased resistance of mouse embryonic fibroblasts (MEF) to several types of cell stress, such as UV irradiation and staurosporin treatment. Taking into consideration earlier *in vitro* data concerning the properties of distinct mutant forms of cytochrome *c*, we decided to create mice with mutation in somatic cytochrome *c* gene which would lead to lysine-to-tryptophan substitution in position 72 (K72W). In such mice the electron transfer process was expected to be unimpaired, while mitochondria-mediated apoptosis should be delayed or abrogated. Abnormal phenotype was expected to be manifested in many tissues in which homeostasis is regulated by the balance between proliferation and cell death. K72W mutant mice were generated in our laboratory by knockout technology utilizing two types of recombination systems (Cre and Flp). Primary cultures of mouse embryonic fibroblasts (MEFs) from the mutants as well as from control mice were prepared and studied. Contrary to our expectations based on published data, some heterozygous as well as homozygous mice were grossly normal and fertile. However, when we crossed homozygous and heterozygous mice, a deviation from expected normal Mendelian ratio (1:1) with the increase in heterozygous offspring was observed. Sampling analysis of 100 mice suggested decrease in survival of homozygous males. About 10% of homozygous mice showed early postnatal lethality and more than 30% died until the age of 70 days. 10% of these mice showed signs of cachexia, 10% showed signs of macrocephaly, and remaining

13% died without obvious pathology detected. We identified two periods of increased mortality (foremost for males) – several days after birth and in 3-4 week interval after birth. By the time of puberty females/males ratio reached 2.15, without significant phenotypic differences between males and females. Strikingly, approximately half of survived homozygous mice could not be distinguished from wild type mice by physical examination, and some of homozygous mice survived to the age of 1.5 year. These observations imply the existence of thresholds in manifestation of K72W phenotype of unknown nature. Brain anatomy analysis of homozygous mice without obvious abnormalities revealed that all typical structures have normal texture and localization, but we could not exclude more subtle aberrations. On the other hand, histological analysis of mice with macrocephaly showed abnormal enlargement of brain ventricles which is a typical sign of hydrocephaly. As a result shapes of anatomical structures were changed and were displaced from their normal location. *In vitro* experiments revealed that MEFs from homozygous mice and wild type mice showed no difference in morphology. Cell cultures expressed only mutant somatic cytochrome *c* without compensatory expression of testicular isoforms. As expected, the mutation did not affect cytochrome *c* localization inside the cell and did not disrupt its respiratory functions. However, in cytotoxicity assays homozygous cells were significantly more resistant to treatment with pro-apoptotic inducers, such as emetin and staurosporin, than control cells. However, the quantitative differences were not as striking as could be expected based on published *in vitro* data. Expectedly, when extrinsic (non-mitochondrial) apoptotic pathway was activated by treatment with tumor necrosis factor (TNF) there was no difference between cells of various genotypes. In conclusion, we were the first to create and characterize K72W mutant mice, some of them having obvious anatomical abnormalities (in particular, in brain) and others grossly normal. The latter could become an important animal model in the future research of many physiological processes, including ageing. Moreover, we have prepared and characterized cellular MEF model from such mice, which has already revealed interesting differences. This model will prove to be helpful in further studies on the role of mutant cytochrome *c* in cell physiology, particularly in regulating apoptotic pathways that are activated in response to various agents.

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СИСТЕМЫ РЕСТРИКЦИИ-МОДИФИКАЦИИ *Eco29kI*

Нагорных М.О., Захарова М.В., Солонин А.С., Северинов К.В.***

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пущино

*Институт молекулярной генетики РАН, Москва

**Институт биологии гена РАН, Москва

E-mail: mz412@rambler.ru

Факс: (495) 956-33-0; тел.: (4967) 73-18-20

Система рестрикции-модификации *Eco29kI* (СРМ *Eco29kI*) локализована на плазмиде рЕСО29 в природном штамме *E. coli* 29k. СРМ *Eco29kI* состоит из двух последовательно расположенных генов. Первый ген (*eco29kIR*) кодирует эндонуклеазу рестрикции, второй ген (*eco29kIM*) – метилтрансферазу. Экспрессия этих двух генов должна находиться под жестким контролем, чтобы не допустить гидролитическое расщепление хозяйской ДНК до ее модификации метилтрансферазой. В то же время, логика генетического устройства СРМ *Eco29kI*, на первый взгляд, предполагает наработку эндонуклеазы раньше метилтрансферазы. В данной работе мы обнаружили, что СРМ *Eco29kI* имеет несколько регуляторных элементов, которые позволяют плазмиде рЕСО29 эффективно устанавливаться и поддерживаться в хозяйской бактериальной клетке. С двух промоторов, формирующих промоторный регион (ResP) гена *eco29kIR* и расположенных перед геном эндонуклеазы *eco29kIR*, транскрибируются две бицистронные мРНК. Кроме того, у гена метилтрансферазы *eco29kIM* обнаружен собственный промотор, расположенный внутри гена эндонуклеазы *eco29kIR*. Трансляция этой мРНК позволяет синтезироваться метилтрансферазе на ранней стадии установления плазмиды рЕСО29 в новой бактериальной клетке. Также мы обнаружили два промотора, транскрибирующих в обратном направлении (антисенс-промоторы) и расположенных внутри структурной части гена *eco29kIR*. Активность этих промоторов приводит к значительному уменьшению синтеза эндонуклеазы с бицистронной мРНК, также давая преимущество во времени для наработки метилтрансферазы. Присутствие антисенс-промоторов в трансляционных слитных белках с репортерным геном *lacZ* приводит к ~10-кратному падению синтеза β-галактозидазы с промоторного региона ResP. Схожий результат был получен, когда был использован трансляционный слитный белок с точечными мутациями в -10 области антисенс-промоторов. С помощью метода удлинения праймера удалось выяснить, что падение синтеза β-галактозидазы происходит параллельно с падением уровня мРНК, транскрибирующихся с промоторного региона ResP в присутствии антисенс-промоторов.

Для доказательства гипотезы, что транскрипты с антисенс-промоторов вызывают падение уровня экспрессии эндонуклеазы *Eco29kI.R*, клетки, несущие трансляционный слитный белок ResP-AS::lacZ, были протрансформированы совместимой плазмидой, которая продуцировала антисенс-транскрипты, но не продуцировала бицистронную мРНК. В присутствии совместимой плазмиды продукция β-галактозидазы значительно

снижалась, равно как и количество мРНК, которые синтезировались с промоторного региона ResP. Таким образом, антисенс-транскрипты могут действовать *in trans*.

Наши результаты показывают, что координированная экспрессия генов СРМ *Eco29kI* достигается за счет:

1) увеличения синтеза метилтрансферазы *Eco29kI.M* за счет дополнительного промотора, который находится в структурной части гена эндонуклеазы *eco29kIR*;

2) уменьшения синтеза эндонуклеазы *Eco29kI.R*, связанного с активностью антисенс-промоторов, которые также расположены в структурной части гена эндонуклеазы *eco29kIR*. РНК, продуцирующаяся с этих промоторов, уменьшает уровень синтеза эндонуклеазы *Eco29kI.R*, ингибируя трансляцию гена *eco29kIR*, либо вызывая деградацию мРНК.

REGULATION OF GENE EXPRESSION IN RESTRICTION-MODIFICATION SYSTEM *Eco29kI*

*Nagornykh M.O., Zakharova M.V., Solonin A.S., Severinov K.V.****

Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino

*Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow

**Institute of Gene Biology RAS, Moscow

E-mail: mz412@rambler.ru

Fax: (495) 956-33-70; tel.: (4967) 73-18-20

Eco29kI restriction-modification system is localized on the pECO29 plasmid of *E. coli* strain 29k. Restriction-modification system *Eco29kI* consists of two co-transcribed genes. The first gene (*eco29kIR*) encodes restriction endonuclease, the second gene (*eco29kIM*) encodes methyltransferase. Expression of these genes must be tightly regulated to prevent cleavage of host DNA before methylation occurs. The genetic architecture of *Eco29kI* is counter-intuitive as it seems to favor premature expression of the endonuclease gene. In this work, we uncovered several regulatory elements that contribute to efficient establishment and stable maintenance of pECO29 in host bacteria. At least two different bicistronic mRNAs are transcribed from two promoters located upstream of the *eco29kIR* gene, forming ResP region. In addition, *eco29kIM* gene has its own promoter located inside *eco29kIR*. Translation of this monocistronic mRNA allows early accumulation of protective methyltransferase during pECO29 establishment in naïve hosts. We also found two antisense promoters located within the structural part of the *eco29kIR* gene. The activity of these promoters results in dramatic reduction of endonuclease synthesis from bicistronic mRNA, further stimulating methylase synthesis. The presence of AS promoters in translational fusions with *lacZ* reporter gene, led to ~10-fold decrease in β -galactosidase production from ResP. A similar result was obtained when a translational fusion harboring down-mutations in -10 promoter elements of AS promoters was used. Primer extension analysis revealed that the drop in β -galactosidase production was paralleled by decrease in steady-state levels of ResP-initiated transcripts in the presence of AS promoters.

To support the idea that AS promoter transcripts cause a drop in *Eco29kI.R* expression on a post-transcriptional level, cells bearing a ResP-AS::lacZ fusion plasmid were transformed with a compatible plasmid, that produces asRNA but does not produce bicistronic mRNA. The presence of the second plasmid led to a significant drop in β -galactosidase production and almost complete disappearance of primer extension product corresponding to ResP-initiated transcripts. Thus, AS-initiated transcripts can act *in trans*.

Our results reveal that coordinate expression of the *Eco29kI* system genes is achieved by:

1) increased synthesis of *Eco29kI.M* due to an additional promoter located within the structural part of *eco29kIR* gene;

2) decreased synthesis of *Eco29kI.R* due to the activity of antisense promoters also located in the structural part of *eco29kIR*. RNA produced from these promoters decreases the level of *Eco29kI.R* synthesis by decreasing the level of *eco29kIR* translation and/or inducing degradation of this transcript.

УНИФИЦИРОВАННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ СОЗДАНИЯ СОРБЕНТОВ И СЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК ДЛЯ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ И АНАЛИЗА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Никитина И.И., Булатов Э.Р., Бондарь О.В., Абдуллин Т.И.

Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина,

Казань

E-mail: nikitinairi@gmail.com

Тел. (843) 231-52-52

Анализ нуклеиновых кислот (НК) служит основой молекулярной диагностики заболеваний человека, идентификации личности, а также мониторинга генотоксических веществ и материалов. С другой стороны, НК являются перспективными лекарственными агентами, применяемыми для генной терапии широкого круга заболеваний и получения вакцин. Актуальной проблемой в анализе НК и генной терапии остается создание эффективных методов выделения, последующей очистки и исследования состава НК. Важными характеристиками этих методов должны являться высокая селективность, низкие трудоемкость и себестоимость. Нами разработана технология выделения / тонкой очистки ДНК, а также экспресс-анализа ее структуры и определения ДНК-повреждающих факторов.

В основе технологии лежит использование углеродных нанотрубок (УНТ) – графитового наноматериала, обладающего уникальными структурными и физико-химическими свойствами [1]. Коммерческий препарат УНТ подвергали стандартному химическому окислению в сочетании с ультразвуковым диспергированием. Данная процедура позволяет очистить УНТ от примесей и получить стабильную водную суспензию УНТ, содержащих поверхностно-активные кислородсодержащие группы.

Окисленные УНТ использовали в качестве активного компонента электрохимических сенсоров (электродов), как описано ранее [2,3]. Показано, что благодаря каталитическому эффекту УНТ значительно увеличивают чувствительность прямого определения биомолекул, в том числе ДНК и ее компонентов, на электродах, модифицированных УНТ. На этих электродах ДНК интенсивно окисляется при потенциале около +1 В, причем сигнал окисления сильно зависит от структурного состояния ДНК. Это позволило разработать информативные сенсоры для комплексного анализа процессов повреждения ДНК, включая ее денатурацию, депуринизацию, окислительную модификацию, а также расщепление.

В частности, нами показано, что в результате фрагментации ДНК сигнал окисления увеличивается пропорционально степени повреждения ДНК вследствие улучшения ее адсорбции на УНТ. Разработанный сенсор характеризуется экспрессностью и высокой селективностью, достаточной для определения в сыворотке крови активности ДНК-гидролизующих ферментов – маркеров аутоиммунных и онкологических заболеваний.

Чувствительность сенсоров к структурным дефектам ДНК объясняется сильной адсорбцией азотистых оснований на поверхности УНТ [4]. Это

показывает возможность использования приготовленных УНТ в качестве сорбентов для выделения и фракционирования ДНК. Нами изучена адсорбция плазмидной ДНК pEGFPN2 в разных конформациях на поверхности УНТ с помощью электрофореза в геле и динамического рассеивания света.

Нативную (суперскрученную) ДНК переводили в линейную и частично денатурированную формы путем расщепления рестриктазами и прогрева, соответственно. ДНК соинкубировали с УНТ в разных буферных растворах с последующим удалением сорбента центрифугированием. Установлено, что в отсутствие ионов двухвалентных металлов УНТ избирательно адсорбируют линейную и денатурированную формы ДНК и не связываются с суперскрученной формой. В присутствии ионов Mg и Mn (II) УНТ обратимо связывают суперскрученную ДНК вследствие хелатирования. Разработанный метод адсорбции ДНК с помощью УНТ отличается высокой эффективностью и может быть использован для выделения и очистки суперскрученной плазмидной ДНК (терапевтического агента) от биологически неактивных примесей нуклеиновых кислот. Это представляет интерес для получения высокоактивных и безопасных препаратов плазмидной ДНК для генной терапии и вакцинации.

Предложенная технология позволяет создавать на основе модифицированных УНТ сенсоры и сорбенты, которые, наряду с высокой эффективностью, характеризуются низкой себестоимостью и возможностью коммерциализации. В частности, разработанные методы определения ДНК-повреждающих факторов (заявки на получение патента РФ № 2008132249, № 2008137068) адаптируемы для проведения анализа с использованием недорогих одноразовых электродов, изготавливаемых по технологии трафаретной печати. Разработанные сорбенты являются готовым продуктом, который может быть использован для фракционирования НК и дополнительной очистки плазмидной ДНК (заявка на получение патента РФ № 2008140011).

Литература

1. A. Merkoci, M. Pumera, X. Llopis, et al. *Trends Anal. Chem.* 2005. **24**. P. 826-838.
2. Т.И. Абдуллин, И.И. Никитина, Д.Г. Ишмухаметова, и др. *Журн. аналит. химии.* 2007. **62**(6). С.667-671.
3. Т.И. Абдуллин, И.И. Никитина, О.В. Бондарь, и др. *Рос. нанотехнологии.* 2007. **2**(7-8). С.156-160.
4. Т.И. Абдуллин, И.И. Никитина, О.В. Бондарь. *Электрохимия.* 2008. **44**(11). С.1346-1350.

UNIFORM DEVELOPMENT OF CARBON NANOTUBE-BASED SORBENTS AND SENSORS FOR SEPARATION AND ANALYSIS OF NUCLEIC ACIDS

Nikitina I.I., Bulatov E.R., Bondar O.V., Abdullin T.I.

V.I. Ulyanov-Lenin Kazan State University, Kazan

E-mail: nikitinairi@gmail.com

Tel.: (843) 231-52-52

Nucleic acid analysis is a basis for molecular diagnostics of human diseases, personality identification, monitoring genotoxicity of substances and materials. On the other hand, nucleic acids are promising agents for gene therapy of various illnesses and vaccine preparation. Creation of effective methods for isolation, further purification and characterization of nucleic acid composition still remains being issue of the day in analysis of nucleic acids and gene therapy. Crucial features of these methods are high selectivity, low labour-intensiveness and cost price. We developed a technology for isolation and purification of DNA that is also appropriate for express-analysis of its structure and determining the DNA-damaging factors.

Technology is based on employing carbon nanotubes (CNT), a graphitic nanomaterial, possessing unique structural and physicochemical properties [1]. Commercial preparation of CNTs (prepared by CVD method) was subjected to a standard chemical oxidation in combination with ultrasound dispersion. This procedure allows purifying CNTs of impurities and obtaining water suspension of CNTs containing surface-active oxygenated groups.

Oxidized CNTs were used as an active component of electrochemical sensors (electrodes) as described in [2, 3]. It was shown that catalytic ability of CNTs on CNT-modified electrodes has a great effect on increasing the sensitivity of direct identification of biomolecules, including DNA and its components. DNA is actively oxidized on these electrodes at the potential of +1 V, and at the same time the oxidation signal is strongly dependent on structural state of DNA. This allowed us to develop informative sensors for complex analysis of DNA damage processes, including their denaturation, oxidative modification and cleavage.

In particular, we have shown that fragmentation of DNA results in increase of oxidation signal that is proportional to the level of DNA damage. This could be due to a better adsorption of damaged DNA on CNTs. Developed sensors are suitable for rapid and selective detection of DNA-hydrolyzing enzymes in blood serum, markers for autoimmune and oncological diseases.

Sensitivity of sensors to structural defects in DNA could be explained by strong adsorption of nitrogen bases on the surface of CNTs [4]. This shows the possibility of employing prepared CNTs as a sorbent for isolation and fractioning of DNA. We studied adsorption of plasmid DNA pEGFP-N2 in various conformations on the surface of CNTs by the means of gel electrophoresis and dynamic light scattering.

Native (supercoiled) DNA was converted into a linear and partially denatured forms by cleaving using restriction enzymes and heating, correspondingly. DNA was co-incubated with CNTs in different buffer solutions. Later on sorbent was

removed and the mixture was centrifuged. It was determined that in the absence of bivalent metal ions CNTs selectively adsorb linear and denatured forms of DNA and do not bind to supercoiled form. In the presence of Mg and Mn(II) ions CNTs reversibly bind supercoiled DNA due to chelation effect. Developed method of DNA adsorption using CNTs is notable for high effectiveness and could be used for isolation and purification of supercoiled plasmid DNA (therapeutic agent) from biologically inactive impurities of nucleic acids. This is of interest for obtaining highly active and safe preparations of plasmid DNA for the purposes of gene therapy and vaccination. Proposed technology allows creation of CNT-based sensors and sorbents, that are highly effective, possess low cost price and possibility of successful commercialization. In particular, developed methods for identification of DNA-damaging factors (patent applications N 2008132249, N 2008137068) are adaptable for carrying out analysis using low cost disposable electrodes, produced by screen printing technology. Developed sorbents present a ready product, that can be employed for fractioning of nucleic acids and additional purification of plasmid DNA (patent application N 2008140011).

References

1. A. Merkoci, M. Pumera, X. Llopis, et al. *Trends Anal. Chem.* 2005. **24**. P. 826-838.
2. T.I. Abdullin, I.I. Nikitina, G.K. Budnikov, et al. *Russian Journal of Analytical Chemistry.* 2007. **62**. P. 599-603.
3. T.I. Abdullin, I.I. Nikitina, O.V. Bondar, et al. *Russian Nanotechnology.* 2007. **2**(7-8). P.156-160.
4. T.I. Abdullin, I.I. Nikitina, O.V. Bondar. *Russian Journal of Electrochemistry.* 2008. **44**(11). P.1346-1350.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА АУРЕЛИНА

Пантелеев П.В., Баландин С.В., Финкина Е.И., Овчинникова Т.В.

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

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

E-mail: serb@mx.ibch.ru

Факс: (495) 336-43-33; тел.: (495) 335-09-00

Аурелин – катионный антимикробный пептид с Мм 4,3 кДа, выделенный из мезоглеи сцифоидной медузы *Aurelia aurita* и состоящий из 40 аминокислотных остатков. Шесть остатков цистеина в составе молекулы образуют три внутримолекулярные дисульфидные связи. Аурелин обладает антимикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. В рамках работы по исследованию структуры и биологических свойств аурелина была создана новая эффективная система получения его рекомбинантного аналога, идентичного природному пептиду.

Экспрессия антимикробных пептидов в клетках чувствительных к ним микроорганизмов требует временной нейтрализации токсичности синтезируемого продукта. Полученная нами плазмидная конструкция рЕТ-His8-TrxL-Aur обеспечивает высокий уровень экспрессии аурелина в *E. coli* за счет включения его аминокислотной последовательности в состав гибридного белка на основе модифицированного тиоредоксина А. Необходимость использования белка-носителя обусловлена не только токсичностью зрелого аурелина для бактериальной клетки, но и возможностью его деградации в гетерологичной системе. Тиоредоксин способен накапливаться в высокой концентрации в цитоплазме *E. coli* в растворимой форме и широко применяется для сверхэкспрессии биологически активных полипептидов – в первую очередь, для экспрессии полипептидов, обогащенных остатками цистеина, получение которых в нативной форме представляет собой во многих случаях трудноразрешимую задачу. Между последовательностями белка-носителя и аурелина был введен метиониновый кодон АТГ, что позволило с помощью реакции расщепления гибридного белка бромцианом в кислой среде получить рекомбинантный пептид, идентичный природному. Для предотвращения фрагментации белка-носителя при обработке бромцианом внутренний остаток метионина в его структуре был заменен остатком лейцина (M37L) с помощью направленного мутагенеза. Последовательность, кодирующая аурелин, была получена методом амплификации соответствующего участка кДНК препроаурелина с использованием ПЦР-праймеров, обеспечивающих замену редких кодонов кодонами, предпочтительными для экспрессии в *E. coli*. Для обеспечения возможности металлохелатной очистки гибридного белка в его структуру был введен N-концевой фрагмент из восьми остатков гистидина. Размер плазмиды составил 5876 п.о., размер кодируемого гибридного белка – 163 аминокислотных остатка (17,8 кДа). Конструкция рЕТ-His8-TrxL-Aur предназначена для экспрессии в *E. coli* с участием РНК-полимеразы фага T7. Экспрессия протекает под контролем промотора T7lac; в качестве

индуктора могут быть использованы ИПТГ (изопропил-β-D-тиогалактопиранозид) или лактоза. Открытая рамка считывания завершается стоп-кодоном ТАА, а транскрибируемая область ограничивается терминатором транскрипции фага T7. Плазида несет ген β-лактамазы, придающий клетке устойчивость к β-лактамам антибиотикам.

Разработанная схема очистки рекомбинантного аурелина включает следующие стадии: аффинную металлохелатную хроматографию гибридного белка, диализ элюата против раствора уксусной кислоты, расщепление белка бромцианом по остатку метионина, расположенному между белком-носителем и целевым пептидом, отделение белка-носителя с помощью повторной металлохелатной очистки и финальную очистку аурелина с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте концентрации ацетонитрила. Гомогенность полученных препаратов и их идентичность пептиду природного происхождения контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Анализ результатов, полученных в экспериментах с использованием двух типов индукции, показал, что применение ИПТГ в качестве индуктора обеспечивает большую гомогенность, но меньшие абсолютные выходы получаемого пептида, чем при использовании лактозы. При индукции лактозой из одного литра культуры было получено 10,8 мг целевого пептида, а при индукции IPTG – 3,4 мг.

Антимикробная активность рекомбинантного аурелина была установлена методом радиальной диффузии пептида в агарозном геле в отношении тест-культур грамположительных бактерий: *Bacillus megaterium*, штамм VKM41; *Staphylococcus aureus*, штамм 209P; *Micrococcus luteus*, штамм B1314.

PRODUCTION OF RECOMBINANT ANTIMICROBIAL PEPTIDE AURELIN

Pantelev P.V., Balandin S.V., Finkina E.I., Ovchinnikova T.V.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: serb@mx.ibch.ru

Fax: (495) 336-43-33; tel.: (495) 335-09-00

Aurelin is a 4,3 kDa cationic antimicrobial peptide purified from mesoglea of the scyphozoa jellyfish *Aurelia aurita*. The peptide contains 40 amino acid residues including 6 cysteines forming three intramolecular disulfide bridges. Aurelin exhibits antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. In order to investigate the structure and biological properties of aurelin, a new effective method for producing its recombinant analogue, identical to the natural peptide, has been developed.

Production of recombinant antimicrobial peptides in cells of sensitive host microorganisms requires temporary neutralization of the target product toxicity. Another factor to be considered is possible peptide degradation in a heterologous expression system. The constructed plasmid pET-His8-TrxL-Aur allows to achieve high-level aurelin expression by incorporating its coding sequence into the fusion protein downstream of modified thioredoxin A. Soluble thioredoxin is capable of accumulating in high amounts in *E. coli* cytoplasm and therefore is widely used as a carrier protein for high-level expression of biologically active polypeptides, especially those enriched with cysteine residues. Such polypeptides are often difficult to obtain in a soluble form. Methionine codon ATG was introduced between thioredoxin and aurelin sequences so that to release the target peptide containing the native N-terminus by cyanogen bromide cleavage of the fusion protein in acidic environment. To prevent the carrier protein fragmentation, internal methionine residue within the thioredoxin sequence was replaced with leucine residue by directed mutagenesis (M37L). Aurelin coding sequence was amplified from the natural preproaurelin cDNA using PCR primers that effect substitution of rare codons with those preferred by *E. coli* translation system. To facilitate purification process an octahistidine tag (His8) was added to the N-terminus of the fusion protein. The plasmid size is 5876 b.p., the encoded fusion protein consists of 163 amino acid residues (17,8 kDa). The expression vector pET-His8-TrxL-Aur was aimed at use in *E. coli* strains containing T7 RNA-polymerase gene. The target gene, placed under control of the T7lac promoter, can be induced with isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) or lactose added to the growth media. The open reading frame ends with the stop-codon TAA, and the transcribed area is limited by the phage T7 terminator. The plasmid bears β -lactamase gene providing resistance to β -lactam antibiotics.

The developed purification procedure includes following stages: immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) of the fusion protein, dialysis against acetic acid solution, cyanogen bromide cleavage of the fusion protein at methionine residue located between the carrier protein and the target peptide, elimination of the carrier protein from the mix by the second IMAC, and fine aurelin purification using reversed-phase HPLC in acetonitrile concentration gradient. The recombinant aurelin homogeneity and its identity to the natural peptide were monitored by SDS-PAGE and MALDI-TOF mass-spectrometry.

Comparison of two types of induction has shown that expression using IPTG results in better product homogeneity, but less absolute yield as compared to overnight lactose induction. The final output constituted 3,4 mg (IPTG) and 10,8 mg (lactose) of aurelin per liter of culture.

Antimicrobial activity of the recombinant peptide has been measured by radial diffusion assay in agarose gel. Recombinant aurelin inhibits growth of Gram-positive bacteria such as *Bacillus megaterium* (VKM41), *Staphylococcus aureus* (209P), *Micrococcus luteus* (B1314).

ЯМР-ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННОГО ВОЛЬТ-СЕНСОРНОГО ДОМЕНА K⁺-КАНАЛА KvAP В МИЦЕЛЛАХ ДЕТЕРГЕНТОВ. ОТ ДИНАМИКИ К ВОЗМОЖНЫМ МОДЕЛЯМ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМОЙ АКТИВАЦИИ

Парамонов А.С., Шенкарев З.О., Люкманова Е.Н., Шингарова Л.Н., Арсеньев А.С.

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

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

E-mail: zh@nmr.ru

Факс: (495) 335-50-33; тел.: (495) 330-74-83

Потенциал-зависимые калиевые каналы играют ключевую роль во многих процессах, необходимых для существования многоклеточных организмов. Активацией этих каналов управляют специальные вольт-сенсорные домены, состоящие из четырех трансмембранных (ТМ) спиралей (S1-S4) и испытывающие значительные конформационные перестройки в ответ на изменение ТМ электрического потенциала. В настоящее время детали этого механизма являются предметом дискуссий. Представленная работа посвящена изучению изолированного вольт-сенсорного домена прототипического калиевого канала KvAP (ВСД-KvAP) из термофильной археобактерии *Aeropyrum pernix* методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения.

В ходе поиска оптимальной мембраномоделирующей среды для ЯМР-исследований ВСД-KvAP был проведен сравнительный анализ 2D ¹H-¹⁵N-корреляционных спектров домена в мицеллах и бицеллах детергентов с различными свойствами. Было показано, что пространственная структура ВСД-KvAP в цвиттер-ионных, нейтральных и слабокатионных средах (DPC, DMPC/DHPC, LDAO) значительно отличается от структуры, наблюдаемой в окружении анионных мицелл (SDS, LMPC, LMPG). Однако данные спектроскопии кругового дихроизма указывали на то, что во всех протестированных средах домен имеет схожую вторичную структуру (содержание спиралей ~60%).

Для выбора мембраномоделирующей среды, сохраняющей нативную структуру ВСД-KvAP, был применен новый подход, основанный на использовании специальной "среды сравнения" - липид-белковых нанодисков (ЛБН). ЛБН представляют собой наноразмерные (10x4 нм) участки бислоевой мембраны, стабилизированные димером фрагмента 44-243 аполипопротеина А-1 человека (MSP). ЛБН являются принципиально новой мембраномоделирующей средой для молекулярно-биологических исследований и способны сохранять многие мембранные белки в нативном функциональном состоянии [1]. Комплексы ВСД-KvAP/ЛБН были получены на основе анионных и цвиттер-ионных липидов (DMPC и DMPG). Было показано, что каждый комплекс имеет диаметр ~9.5 нм и включает в себя одну молекулу ВСД-KvAP, две молекулы MSP и около 100 липидов. Полученные в составе ЛБН 2D ¹H-¹⁵N-TROSY спектры домена были близки

к спектрам, наблюдаемым в цвиттер-ионных детергентах, что указывало на сохранение нативной структуры ВСД-KvAP в окружении этих детергентов.

Отнесение сигналов ЯМР атомов основной цепи для ^2H - ^{13}C - ^{15}N -меченного аналога ВСД-KvAP в смешанных мицеллах DPC/LDAO (2:1) было выполнено с использованием методов TROSY. Вторичная и пространственная структуры ВСД-KvAP были охарактеризованы на основании данных ЯМР (вторичные химические сдвиги, контакты NOE, доступность H^{N} протонов растворителю). Сравнение полученных данных с ранее опубликованными результатами рентгеноструктурного анализа [2] и ЭПР [3] позволило предположить, что наблюдаемая в мицеллах цвиттер-ионных детергентов пространственная структура ВСД-KvAP соответствует активированной конформации вольт-сенсорного домена, наблюдаемой в полноразмерном канале в отсутствие ТМ потенциала.

Динамика основной цепи ВСД-KvAP была исследована, используя данные ЯМР-релаксации ядер ^{15}N . Было показано, что N- и C-концевые фрагменты домена (включая спираль S45), а также петлевые участки S1-S2 и S2-S3 совершают быстрые движения с характерными временами в диапазоне пс-нс. В то же время центральные регионы всех спиралей домена в районе межспиральных контактов испытывают медленные флуктуационные движения в мкс-мс диапазоне. Эти результаты позволяют предположить, что при изменении ТМ потенциала "жесткая" (стабильная в пс-нс диапазоне) спиральная шпилька S4-S3b перемещается как единый структурный элемент относительно спиралей S1 и S2. При этом происходят значительные конформационные изменения в "подвижном" элементе S23 и в шарнирном регионе на стыке спиралей S4 и S45. Полученные данные позволяют критически пересмотреть современные модели потенциал-зависимой активации K^+ -каналов.

Литература

1. Nath A., Atkins W.M., Sligar S.G. (2007) *Biochemistry* **46**:2059-2069.
2. Jiang Y., Lee A., Chen J., et al. (2003) *Nature* **423**(6935): 33-41.
3. Cuellar L.G., Cortes D.M., Perozo E. (2004) *Science* **306**(5695): 491-495.

NMR STUDY OF ISOLATED VOLTAGE-SENSING DOMAIN OF THE K^+ -CHANNEL KvAP IN DETERGENT MICELLES. FROM DYNAMICS TO POSSIBLE MODELS OF VOLTAGE-GATING

Paramonov A.S., Shenkarev Z.O., Lyukmanova E.N., Shingarova L.N., Arseniev A.S.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: zh@nmr.ru

Voltage-gated K^+ -channels play crucial role in many processes, which are essential for multicellular organisms. Activation of voltage-gated channels is mediated by special voltage-sensing domains composed from four transmembrane (TM) helices (S1-S4). The change in TM electric potential induces rearrangement in the voltage-sensor conformation, that leads to channel gating, but the detailed mechanism of this process is still unclear. Present report describes NMR investigation of isolated voltage-sensing domain of the prototypical archaeal K^+ -channel KvAP (VSD-KvAP) from *Aeropyrum pernix*.

To find optimal conditions for NMR study of VSD-KvAP the several membrane mimetics involving detergent micelles and bicelles were screened. The comparison of 2D ^1H , ^{15}N -correlation spectra revealed that the spatial structure of domain in the environment of zwitter-ionic or weakly-cationic micelles (DPC, DMPC/DHPC, LDAO) is significantly differ from the structure observed in anionic micelles (SDS, LMPC, LMPG). At the same time, the results of CD spectroscopy indicated almost identical secondary structure of VSD-KvAP (~60% of helicity) in all tested media.

To facilitate detergent screening we developed new approach that involves special "reference medium" – the lipid-protein nanodisc (LPNs). LPNs represent nanoscale (10x4 nm) discoid particles involving patches of lipid bilayers wrapped around by dimer of 44-243 fragment of human apolipoprotein A-I. Early it was shown for many membrane proteins that LPNs can stabilize their native conformation and support functional activity [1]. The VSD-KvAP/LPN complexes with diameters ~9.5 nm were reconstructed using anionic (DMPC) and zwitter-ionic (DMPG) lipids. The 2D ^1H , ^{15}N -TROSY spectra of VSD-KvAP measured in LPN environment were very similar to spectra of domain in zwitter-ionic detergents, thus indicating that zwitter-ionic detergents preserve native structure of VSD-KvAP.

The almost complete backbone resonance assignment of ^2H , ^{13}C , ^{15}N -labeled VSD-KvAP was obtained using TROSY methods in the environment of mixed DPC/LDAO (2:1) micelles. Secondary and spatial structure of domain was characterized using NMR data (secondary chemical shifts, NOE contacts, solvent accessibility of H^{N} protons). The comparison of obtained data with published results of X-ray [2] and EPR [3] investigations leads to proposal that observed VSD-KvAP structure corresponds to structure of activated domain presented in the full-length channel at zero TM potential.

The backbone dynamics of VSD-KvAP were studied using ^{15}N -relaxation measurements. The N- and C-terminal fragments of domain (including S45 helix), loop regions S1-S2 and S2-S3 were found mobile in ps-ns time-scale. At the same time the central regions of all domain helices at the level of interhelical contacts

were subjected to slow conformational fluctuations in the mks-ms time-scale. These data lead to proposal that the S4-S3b helical hairpin (stable in ps-ns time-scale) accomplishes rigid body movement relative to S1 and S2 helices upon change in TM potential. This movement is accompanied by conformational changes in the "labile" S23 element and in the hinge between S4 and S45 helices. The obtained data permit critical reassessment of some voltage-gating models.

References

1. Nath A., Atkins W.M., Sligar S.G. (2007) *Biochemistry* **46**:2059-2069.
2. Jiang Y., Lee A., Chen J., et al. (2003) *Nature* **423**(6935): 33-41.
3. Cuello L.G., Cortes D.M., Perozo E. (2004) *Science* **306**(5695): 491-495.

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННАЯ ХИМИЯ КРАСНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ ИЗ КОРАЛЛОВЫХ ПОЛИПОВ

Пахомов А.А., Мартынов В.И.

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

Флуоресцентные белки, гомологи широко известного GFP (Green Fluorescent Protein, зеленый флуоресцентный белок), представляют значительный практический и фундаментальный интерес для современной молекулярной и клеточной биологии, а также для биохимии и биоорганической химии. Основная масса научных исследований направлена на их применение и на создание новых генетически кодируемых зондов. Изучение механизмов образования хромофоров в этих белках имеет особое значение, так как открывает возможности для направленного изменения спектральных свойств белка путем индукции или запрета образования хромофора того или иного типа. В последнее время усилия ученых направлены на поиск и создание флуоресцентных белков, обладающих значительным батохромным сдвигом по сравнению с GFP. Прорыв в этой области произошел в 1999 г., когда были клонированы новые GFP-подобные белки из коралловых полипов. Часть из них оказалась способной к эмиссии в красной области спектра. Красные флуоресцентные белки (RFP – Red Fluorescent Protein) представляют значительный интерес, поскольку они, во-первых, расширяют спектральный диапазон, перекрываваемый флуоресцентными белками, что позволяет одновременно вводить разноцветные флуоресцентные метки в различные белки-мишени. Во-вторых, в отличие от GFP, при работе с красными флуоресцентными белками вклад автофлуоресценции клетки минимален. В-третьих, ткани животных наиболее прозрачны в дальнекрасном и инфракрасном диапазонах (650-900 нм), поэтому белки, обладающие эмиссией в этой области спектра, позволяют изучать процессы в рамках целого организма.

Данная работа посвящена изучению посттрансляционных реакций образования хромофора во флуоресцентных белках, обладающих значительным батохромным сдвигом в спектрах поглощения и флуоресценции. При помощи масс-спектрометрии, tandemной масс-спектрометрии и ЯМР исследований было показано, что хромофоры белков из *Goniopora tenuidens* (gtCP) и *Condylactis gigantea* (cgCP) содержат в качестве батохромной модификации ацилиминную группу, расширяющую π -систему GFP-хромофора, и имеют хромофор, подобный красному флуоресцентному белку DsRed. Ацилимин – реакционноспособная группа, которая, вступая в дополнительные посттрансляционные реакции, может быть дополнительным источником спектральной вариативности. На примере cgCP было показано, что в мягких и жестких денатурирующих условиях возможны присоединение воды к C=N связи ацилимина и последующий его распад в результате полного гидролиза. При этом выход продукта в последней стадии в значительной степени зависит от каталитического действия первого хромофоробразующего остатка.

К настоящему времени установлено, что при небольшом количестве замен в окружении хромофора все хромобелки превращаются во флуоресцентные, что связано с конформационными изменениями хромофора (*цис-транс*-изомеризация). Среди них особо стоит выделить хромобелок из *Anemonia sulcata* (asCP), в котором под действием света может протекать обратимая изомеризация хромофора. Эта особенность лежит в основе работы разжигающегося флуоресцентного белка (KFP – Kindling Fluorescent Protein), созданного на основе asCP. Структура хромофора asCP отличается от других RFP и хромобелков. Нами было показано, что в ходе синтеза хромофора asCP гидролиз ацилимина происходит автокаталитически внутри свернутого белка. В результате реакции образуется кето-заместитель, расширяющий π -систему GFP-хромофора.

При изучении структуры хромофора RFP из *Zoanthus sp.2* (z2FP574) было обнаружено, что синтез ацилимина в GFP-подобных белках может протекать по альтернативному механизму. Было показано, что на промежуточной стадии созревания хромофора образуется сначала зеленая форма, содержащая хромофор GFP-типа, которая в результате реакций окисления и декарбоксилирования превращается в красную. Для исследования протекающих реакций нам удалось замедлить процесс синтеза красного хромофора и "поймать" промежуточную зеленую форму белка. Динамика зелено-красной конверсии была изучена при помощи различных биохимических методов и масс-спектрометрии. Обнаруженное поведение z2FP574 характерно для флуоресцентных таймеров - белков, способных менять цвет флуоресценции со временем. Однако цветовое превращение z2FP574 отличается от других известных таймеров не только по структурным характеристикам, но и кинетически. В частности, в других флуоресцентных таймерах зеленая форма являлась конечной и не способной к конверсии в красную. При этом, наблюдаемое изменение цвета проходит в них за счёт безызлучательного переноса энергии (FRET) внутри тетрамера белка и за счёт меньшей скорости образования "красного" хромофора. z2FP574, с этой точки зрения, является истинным флуоресцентным таймером и может быть использован для создания мономерного зонда.

Таким образом, образование хромофора в красных флуоресцентных белках контролируется, главным образом, посттрансляционными реакциями образования ацилимина и его возможного последующего расщепления.

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).

POST-TRANSLATIONAL CHEMISTRY OF RED FLUORESCENT PROTEINS FROM ANTHOZOA CORALS

Pakhomov A.A., Martynov V.I.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: alpah@mail.ru

Fluorescent proteins (FPs) homologous to the Green Fluorescent Protein (GFP) are of intense practical and fundamental interest in the field of modern molecular and cellular biology, biochemistry and bioorganic chemistry. While most studies are focused on the FPs applications and generation of novel genetically encoded probes, investigations of chromophore-forming reactions are of special interest. Induction or inhibition of the predefined chromophore chemical reactions would allow directed spectral manipulations of the protein. The last decade is marked by continuing efforts aimed at generation of redshifted fluorescent proteins. A breakthrough in this field took place in 1999, when a number of GFP-like proteins from Anthozoans were cloned. Some of them emitted light in the red spectral region. Red fluorescent proteins (RFPs) are of great demand since they expand spectral range covered by FPs and provide important tools for multicolour labelling of proteins, organelles etc. Moreover, unlike GFP, contribution of cell autofluorescence is minimal in the red spectral region. Additionally, animal tissues are most transparent in the far-red and infra-red range (650 - 900 nm), therefore proteins emitting in this spectral window allow effective whole-body imaging.

This work is devoted to investigation of posttranslational reactions resulting in significant FP's bathochromic shift. By mass-spectrometry, tandem mass-spectrometry and NMR it was shown that chromophores of proteins from *Goniopora tenuidens* (gtCP) and *Condylactis gigantea* (cgCP) contain an acylimine group as a bathochromic modification expanding the chromophore π -system. The chemical structures of the chromophores are similar to that of DsRed (DsRed is the trade name of the first discovered natural RFP from *Discosoma sp.*). Since acylimine is a reactive group, its reactions could be an additional source of spectral diversity. As an example, reactivity of acylimine was examined within cgCP. It was shown that upon mild denaturing conditions H₂O addition to the C=N bond of acylimine takes place, whereas harsh denaturing conditions result in protein fragmentation due to complete hydrolysis of the acylimine. The yield of the latter reaction is strongly depends on the nature of the first chromophore-forming residue.

Remarkably, all chromoproteins are converted into fluorescent analogues by minor substitutions in the chromophore environment, which is explained by chromophore conformational changes (*cis-trans* isomerisation). A chromoprotein from the sea anemone *Anemonia sulcata* (asCP) is of particular interest because reversible chromophore isomerisation occurs upon visible light irradiation. This phenomenon underlies the so-called kindling effect of this protein. Chromophore structure of asCP is different from those of other RFPs and chromoproteins. We demonstrated that during asCP chromophore synthesis acylimine hydrolysis occurs autocatalytically within folded protein. As a result, the keto-substituted extended π -system of the GFP-chromophore is forming.

Investigating chromophore structure of RFP from *Zoanthus sp.2* (z2FP574) it was found, that acylimine can be synthesised by alternative pathway. It was

shown, that during z2FP574 maturation an intermediate green form, bearing the GFP-type chromophore, appears. The "red" chromophore in this case arises from additional oxidation and decarboxylation reactions. By means of mutagenesis the reaction of the chromophore synthesis was slowed down and the resulting trapped intermediates were studied by biochemical methods and by mass-spectrometry. Detected z2FP574 behavior is characterized to the so-called fluorescent timers, the proteins that change colour with time. However post-translational chemistry of z2FP574 was proposed to be different from that of other known RFPs and fluorescent timers. Specifically, the green form of the earlier described timer was shown to be a dead-end product. Consequently, the observed colour development in this case arises from a Förster/fluorescence resonance energy transfer (FRET) within the tetramer between green and red species. Unlike fluorescent timer based on DsRed mutant, it is possible to create the monomeric tag timer using z2FP574 variants.

Summing up, chromophore formation in red fluorescent proteins is controlled substantially by posttranslational reactions of acylimine synthesis and reactivity of the acylimine group.

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 (МК-1094.2009.4).

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУПЕРОКСИДА В МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТАХ НА ОСНОВЕ МУТАНТНЫХ ВАРИАНТОВ ЦИТОХРОМА С

*Пепелина Т.Ю. **, *Черткова Р.В. **, *Островерхова Т.В. ***,
*Долгих Д.А. ****, *Гривенникова В.Г. ***, *Виноградов А.Д. ***,
*Кирпичников М.П. ****

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

**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

E-mail: pepelacza@yandex.ru

Факс: (495) 335-28-88; тел.: (495) 335-28-88

В настоящее время для измерения скорости генерации супероксида в митохондриальных препаратах наиболее часто используют ацетилованный цитохром *c* (AcC). Ацетилирование лизиновых остатков цитохрома *c* снижает скорости его восстановления митохондриальными редуктазами и скорости его окисления цитохром *c*-оксидазой, при этом способность цитохрома *c* к восстановлению супероксидом сохраняется. Однако применение AcC имеет ряд существенных недостатков. Во-первых, при ацетилировании цитохрома *c* уксусным ангидридом образуется достаточно гетерогенная смесь молекул цитохрома *c* с различным числом модифицированных лизиновых остатков. Во-вторых, при ацетилировании снижается общий положительный заряд цитохрома *c*, что ведет к снижению сродства к супероксиду. В-третьих, присутствие в среде измерения высоких концентраций фосфатов или хлоридов калия, вносимых для уменьшения неспецифического взаимодействия AcC с компонентами дыхательной цепи, вызывает частичное разобщение дыхательной цепи, что искажает картину генерации супероксида.

В настоящей работе получен ряд мутантных вариантов цитохрома *c* лошади с заменами положительно-заряженных лизиновых аминокислотных остатков (K8, K13, K27, K72, K79, K86, K87), окружающих гемовую щель, которые играют важную роль в формировании реакционноспособных комплексов цитохрома *c* с окислительно-восстановительными партнерами: убихинол: цитохром *c*-редуктазой (комплексом III) и цитохром *c*-оксидазой (комплексом IV). Коэкспрессию мутантных генов цитохрома *c* и гена гем-лигазы, находящихся в составе плазмидного вектора pV(PCYCS), осуществляли в клетках *E. coli* JM-109. Рекомбинантные белки очищали с помощью катионообменной, адсорбционной и гель-фильтрационной хроматографии. Способность полученных мутантных белков взаимодействовать с белками-партнерами изучали в системе митопластов печени крысы, лишенных цитохрома *c*. Измеряли сукцинат: цитохром *c*-редуктазную и цитохром *c*-оксидазную активности митопластов в присутствии полученных мутантных вариантов, цитохрома *c* дикого типа и AcC. Количественное измерение генерации супероксида с помощью

полученных мутантных вариантов и AcS проводили в препаратах субмитохондриальных частиц (СМЧ) сердца быка. Измеряли общие сукцинат: цитохром *c*-редуктазные активности СМЧ в отсутствие и в присутствии супероксиддисмутазы (СОД). СОД-чувствительные активности (скорости генерации супероксида) получали вычитанием СОД-нечувствительных активностей из общих активностей.

На первом этапе работы с помощью мутантных вариантов цитохрома *c*, несущих единичные и двойные замены (K8E, K13E, K27E, E69K/K72E, K79E, K86E/K87E, K86W/K87C), показано, что консервативные остатки K86 и K87 важны для формирования комплекса убихинол: цитохром *c*-редуктаза/цитохром *c* и комплекса цитохром *c*/цитохром *c*-оксидаза примерно в одинаковой степени и, по-видимому, являются "основой" универсального сайта взаимодействия цитохрома *c* с белковыми редокс-партнерами. Лизиновые остатки цитохрома *c* в положениях 8, 27, 72 вносят преимущественный вклад в формирование реакционноспособного комплекса с убихинол: цитохром *c*-редуктазой дыхательной цепи, а лизиновые остатки в положениях 13, 79 – с цитохром *c*-оксидазой.

На втором этапе работы получены мутантные варианты цитохрома *c* лошади, несущие четыре (K27E/K86E/K87E/E90K, E69K/K72E/K86E/K87E), шесть (K27E/E69K/K72E/K86E/K87E/E90K, K8E/E62K/E69K/K72E/K86E/K87E) и восемь (K8E/K27E/E62K/E69K/K72E/K86E/K87E/E90K) замен. При конструировании мутантных вариантов цитохрома *c* учитывалась необходимость сохранения суммарного заряда молекулы, поскольку снижение суммарного положительного заряда может снижать скорость реакции белка с отрицательно заряженным анионом супероксид-радикала. Для компенсации избыточных отрицательных зарядов в последовательности мутантных вариантов цитохрома *c* были введены замены E/K в положениях 62, 69 и 90.

Три из полученных мутантных вариантов цитохрома *c*, содержащие шесть и восемь аминокислотных замен, обладали существенно сниженной, по сравнению с ацетилированным цитохромом *c*, реактивностью по отношению к комплексам III и IV дыхательной цепи, сохраняя при этом высокую скорость специфического окисления супероксида. Точность измерения скорости генерации супероксида комплексом I в СМЧ сердца быка с помощью мутантных вариантов цитохрома *c* лошади в среде с фосфатом в 2 раза, а в среде без фосфата в 4 раза превосходит точность измерения с помощью ацетилированного цитохрома *c*. В связи с этим полученные мутантные варианты цитохрома *c* представляют собой основу для новой эффективной тест-системы количественного определения супероксида в митохондриальных препаратах.

DESIGN OF QUANTITATIVE MEASUREMENT SUPEROXIDE GENERATION TEST-SYSTEM IN MITOCHONDRIAL PREPARATIONS ON THE BASIS OF CYTOCHROME C MUTANT VARIANTS

*Pepelina T.Y.**, *Ostroverkhova T.V.***, *Chertkova R.V.**, *Dolgikh D.A.***, *Grivennikova V.G.***, *Vinogradov A.D.***, *Kirpichnikov M.P.***

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

**Lomonosov Moscow State University, Moscow

E-mail: pepelacza@yandex.ru

Fax: (495) 335-28-88; tel.: (495) 335-28-88

At present time for superoxide generation measurement in mitochondrial preparations acetylated cytochrome *c* is used most often. Acetylation of lysine residues of cytochrome *c* decreases the rate of his reduction from mitochondrial reductases and the rate of his oxidation by cytochrome *c* oxidase. Acetylated cytochrome *c* remains ability to oxidize superoxide. Application of acetylated cytochrome *c* has a number of essential disadvantages. Firstly, under acetylation of cytochrome *c* by acetic anhydride rather a heterogeneous mixture of cytochrome *c* molecules with different numbers of modified lysine residues is generated. Secondly, under acetylation the common positive charge of cytochrome *c* is decreased that leads to decreasing affinity to superoxide. Thirdly, high concentration of potassium phosphate or potassium chloride in the measuring medium leads to partial uncoupling of respiratory chain.

In this work we have constructed several horse cytochrome *c* mutant variants with substitutions in amino acid residues (K8, K13, K27, K72, K79, K86, K87) surrounding the heme crevice which are important for the interaction of protein with its respiratory chain partners: ubiquinol: cytochrome *c* reductase (complex III) and cytochrome *c* oxidase (complex IV). Coexpression of horse cytochrome *c* genes and heme-ligase gene was carried out in plasmid vector pBP(CYCS) in *E.coli* JM-109. Recombinant proteins were purified by cation-exchange, adsorption and gel filtration chromatography. The capacity of cytochrome *c* variants to interact with partners was investigated in the rat liver mitochondria depleted in cytochrome *c*. Quantitative measurement of superoxide generation was carried out in bovine heart submitochondrial particles.

In the first stage of work using mutant variants of cytochrome *c* with single and double substitutions (K8E, K13E, K27E, E69K/K72E, K79E, K86E/K87E, K86W/K87C) we have shown, that conservative residues K86 and K87 are important to complex ubiquinol: cytochrome *c* reductase/cytochrome *c* and complex cytochrome *c*/cytochrome *c* oxidase formation. Lysine residues 8, 27, 72 are important to complex ubiquinol: cytochrome *c* reductase/cytochrome *c* formation. Lysine residues 13, 79 are important to complex cytochrome *c*/cytochrome *c* oxidase formation.

In the second stage of work we obtained mutant variants of cytochrome *c* which had forth (K27E/K86E/K87E/E90K, E69K/K72E/K86E/K87E), six (K27E/E69K/K72E/K86E/K87E/E90K, K8E/E62K/E69K/K72E/K86E/K87E) and eight (K8E/K27E/E62K/E69K/K72E/K86E/K87E/E90K) substitutions.

Three of the obtained mutants contained six and eight amino acid substitutions were found to have significantly decreased reactivity with complex III and complex IV of respiratory chain, whereas they shown high rate of specific reduction by superoxide-radical. Observational accuracy of the rate of generation superoxide with the help of mutant variants of cytochrome *c* in the medium containing phosphate in two times and in the medium without phosphate in four times exceeded observational accuracy with the help of acetylated cytochrome *c*. These mutants may be used as the basis of the new effective test-system for quantitative superoxide measurement in mitochondrial preparations.

АКТИВНОСТЬ НАДФН-ОКСИДАЗЫ ПЛАЗМАЛЕММЫ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ ПРИ СНИЖЕНИИ ТЕМПЕРАТУРЫ ВЫРАЩИВАНИЯ

Пиотровский М.С.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва

E-mail: agro-ministr@yandex.ru

Факс: (495) 977-80-18; тел.: (499) 231-83-77

Пероксид водорода как одна из активных форм кислорода (АФК) выполняет сигнальную и субстратную роль в растениях, участвуя в работе устьиц, апикальном росте корневых волосков и пыльцевых трубок, синтезе клеточной стенки, формировании фитоиммунитета, клеточной смерти, ответе на изменяющиеся факторы среды и других. Однако, являясь токсичными молекулами, АФК способны повреждать клеточные структуры посредством прогрессирующего окислительного стресса. Каким образом осуществляется баланс содержания АФК в растениях, до конца не ясно. Очевидно, что для поддержания определенного уровня АФК в клетке необходима тщательная система регуляции. Полагают, что в работе этой системы у арабидопсиса участвуют продукты примерно 150 генов.

Одним из белков, катализирующих образование АФК в апопласте, является НАДФН-оксидаза плазмалеммы растительных клеток. Гены НАДФН-оксидаз растений *rboh* (*r*espiratory *b*urst *o*xidase *h*omolog) имеют гомологию с каталитической субъединицей gp91phox оксидазы фагоцитов млекопитающих и идентифицированы для риса, арабидопсиса, табака, картофеля и др. Показано, что "окислительный взрыв" как ответ на повреждение патогенами (биотический стресс) формируется при активации белков этого семейства. Каким образом проявляется активность НАДФН-оксидаз плазмалеммы при абиотическом стрессе (температура, засоление, засуха), остается не ясным. Целью проведенного исследования стали функциональная идентификация НАДФН-оксидазы плазмалеммы проростков кукурузы и выяснение ее роли при понижении температуры выращивания.

Объектом исследования были 5-ти дневные этиолированные проростки кукурузы, выращенные при температуре 25°C (контроль) и выдержанные при 6°C в течение суток (опыт). Содержание пероксида водорода в тканях побегов и корней определяли спектрофотометрически в реакции с хлористым титаном. Плазмалемму получали разделением микросомальных мембран в двухфазной полимерной системе. Супероксид-продуцирующую активность плазмалеммы в присутствии НАДФН оценивали спектрофотометрически по восстановлению ХТТ до формазана. Белки плазмалеммы, способные генерировать супероксид, идентифицировали по определению молекулярной массы полос после нативного электрофореза, которые окрашивались формазаном как продуктом восстановления нитросинего тетразолия в НАДФН-оксидазной реакции. Присутствие НАДФН-оксидазы в плазмалемме подтверждали методом Вестерн блот анализа с использованием антител к каталитической субъединице gp91phox фагоцитов.

Было обнаружено, что в первые часы после переноса растений с 25°C на 6°C в корнях и побегах происходил скачок содержания H_2O_2 в тканях примерно в 1.5 раза. Возрастание уровня H_2O_2 носило транзиторный характер, и он возвращался к значениям, характерным для контрольных растений. Согласно результатам кинетического анализа, НАДФН-оксидазная активность плазмалеммы клеток побегов и корней составляла 53.4 и 27.0 нмоль формазана / мг белка·мин, соответственно, характеризовалась слабовыраженным оптимумом при pH 7-8 и до 70% подавлялась в присутствии ингибитора флавин-содержащих оксидаз – дифенилен иодонииума ($EC_{50} \leq 10$ мкМ). После первых часов при 6°C НАДФН-оксидазная активность плазмалеммы побегов была ниже контроля на 50-60%. В корнях снижение активности было незначительным – менее 15%. Белки плазмалеммы клеток побегов, способные продуцировать супероксид в присутствии НАДФН, имели молекулярные массы 50, 70 и 105 кДа; в плазмалемме корней – 50 и 70 кДа. Только белки с массой 50 и 105 кДа были чувствительны к ингибитору НАДФН-оксидаз дифенилен иодонииуму и выявлялись с антителами к gp91phox. Значение 105 кДа, полученное нами, соответствует массам известных НАДФН-оксидаз плазмалеммы растительных клеток. Полоса 50 кДа, скорее всего, является продуктом протеолиза этого белка.

Полученные в работе результаты дают основание считать, что формирование транзиторных изменений содержания пероксида водорода в тканях проростков кукурузы при снижении температуры выращивания не является результатом активации НАДФН-оксидазы плазмалеммы.

ACTIVITY OF PLASMA MEMBRANE NADPH-OXIDASE FROM ETIOLATED MAIZE SEEDLINGS UNDER LOWERING OF GROWTH TEMPERATURE

Piotrovsky M.S.

Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow

E-mail: agro-ministr@yandex.ru

Fax: (495) 977-80-18, tel.: (499) 231-83-77

Hydrogen peroxide is one of a number of reactive oxygen species (ROS) involved as a signal and substrate in stomata closure, apical growth of root hairs and pollen tubes, cell wall synthesis, cell death, pathogen and stress reactions and other. Besides this role, ROS are toxic molecules, which capable to injure the cell thereby progressive oxidative stress. How the balances of ROS content in plants are maintained is not obvious. Evidently there is system that must keep carefully the defined level of ROS inside or outside of the cell. It is reasonable to suppose that about 150 gene products participate in the process.

Plant plasma membrane NADPH-oxidase is one of the proteins delivered ROS for apoplast. The plant NADPH-oxidase genes called *rboh* (respiratory burst oxidase homolog) have homology with gp91phox subunit of mammals phagocyte oxidase and were cloned for rice, Arabidopsis, tobacco, potato and others. It was shown that "oxidative burst" induced by the pathogen attack (biotic stress) results from activation of these proteins. The involvement of NADPH-oxidase activity under abiotic stress (temperature, drought, salt) is still a question. Aim of investigation was to elucidate the role of plasma membrane NADPH-oxidase under lowering of seedling growth temperature.

Etiolated maize seedlings grown at 25°C for 5 days and transferred in the last day to the 6°C have been the subject of experimentation. Seedling hydrogen peroxide content was evaluated using colorimetric method with titanium chloride solution. The plasma membrane was obtained by separation of microsome fraction in the two-polymer system. Superoxide-producing activity of plasma membrane was estimated with XTT reduction in the presence of NADPH. The identification of NADPH-oxidizing proteins in plasmalemma was inferred from appearance of formazan-stained protein bands in gels with NBT. In order to determine what band corresponds to maize NADPH-oxidase Western blot analysis using an antibody against gp91phox was performed.

It was revealed about 1.5 times increase of H_2O_2 content in shoots and roots during the first hours after transfer of seedlings from 25°C to 6°C. After that H_2O_2 content of cold seedlings returned to values inherent to control plants. According to the kinetic analysis the plasma membrane NADPH-oxidase activity was 53.4 and 27.0 nmoles formazan/mg protein·min for shoot and root cells, correspondingly, with slightly marked pH optimum at 7-8 and high sensitivity ($EC_{50} \leq 10$ μM) to the presence of inhibitor of flavin-containing oxidases – diphenylene iodonium (DPI). Activity was decreased by 50-60% in shoots and by 15% in roots after plant cold treatment. Plasma membrane proteins with Mm about 50, 70 and 105 kDa in shoots, but 50 and 70 kDa – in roots, were capable to superoxide production in gel, induced by NADPH. Only proteins of the shoot and root cell plasma membrane with Mm 50 and 105 kDa were sensitive to low DPI concentrations and immunodetected with antibodies against gp91phox. Based on results it is possible to conclude that only 105 kDa protein may be identified as NADPH-oxidase, because 50 kDa protein is likely to be result of proteolysis.

These data suggest that transitory increase of hydrogen peroxide content in the maize seedling tissues under lowering of growth temperature apparently is not result of NADPH-oxidase activation.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ДАЛЬНЕКРАСНОГО ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО БИОМАРКЕРА МКАТЕ ЛЕГЛА В ОСНОВУ СОЗДАНИЯ НОВОГО ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОГО ВАРИАНТА С ПОВЫШЕННОЙ ЯРКОСТЬЮ

Плетнева Н.В., Шербо Д., Мерзляк Е.М., Чудаков Д.М., Плетнев В.З.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
E-mail: nadand@mail.ru
Тел.: (495) 330-75-10

Зеленый флуоресцентный белок и другие родственные флуоресцентные белки нашли широкое применение в клеточной биологии и биомедицине в качестве эффективных неинвазивных инструментов для визуализации и мониторинга внутренних процессов в клетках или целых организмах. Мономерные флуоресцентные белки с эмиссией флуоресценции в красной ($\lambda_{em} > 570\text{nm}$) и особенно в дальнекрасной ($\lambda_{em} > 610\text{nm}$) областях спектра представляют особый практический интерес. Методом рентгеноструктурного анализа высокого разрешения детально изучена пространственная организация генно-инженерного мономерного варианта mKate, полученного из предшественника дикого типа, димерного флуоресцентного белка eqFP578 (морской анемон *Entacmaea quadricolor*). Среди мономерных флуоресцентных белков вариант mKate является самым ярким дальнекрасным ($\lambda_{em}=635\text{nm}$) биомаркером с ярко выраженной pH-зависимостью флуоресценции. Максимум эмиссии mKate при pH ~8 постепенно падает до нуля при уменьшении pH до ~3. Исключительно высокие фотофизические свойства mKate выдвинули его в ряд наиболее перспективных биомаркеров для мониторинга индивидуальных белков в живых организмах, а также для технологий многоцветного мечения и резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET). Методом рентгеноструктурного анализа на атомном уровне установлены пространственные структуры mKate при 4-х различных значениях pH – pH 2.0 (разрешение 1.8E), pH 4.2 (1.75E), pH 7.0 и pH 9.0 (2.6E). Координаты атомов четырех новых кристаллических структур депонированы в Международный структурный банк белков с кодами доступа PDB_ID: 3BX9, 3BXA, 3BXV, 3BXC, соответственно. Установлено, что pH-зависимость флуоресценции является следствием обратимой *цис-транс*-изомеризации фенольного кольца остатка Tyr64 хромофор-образующей последовательности Met63-Tyr64-Gly65. В нефлуоресцентном (темновом) состоянии при pH 2.0 хромофор в кристаллической структуре mKate находится в *транс*-изомерной форме. Слабо флуоресцентное состояние при pH 4.2 характеризуется равновесием *транс*- и *цис*-изомерных форм хромофора. И, наконец, хромофор, отвечающий наиболее сильной флуоресценции белка при pH 7 и 9, реализуется в *цис*-форме. Анализ пространственной структуры выявил остаток Ser158, который стабилизирует за счет водородной связи нефлуоресцентное *транс*-состояние хромофора. Последующий дизайн на основе сайтнаправленного мутагенеза с заменой Ser158Ala позволил дестабилизировать это состояние, что привело к улучшению яркости флуоресценции нового сконструированного варианта, mKate_Ser158Ala, почти вдвое. Полученный новый вариант демонстрирует также повышенную скорость созревания хромофора. Исключительно высокие фотофизические свойства нового варианта mKate_S158A делают его вне конкуренции среди других биомаркеров для мечения белков. На основе анализа кристаллических структур выявлены ключевые остатки, наиболее вероятно ответственные за мономерное состояние mKate в растворе.

X-RAY STRUCTURE OF THE FAR-RED FLUORESCENT BIOMARKER MKATE PROVIDED A BASE FOR DEVELOPMENT OF THE NEW GENE ENGINEERED VARIANT WITH THE ENHANCED BRIGHTNESS

Pletneva N.V., Shcherbo D., Merzlyak E.M., Chudakov D.M., Pletnev V.Z.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow
E-mail: nadand@mail.ru
Tel.: (495) 330-75-10

The green fluorescent protein and other related fluorescent proteins have become efficient non-invasive tools in cell biology and biomedicine for visualizing and monitoring the internal processes within cells or whole organisms. The monomeric fluorescent proteins that emit red ($\lambda_{em} > 570\text{nm}$), and especially far-red ($\lambda_{em} > 610\text{nm}$) light, are of particular practical interest. The three dimensional organization of the genetically engineered monomeric variant mKate made from the wild type progenitor, dimeric fluorescent protein eqFP578 (sea anemone *Entacmaea quadricolor*), has been studied in detail by high resolution X-ray method. Among other monomeric fluorescent proteins mKate is the most bright far-red biomarker ($\lambda_{em}=635\text{nm}$) with pronounced pH dependence of fluorescence showing maximum emission at pH ~8, which gradually diminishes to zero upon decreasing to pH ~3. Exceptionally high photophysical characteristics of mKate put it in group of the most perspective biomarkers for monitoring individual proteins in live organisms, as well as for multicolor labeling and fluorescence resonance energy transfer (FRET) technologies. The three-dimensional structures of mKate at different values of pH – pH 2.0 (resolution 1.8 E), pH 4.2 (1.75E), pH 7.0 and pH 9.0 (2.6 E) have been determined at atomic level by the X-ray method. The atomic coordinates of the corresponding four new crystal structures have been deposited to the international Protein Data Bank with the identification codes PDB_ID - 3BX9, 3BXA, 3BXB, 3BXC, respectively. The phenomenon of pH-dependent fluorescence of mKate has been shown to be due to reversible *cis-trans*-isomerization of the Tyr 64 phenolic ring of the chromophore-forming sequence Met63-Tyr64-Gly65. In the non-fluorescent (dark) state at pH 2.0 the crystal structure of mKate exhibits the chromophore in *trans*-isomeric form. The weakly fluorescent state of the protein at pH 4.2 is characterized by a mixture of *trans*- and *cis*-isomers. The chromophore in highly fluorescent state at pH 7.0 and 9.0 adopts *cis*-form. The structural analysis has revealed the residue Ser158 which stabilizes the non-fluorescent *trans*-state of the chromophore by hydrogen bonding. The site directed mutagenesis with replacement Ser158Ala destabilized *trans*-state of the chromophore increasing the fluorescence brightness of the new designed variant, mKate_Ser158Ala, almost twice. The new variant exhibits also the enhanced rate of the chromophore maturation. The exceptionally high photophysical characteristics of mKate_S158A place it among other biomarkers beyond comparison for protein labeling. Analysis of the crystal structures has revealed a group of key residues most likely responsible for the observed monomeric state of mKate in solution.

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОЛИМЕРСОДЕРЖАЩИХ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ БИОАНАЛИЗА

Простякова Л.И., Капустин Д.В., Zubov В.П.

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

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

E-mail: profan@list.ru

Факс: (495) 335-10-11, тел.: (495) 336-06-00

Актуальность темы работы определяется постоянно возрастающими потребностями в чистых концентрированных препаратах биополимеров, в частности, нуклеиновых кислотах, для биотехнологии и клинической диагностики.

Для выделения нуклеиновых кислот из различных источников применяют множество материалов и методик. Наиболее перспективными в этом отношении являются композиционные сорбенты, модифицированные нанослоями функционализированных полимеров, в частности, фторсодержащими полимерами и полианилинами. Использование этих полимеров в качестве модификаторов сорбентов обеспечивает их уникальные физико-химические и сорбционные качества, низкий уровень неспецифической сорбции, высокую селективность при разделении биополимеров, а также комплекс особых свойств, обеспечивающих, в частности, эффективное разделение и очистку близких по свойствам биомакромолекул. Однако сложность получения таких материалов делает актуальным поиск технологичных и эффективных способов получения фторполимер- и полианилин-содержащих сорбентов для разделения биополимеров. Целью настоящей работы является разработка новых способов синтеза фторполимер- и полианилин-модифицированных кремнезёмов, оценка физико-химических и сорбционных свойств полученных материалов в условиях выделения и очистки ДНК из модельных смесей и лизатов бактериальных, растительных клеток и крови, разработка эффективных методик их применения, в частности, выделения нуклеиновых кислот из различных источников в одну стадию, а также сравнение эффективности применения полученных сорбентов и коммерческих материалов для выделения ДНК. В ходе работы получены три типа сорбентов, модифицированных, соответственно, фторированным полиэфиром, политетрафторэтиленом, и материал, последовательно модифицированный фторопластом и полианилином.

В первом случае полимерную фазу иммобилизовали в результате т.н. кастинга. При этом нанесенное фторполимерное покрытие впервые химически модифицировали нуклеозидом. Полученный материал был охарактеризован; совместные исследования с коллегами из компании Proligo GmbH подтвердили эффективность его применения в качестве носителя для твердофазного синтеза олигонуклеотидов.

Во втором случае фторполимерное покрытие впервые получили разработанным нами методом т.н. озон-иницированной полимеризации. При этом активные центры, инициирующие полимеризацию фтормономера,

формируются на поверхности кремнезема в результате предварительной обработки озоном. Были исследованы свойства полученного сорбента. Показано, что он отличается высокой химической стойкостью и высокой селективностью при разделении нуклеиновых кислот и белков, а также ДНК от РНК.

В третьем случае впервые в результате реализации комплексного подхода к модификации поверхности кремнезема на гидрофобной химически стойкой матрице формировалось гидрофильное сорбционно-активное ПАНИ покрытие. Таким образом, был получен нанотолщинный бифункциональный полимерный слой, где сочетание свойств полимерсодержащего носителя и селективных сорбционных свойств полианилинового покрытия позволило создать новый тип биосорбента, который, не уступая в сорбционных свойствах ранее полученным фторполимер- и ПАНИ-содержащим сорбентам и коммерческим образцам, отличается при этом новыми свойствами, в частности, свойством разделять одно- и двухцепочечные нуклеиновые кислоты, а также позволяет в одну стадию получать стабильные при хранении препараты ДНК, непосредственно пригодные для проведения ПЦР-анализа.

Полученные сорбенты использовали для выделения ДНК из бактериальных лизатов, экстрактов растительной ткани, а также клинических образцов тканей человека (урогенитальные мазки).

Также в ходе работы был разработан метод получения нанотолщинного слоя анилинсодержащего сополимера на поверхности кремниевых пластин для масс-спектрометрии (патентная заявка EP09165091.1). Совместные исследования с компанией Royal Philips в ходе данной работы показали возможность разделения белков и пептидов в зависимости от значения их изоэлектрической точки на полученной подложке с дальнейшим проведением масс-спектрометрии без введения дополнительного оптически активного вещества (матрицы). Следует отметить, что полученные масс-спектры характеризовались отсутствием шума в низкочастотной области, обычно наблюдаемого при использовании традиционных методов пробоподготовки и анализа с добавлением матрицы.

DEVELOPMENT OF A NEW POLYMER CONTAINING CARRIER FOR BIOANALYSES

Prostyakova A.I., Kapustin D.V., Zubov V.P.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: profan@list.ru

Fax: (495) 335-10-1; tel.: (495) 336-06-00

The theme of the work gains currency due to necessity of biotechnology and clinical diagnostic in high purified and concentrated biopolymers (particularly in nucleic acids) samples.

A number of materials and methods are used for isolation of nucleic acids from different sources. The composite adsorbents modified with nano-layers of functionalized polymers (in particular with fluoropolymers and polyanilines, PANI) are the most perspective for these aims. The use of these polymers as polymer modifiers of adsorbent surface makes obtained materials very promising for effective separation even of similar biopolymers. It can be reached, in particular, due to unique physical-chemical and sorption properties of such polymers and materials modified there of, low non-specific sorption level and high selectivity for biopolymers separation, as well as the complex of specific properties. However the complexity of the sad materials manufacturing causes the development of simplest and effective methods for the preparation of biocompatible fluoropolymer and PANI-containing adsorbents.

The main aim of the work is developing a new approaches for the synthesis fluoro- and aniline containing silica carriers, studying their physicochemical and sorption properties; developing new efficient methods for one-step isolation and purification DNA from different sources (bacterial lysates, extracts of the plant tissues, clinical samples of human tissues and blood).

Three types of the sorbent, modified with fluorinated polyester, tetrafluoroethylen and material, sequence modified with fluoropolymer and aniline, were obtained during the work.

In the first case, polymer was immobilized by casting, and then fluoro containing coating was modified with nucleoside. Received material was studied and described. The joint researches with colleges from ProligoGmb confirmed efficiency of applying such material as carrier for solid-phase oligonucleotides synthesis.

In the next case fluoro containing coating was obtained by a new type of polymerization developed in our laboratory – ozon-induced polymerization. Active centers forms on the carrier surface during the ozonolysis and can initiate polymerization of different vinyl monomers. Morphological characteristics (specific volume and mean pore diameter) of prepared adsorbents were determined using mercury porosimetry insignificantly differ from values determined for materials obtained through irradiation post-polymerisation technique. The additional advantage of developed method is the possibility to activate the carrier surface using air current instead the oxygen at the room temperature. The sorption properties of obtained adsorbents were studied on examples of biopolymers separation from their model and real mixtures (in particular using DNA solutions with different

molecular mass and bacterial lysates). It was shown that the passing of biopolymers mixtures through the cartridges packed with prepared adsorbents results in the different retention of DNA with different molecular mass.

In the third case we realized for the first time the complex approach for modification of silica surface which is based on aniline matrix polymerization on the hydrophobic chemical stable matrix (silica, modified with vinyl containing polymer). The specific feature of this approach is the polymer coating has a twice function: a) its effectively shielding the inorganic surface of the carrier providing the decreasing of non-specific sorption, and b) its serves as a matrix for immobilization of PANI layers due to its ability to retain the reactive phenasin-containing oligomers of PANI. The last are formed during induction period when the aniline polymerization is carried out. Thus we formed the bifunctional polymer nano-layer where the vinyl polymer is hydrophobic chemically stable matrix, on which the hydrophilic sorptive active coating of PANI was immobilized.

The combination of polymer-containing support properties with selective sorption properties of PANI coating allowed to create the new type of bioadsorbent. This material does not cede the sorption properties in comparison with conventionally obtained fluoropolymer- and PANI-coated adsorbents and commercially available samples. At the same time it differs in its new properties, in particular it's able to separate the single- and double stranded nucleic acids.

Obtained adsorbents were used for one-step isolation of DNA from bacterial lysates, extracts of the plant tissues, as well as from clinical samples of human tissues (urogenital smears).

Also, during the work a method for obtaining nano-layer of aniline containing polymer on surface silica chips for mass spectrometry (European patent application number EP09165091.1) was developed. The joint researches with colleges from Royal Philips confirm that such coating has integrated matrix functionality and extremely low background at low masses. This makes it suitable for easy, reproducible analysis of, in particular, low molecular weight biomolecules, e.g. peptide mass finger printing and any other type of mass spectrometry.

ФЕРМЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ КОРМОПРОИЗВОДСТВА

Рафаилова Э.А., Морозова Ю.А., Скворцов Е.В.

Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина,
Казань

E-mail: rafailova_elina@mail.ru

Факс: (432) 238-71-21; тел.: (432) 231-52-47

Ключевым компонентом агробизнеса неизменно является эффективное кормопроизводство, обеспечивающее сбалансированные и высококачественные корма при минимальных затратах на их производство. Известно, что порядка 90% всех производимых кормов составляют корма для птицеводства, свиноводства и крупного рогатого скота. Качество и стоимость животноводческой продукции зависят от качества и стоимости кормов. С развитием биотехнологии в кормопроизводстве для улучшения пищевой ценности корма используют ферменты. Они позволяют изъять из кормов непищевые факторы (фитаты) и разрушить трудногидролизуемые компоненты зерна (пентозаны, бета-глюканы).

Одним из наиболее изучаемых грибов в настоящее время является род *Trichoderma*. Причиной этого интереса является большая практическая значимость рода. Виды *Trichoderma* являются продуцентами ферментов (целлюлаз, хитиназ, пектиназ, ксиланаз и др.), используемых в целлюлозно-бумажной и пищевой промышленности, в производстве моющих средств, в получении спирта и кормовых добавок.

Целью данной работы явился скрининг грибов рода *Trichoderma* с высокой ксиланазной активностью.

Моноспоровые культуры грибов получали методом, предложенным А.Н. Лихачевым [1]. Для культивирования грибов использовали природную экспериментальную среду – экстракт ржаных пентозанов (%): пентозаны – 0.2, белок – 0.5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0.5. Культуры выращивали в 150 мл колбах, содержащих 50 мл среды в течение 36-192 часов на лабораторных качалках с интенсивностью качания 200 об./мин при температуре 28°C. Пробы для определения ферментативной активности отбирали каждые 24 часа. Клетки отделяли центрифугированием.

Определение ксиланазной активности проводили по методике Kцпиг [2], диапазона размеров исследуемых ксиланаз – методом мембранной фильтрации. Для статистической обработки данных использовали программу Excel. Для сравнения применяли интервальные оценки. Уровень значимости $p < 0,05$ [3].

В результате исследований найден штамм с высокой активностью синтеза ксиланаз – на 70% выше активности стандартно используемого штамма. Отмечена высокая стабильность фермента в смоделированных условиях кишечного тракта моногастричных животных – за 5 часов сохраняется 60% исходной активности и повышенная способность ксиланазы снижать вязкость раствора некрахмалистых полисахаридов. Лабораторные исследования показали, что использование полученного нами фермента улучшает перевариваемость корма на 40% по сравнению со стандартным препаратом.

Культуральная жидкость с исследуемым ферментом была последовательно пропущена через мембраны с диаметрами пор, соответствующими Мм 100, 50, 15, 5 кДа. Данные анализа фракций фильтрата на наличие активности ксиланаз показали, что молекулярная масса исследуемого фермента находится в диапазоне от 50 до 100 кДа.

Таким образом, можно предположить, что использование предлагаемого фермента ксиланазы на основе обнаруженного нами штамма будет способствовать снижению себестоимости животноводческой продукции в результате увеличения эффективности корма (прирост массы животных) и снижения стоимости самого корма за счет использования более дешевого зернового сырья.

Работа выполнена при поддержке гранта фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере по программе "Участник молодежного научно-инновационного конкурса" ("У.М.Н.И.К.").

Литература

1. Лихачев А.Н. *Вестник МГУ. Биология*. 1998. Вып.3. С.103-104.
2. J. Kцпиг, R.Grasser, H. Pikor, K. Vogel. *Anal. Bioanal. Chem.* 2002. **37**. P.80-87.
3. Акберова Н. И. *Описательная статистика. Интервальные оценки: Учебно-методическое руководство и сборник задач к практическим занятиям по курсу "Математические методы в биохимии"*. Казань: Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина. 2004. 40с.

ENZUME PREPARATION FOR FORAGE PRODUCTION

Rafailova E.A., Morozova U.A., Skvortsov E.V.

V.I. Ulyanov-Lenin Kazan State University of, Kazan

E-mail: rafailova_elina@mail.ru

Fax: (432) 238-71-21; tel.: (432) 231-52-47

A key component of agrobusiness invariable is effective food manufactures, providing the balanced and high-quality forages at the minimal expenses for their manufacture. It's known, that the order of 90% all made food make forages for poultry farming, pork farming and large horned livestock.

The aim of biotechnology in the forage production is to improve the nutritional value of forage by using the fungi enzymes. There are non-nutritive ingredients (phytates) and hard digesting components of the grain (pentosan, beta-glucan) in forages. This makes food less digesting by animals and leads to increase of agricultural production cost.

One of the most studied mushrooms today is sort *Trichoderma*. The reason of this interest is big practical and the importance of a sort. Kinds of *Trichoderma* are producers of enzymes (cellulase, chitinase, pectinase, xylanase etc.), used in pulp-and-paper and the food-processing industry, in manufacture of washing-up liquids, in manufacture of ethanol, in manufacture of fodder additives.

We perform the screening of microorganisms with a high xylanase activity.

Monosporous cultures of mushrooms were received by method offered by A.N. Likhachev [1].

We used the natural experimental environment – an extract pentozanes of ryes (%): pentozanes – 0.2, fiber – 0.5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0.5. Cultures grew up in 150 ml the flasks containing 50 ml of environment during 36-192 hours on laboratory rocking chairs with intensity of rotation 200 turn /min at temperature 28°C. Tests for definition of enzyme activity were selected each 24 hours. Cages have separated the device for fast rotation.

Definition of xylanase activity was received by method offered by Künig [2]. Definition of a range of the sizes of xylanase was investigated by method of filtration of membranes.

We used the program Excel for statistical data processing. To comparison applied interval estimations. A significance value was $p < 0,05$ [3].

The attractive characteristics of the proposed fungi strain and xylanase preparation are:

1. The activity of xylanase production of our strain was higher up to 70% in comparison with standard strain.
2. Xylanase preparation was shown to possess the high stability during 5 hours.
3. The increased ability of xylanase to reduce viscosity of non-starched polysaccharides determined in animals and birds digestive tract was shown. Xylanase preparation improved the forage digestibility on 40% in comparison with a standard enzyme preparation.

The cultural liquid of investigated enzyme has been consistently passed through membranes with diameters of a 100, 50, 15, 5 kDa. The data of the analysis

of fractions of a filtrate on activity of xylanases has shown that the molecular masses of investigated enzyme are in a range from 50 to 100 kDa.

The use of offered enzyme preparation (xylanase) promotes decrease of the cost price of cattle-breeding production as a result of increase of efficiency of a forage (a gain of weight of animals) and deprecation of the forage due to use of cheaper grain raw material.

This work is executed with support of the grant of fund of assistance to development of small forms of the enterprises in scientific and technical sphere under the program "Participant of youth scientifically-innovative competition" ("P.Y.S.I.C.").

References

1. Likhachev A.N. *The Moscow State University Bulletin. Biology*. 1998. **3**. P.103-104.
2. J. Künig, R.Grasser, H. Pikor, K. Vogel. *Anal. Bioanal. Chem.* 2002. **37**. P.80-87.
3. Akberova N.I. Statistican. Interval estimations: the учебно-methodical management and the collection of problems to a practical training at the rate "Mathematical methods in biochemistry". Kazan: The Kazan State University of V.I. Ulyanov-Lenin. 2004. 40 pp.

ПОИСК ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ИНДИВИДУАЛЬНУЮ СПОРТИВНУЮ УСПЕШНОСТЬ

Ребриков Д.В., Морозова С.А., Трофимов Д.Ю., Шевкопляс Е.В.,
Тоневицкий А.Г.***

ЗАО "НПФ ДНК-Технология", Москва

*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

**ФГУ "Всероссийский научно-исследовательский институт физической культуры и спорта", Москва

E-mail: denis@dna-technology.ru

Факс: (495) 980-45-55; тел.: (903) 777-24-64

С целью поиска признаков, определяющих индивидуальную спортивную успешность, 1417 спортсменов – представителей олимпийских сборных РФ – были обследованы по 3 физиологическим, 74 биохимическим, 11 иммунологическим и 12 генетическим показателям. Для поиска взаимосвязанных признаков был разработан алгоритм выявления взаимосвязи между качественными и количественными признаками.

Анализ полученной базы данных с использованием разработанного математического аппарата выявил ряд новых взаимосвязей генетических и фенотипических признаков. Так, обнаружена взаимосвязь между уровнем сывороточного остеокальцина и полиморфизмом С341Т гена глутатион-S-трансферазы P1 (GSTP1); уровнями гемоглобина и кортизола и полиморфизмом А4889G (вариант m2) гена цитохрома P4501 A1 (CYP1A1); активностью аланинаминотрансферазы и полиморфизмом А(-9)V гена супероксиддисмутазы (Mn-SOD); уровнем тестостерона и полиморфизмом +9/-9 гена рецептора брадикинина II типа (BDKRB2); уровнем тестостерона и делеционным вариантом гена глутатион S-трансферазы тета-1 (GSTT1) и др.

Для большей части выявленных взаимосвязей предложена схема их возможной реализации на биохимическом уровне.

Работа поддержана грантом Роснауки №02.522.12.2001 и грантом Еврокомиссии FP6 #037212 (DIAGNOSIS).

GENETIC ANALYSIS OF ATHLETIC PERFORMANCE

Rebrikov D.V., Morozova S.A., Trofimov D.Y., Shevkoplyas E.V.,
Tonevitsky A.G.***

DNA-Technology JSC, Moscow

*Saint-Petersburg State University, St. Petersburg

**All-Russian Institute of Physical Culture and Athletics, Moscow

E-mail: denis@dna-technology.ru

Fax: (495) 980-45-55; tel.: (903) 777-24-64

To find a new linkages of genetic markers with an individual athletic performance, 1417 Russian elite athletes were tested by 3 physiological, 74 biochemical, 11 immunological and 12 genetic parameters. To search for associations of qualitative and quantitative parameters, new statistical algorithm was developed.

The database analysis showed several new associations of genetic and phenotypic factors: C341T polymorphism of GSTP1 and serum osteocalcin level; A4889G polymorphism (allele m2) of CYP1A1 and haemoglobin/hydrocortisone levels; A(-9)V polymorphism of Mn-SOD and alanine aminotransferase activity, +9/-9 polymorphism of BDKRB2 and testosterone level, deletion polymorphisms of GSTT1 and testosterone level etc.

For most of new associations found the biochemical pathways of interaction was proposed.

This work was partially supported by Rosnauka grant №02.522.12.2001 and FP6 DIAGNOSIS project #037212.

ГЕННАЯ И КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ БОКОВОГО АМИОТРОФИЧЕСКОГО СКЛЕРОЗА

*Ризванов А.А.****, *Мухамедьяров М.А.*** , *Киясов А.П.*** , *Исламов Р.Р.***

*Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина,

Казань

**Казанский государственный медицинский университет, Казань

E-mail: rizvanov@gmail.com

Факс: (843) 231-52-41; тел.: (843) 231-51-82

Введение. Боковой амиотрофический склероз (БАС) принадлежит к группе нейродегенеративных заболеваний с прогрессирующей гибелью двигательных нейронов головного и спинного мозга. В настоящее время не существует эффективных методов лечения БАС. Поддержание жизни нейронов, вступивших в патологический процесс, и восстановление утраченных межклеточных связей в нервной ткани могут существенно повысить качество и продолжительность жизни больных. Перспективными методами лечения больных, страдающих БАС, считаются генная и клеточная терапии. При генной терапии проводится коррекция экспрессии генов, ответственных за развитие заболевания, или доставка генов, экспрессирующих нейротрофические факторы. Другим перспективным направлением в терапии нейродегенеративных заболеваний является трансплантация стволовых и/или прогенеторных клеток. Терапевтический эффект при клеточной терапии достигается секрецией трансплантируемыми клетками факторов, поддерживающих выживаемость нервных клеток, а также дифференцировкой стволовых и прогенеторных клеток в нейральном направлении. Однако наиболее перспективным направлением считается комбинированная генная и клеточная терапия. При данном подходе совмещаются свойства стволовых клеток и экспрессия рекомбинантных терапевтических нейротрофических факторов.

Цель. В данной работе рассматриваются генные и клеточные подходы для лечения БАС на модели трансгенных G93A мышей. Генно-клеточная терапия основана на трансплантации мононуклеарных клеток крови пуповины, трансфицированных генами нейральной молекулы адгезии (*LICAM*) и сосудистого эндотелиального фактора роста (*VEGF*). Генная терапия основана на прямой аппликации короткой интерферирующей РНК (siRNA) на центральный участок перерезанного седалищного нерва трансгенных мышей.

Материалы и методы. Трансгенные мыши B6SJL-TG(SOD1-G93A)dl1Gur/J (далее G93A мыши) были получены из Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA). G93A мыши экспрессируют ген Cu^{2+}/Zn^{2+} -супероксид-дисмутаза (hSOD1) человека, который вызывает одну из семейных форм БАС. Гены *LICAM* и *VEGF* были ПЦР амплифицированы и клонированы в экспрессионный плазмидный вектор pcDNA3.1. Мононуклеарные клетки крови пуповины человека получали центрифугированием в градиенте плотности фиколла и трансфицировали с помощью электропоратора Gene Pulser Xcell Total System (BioRad). Генетически модифицированные клетки

инъекцировали в ретроорбитальное пространство G93A мышей. Через 2 недели, 2 и 3 месяца поясничный отдел спинного мозга мышей выделяли для иммуногистохимического исследования.

Для генной терапии на основе механизмов РНК-интерференции G93A мышам перерезали левый седалищный нерв в средней трети бедра и на центральный отрезок нерва надевали силиконовую трубку, содержащую раствор siRNA. В работе применяли siRNA, комплементарную к мРНК гена *hSOD1*, а также контрольные siRNA. Через 24 часа после операции уровень экспрессии мРНК в поясничном отделе спинного мозга мышей определяли с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

Результаты и обсуждение. В ходе иммуногистохимического анализа тканей поясничного отдела спинного мозга мышей мы обнаружили, что трансплантированные генетически модифицированные мононуклеарные клетки крови пуповины человека мигрировали в зоны нейродегенерации и дифференцировались в эндотелиальные клетки с образованием новых кровеносных сосудов. Известно, что VEGF является ангиогенным и нейропротекторным фактором, в то время как экспрессия нейральной молекулы адгезии *LICAM* способствует повышению тропизма генетически модифицированных клеток к нервной ткани. Полученные результаты позволяют предположить, что формирование новых кровеносных сосудов в зоне нейродегенерации повышает выживаемость мотонейронов и указывает на целесообразность последующего развития исследований данного подхода в терапии нейродегенеративных заболеваний. Аппликация hSOD1-специфичной siRNA на седалищный нерв приводила к снижению уровня мРНК hSOD1 в поясничном отделе спинного мозга на 48% в сравнении с контралатеральной стороной ($P = 0,032$). Нами впервые было показано, что hSOD1-специфичная siRNA, апплицированная на седалищный нерв, ретроградно транспортируется в спинной мозг и снижает уровень мРНК мутантного гена *hSOD1*.

Таким образом, в данной работе показано, что комбинированная невирусная генно-клеточная терапия и аппликация siRNA могут быть эффективны для лечения бокового амиотрофического склероза.

GENE AND CELL THERAPY OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

Rizvanov A.A.***, Mukhamedyarov M.A.** , Kiyasov A.P.** , Islamov R.R.**

*V.I. Ulyanov-Lenin Kazan State University, Kazan

**Kazan State Medical University, Kazan

E-mail: rizvanov@gmail.com

Fax: (843) 231-52-41; tel.: (843) 231-51-82

Introduction. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease which is characterized by progressive death of motor neurons in brain and spinal cord. Currently there is no effective treatments for ALS. Sustaining viability of neurons which entered pathological process and restoration of lost cellular contacts in neural tissue could significantly increase life quality and expectancy of ALS patients. Gene and cell therapies are considered promising for treating this disease. Gene therapy allows correction of genes responsible for disease onset and progression and expression of neurotrophic factors. Another promising approach for treating neurodegenerative diseases is transplantation of stem and/or progenitor cells. Therapeutic effect of cell therapy is based on secretion by transplanted cells of different paracrine factors which enhance neural cell viability, as well as on differentiation of transplanted cells into neural lineage. One of the most promising approaches is combination of gene and cell therapy, which takes advantage of stem and progenitor cell properties and expression of recombinant therapeutic neurotrophic factors.

Aim. The purpose of this work was to develop gene and cell therapy approaches for treating ALS using transgenic G93A mice model. Gene-cell therapy was based on transplantation of human umbilical cord blood mononuclear cells transfected with genetic constructs encoding neural cell adhesion molecule L1 (*LICAM*) and vascular endothelial growth factor (*VEGF*). Gene therapy approach was based on direct application of short interfering RNA (siRNA) onto the proximal nerve stump of severed sciatic nerves of transgenic animals.

Materials and methods. Mice transgenic for hSOD1 [B6SJL-TG(SOD1-G93A) dl1Gur/J] were obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). These transgenic mice express a mutant form (G93A substitution) of human copper/zinc superoxide dismutase-1 (hSOD1), which is responsible for one of the familial forms of ALS. Genes *LICAM* and *VEGF* were PCR amplified and cloned into pcDNA3.1 expression plasmid. Mononuclear cells (MC) were isolated from human umbilical cord blood (UCB) by standard technique of sedimentation onto a density barrier (1.077 g/ml of Ficoll solution) and transfected by electroporation using Gene Pulser Xcell Total System (BioRad). Genetically modified cells were retroorbitally injected into G93A mice. At different time points post transplantation (2 weeks, 2 and 3 months) mice were sacrificed and lumbar spinal cords were removed for immunohistochemical analysis.

Gene therapy approach was based on RNA interference. The left sciatic nerve of anesthetized animals was cut in the mid-thigh, and the proximal nerve stump was inserted into a silastic plastic tube containing siRNA solution. We used siRNA complementary to *hSOD1* as well as different control siRNAs. Twenty-four hours

after surgery the mice were euthanized, and lumbar spinal cords were removed for real-time (RT)-PCR examination.

Results and discussion. Immunohistochemical analysis of lumbar spinal cords sections revealed that transplanted genetically modified UCB-MC migrated to the sites of neurodegeneration and differentiated into endothelial cells, forming new blood vessels. It is known, that VEGF is an angiogenic and neuroprotection factor, whereas neural adhesion molecule *LICAM* expression increases tropism of genetically modified cells to neural tissue. Our results suggest, that new blood vessel formation at the sites of neurodegeneration might increase viability of motoneurons and such approach might be promising for developing gene-cell therapies for treating neurodegenerative diseases.

Administration of hSOD1-specific siRNA resulted in a 48% decrease in hSOD1 mRNA level in corresponding spinal cord section ($P = 0.032$). These results clearly prove that siRNA targeting mutant SOD1 mRNA is taken up by the sciatic nerve, retrogradely transports to the perikarya of motor neurons, and inhibits mutant SOD1 mRNA in G93A mice.

In conclusion, we demonstrate efficiency of combined non-viral gene-cell therapy and direct application of siRNA for treating amyotrophic lateral sclerosis.

**ПРИРОДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ 5'-РЕГУЛЯТОРНОЙ ОБЛАСТИ
ГЕНА *LIM3* *D. MELANOGASTER*, ГОМОЛОГА ГЕНОВ
ЧЕЛОВЕКА *LHX3/4*, ОПРЕДЕЛЯЕТ РАЗЛИЧИЯ В УРОВНЕ ЕГО
ЭКСПРЕССИИ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ
ДРОЗОФИЛЫ**

Рыбина О.Ю., Пасюкова Е.Г.

Институт молекулярной генетики РАН, Москва

E-mail: flybee@mail.ru

Факс: (499) 196-19-09; тел.: (499) 196-19-09

Ген *lim3* дрозофилы, кодирующий транскрипционный фактор РНК полимеразы II, играет ключевую роль в регуляции развития нейронов. Мутации гомологов данного гена, *LHX3/4*, у человека приводят к нарушениям секреции гормона гипофиза, карликовости, нарушениям работы мозга. Ранее было показано, что *lim3* является геном-кандидатом, участвующим в контроле продолжительности жизни (ПЖ) дрозофилы (Рощина, Пасюкова, 2007). Целью данной работы является исследование молекулярных механизмов, лежащих в основе участия гена *lim3* в контроле ПЖ. Можно предположить, что определенный уровень активности гена в онтогенезе и тканеспецифичность его экспрессии, например, в нервной ткани, могут определять его влияние на ПЖ. Задача данной работы заключалась в изучении влияния молекулярной структуры регуляторной области гена *lim3* на его транскрипцию и анализе взаимосвязи уровня его экспрессии и ПЖ дрозофилы.

lim3 у дрозофилы образует две мРНК: *lim3-RB* и *lim3-RA*. Функциональное значение для развития нейронов было показано для *lim3-RA* (Thor et al., 1999). В связи с этим *lim3-RA* был выбран нами для исследования роли экспрессии гена *lim3* в контроле ПЖ. Механизм образования этого транскрипта и строение регуляторной области ранее описаны не были. Анализ (NNPP, v.2.2) показал наличие двух промоторных элементов, расположенных на расстоянии ~500 п.н. выше заявленного в базе данных начала *lim3-RA*. Нозерн-блот анализ со специфичным к *lim3-RA* зондом показал наличие двух транскриптов вместо одного: мажорный транскрипт совпадал с *lim3-RA* (2,5 т.п.н.), а второй (2,3 т.п.н.) прежде не был аннотирован и был назван нами *lim3-RC*. Наличие новой мРНК было подтверждено 5'RACE, позволившим выявить, что обе мРНК имеют множественные старты транскрипции, а также уточнить на 6 нуклеотидов старт для *lim3-RA*.

Анализ промоторных областей *lim3-RA* и *lim3-RC* дал возможность определить несколько типичных регуляторных элементов транскрипции (*Drosophila* Core Promoter Database, DCPD). Так, для *lim3-RA* был найден консенсусный инициатор, консенсусный Downstream core promoter element (DPE), а также мотив CAATAA, характерный для генов, экспрессия которых приходится на эмбриональную стадию, а функция связана с развитием нейронов. Для *lim3-RC* не было обнаружено классических промоторных элементов, однако в положении -24(-18) от его старта была найдена последовательность CAATAA, способная компенсировать отсутствие TATA-

бокса. Таким образом, показано, что структура промоторной области гена *lim3* типична для тканеспецифичных регуляторных генов, имеющих рассеянный старт транскрипции.

Далее, для изучения влияния молекулярной структуры регуляторной области гена *lim3* на уровень его транскрипции и ПЖ дрозофилы мы использовали 50 линий мух, содержащих индивидуальную вторую хромосому из природной популяции Raleigh в однородном генетическом окружении (изогенная линия Samarkand). Линии достоверно различаются по ПЖ (22-62 дней, $P < 0,0001$) (De Luca M., 2003). Для каждой из 50 аллелей *lim3* были определены последовательность фрагмента ДНК в 2092 п.н., охватывающая обнаруженную нами регуляторную область, первый экзон и часть первого интрона *lim3-RA* и *lim3-RC*. Всего было найдено 89 полиморфных локусов-маркеров, неравномерно распределенных по длине исследованного фрагмента. Наиболее варибельным оказался дистальный район регуляторной области ($\pi = 0,01170$) и интрон ($\pi = 0,01443$); менее варибельным – проксимальный район регуляторной области ($\pi = 0,00114$); наименее варибельным – экзон ($\pi = 0,00114$). Роль отбора в поддержании низкого уровня полиморфизма в экзоне подтверждена статистическим анализом данных (Tajima, 1989). Мы проанализировали связь между обнаруженным нами полиморфизмом регуляторной области *lim3* и изменчивостью ПЖ дрозофилы. Пять из найденных полиморфных сайтов оказались достоверно связаны с ПЖ дрозофилы. Три из них образовали гаплотип, достоверно связанный с ПЖ ($P = 0,0005$).

Мы предположили, что замены в регуляторной области могут приводить к изменению уровня транскрипции гена и, следовательно, к изменению ПЖ дрозофилы. Для характеристики уровня транскрипции *lim3* при помощи ОТ-ПЦР в реальном времени было измерено количество мРНК *lim3-RA* в 16 линиях с различными вариантами найденного гаплотипа.

Оценка уровня экспрессии показала, что варианты гаплотипа, характеризующиеся максимальной ПЖ, обуславливают средний, видимо, оптимальный уровень экспрессии гена *lim3* и с большей частотой представлены в популяции. Линии, в которых экспрессия достоверно выше или ниже оптимума, имеют меньшую ПЖ и содержат варианты гаплотипа, редко встречающиеся в популяции. Обнаруженное распределение уровня экспрессии по гаплотипам было одинаковым для всех исследованных тканей, где наблюдается экспрессия *lim3*: эмбрионов, голов, семенников. Компьютерный анализ показал, что маркеры гаплотипа попадают в сайты связывания белков, два из которых участвуют в развитии нейронов, а один – в ремоделировании хроматина.

Таким образом, нами показана функциональная связь между полиморфизмом регуляторной области гена, определяющего развитие нервной системы, и продолжительностью жизни.

**POLYMORPHISM OF THE 5'-REGULATORY REGION OF
D. MELANOGASTER LIM3 LOCUS, A HOMOLOG OF HUMAN
LHX3/4, DEFINES *LIM3* EXPRESSION AND LIFESPAN
VARIATION IN DROSOPHILA**

Rybina O.U., Pasyukova E.G.

Institute of Molecular Genetics of RAS, Moscow

E-mail: flybee@mail.ru

Fax: (495) 196-19-09; tel.: (495) 196-19-09

Lim3 is an essential gene coding for RNA polymerase II transcription factor and playing a key role in neuron specification during *Drosophila* development. Mutations in its human homologs, *LHX3/4*, result in disorder of pituitary hormone release, short stature, abnormality of brain functioning. *Lim3* was previously nominated as a candidate gene affecting *Drosophila* lifespan (Roshina, Pasyukova, 2007). The long term goal of this work is to study molecular mechanisms of *lim3* association with *Drosophila* lifespan. A certain level of gene expression in ontogeny and tissue-specificity of its transcription, for example in nerve tissue, can be supposed to define its influence on the lifespan. The purpose of this research was to study the impact of variation in *lim3* regulatory region molecular structure on its expression and to analyze association between gene expression level and *Drosophila* lifespan.

Lim3 produces two mRNAs: *lim3-RB* and *lim3-RA*. *Lim3-RA* was shown to have functional meaning for *Drosophila* neuron development (Thor et al., 1999). As a result, we chose *lim3-RA* to study *lim3* association with *Drosophila* lifespan. Mechanisms of this transcript production and its regulatory region structure had not been previously described. Computer analysis (NNPP, v.2.2) revealed two promoter sequences located 500 bp upstream of the initially predicted *lim3-RA* transcription start site (TSS). Northern blot analysis with the specific probe to *lim3-RA* detected two transcripts instead of one: the major transcript was of the same length with *lim3-RA* (2,5 kb) and the second (2,3 kb) which had not been previously annotated was named *lim3-RC*. 5'RACE analysis confirmed the presence of additional new mRNA, *lim3-RC*, and revealed *lim3-RA* and *lim3-RC* to have multiple transcription start sites. 5'RACE also allowed to define *lim3-RA* TSS to be 6 nucleotides upstream with regard to the earlier annotated start site.

The computer analysis of promoter regions of *lim3-RA* and *lim3-RC* revealed several regulatory elements (*Drosophila* Core Promoter Database, DCPD). Thus, *lim3-RA* was found to have a consensus initiator, consensus downstream core promoter element (DPE) and a motif CAATAA shared with genes which expression referred to embryonic stage and function concerned with neuron development. In contrast to the *lim3-RA*, *lim3-RC* was not found to have any promoter elements in the regulatory region of this transcript. But the sequence CAAAAT found at -24 (-18) position relative to the *lim3-RC* TSS could functionally replace a TATA element for transcriptional activation. Thus, the promoter region structure of gene *lim3* appeared to be common to tissue-specific regulatory genes with multiple transcription start sites.

To study the influence of *lim3* regulatory region molecular structure on its expression level and *Drosophila* lifespan we used fifty substitution *D. melanogaster* lines containing natural second chromosomes in homogenous genetic background (isogenic line Samarkand), significantly differing in lifespan (22-62 days, $P < 0,0001$; De Luca et al., 2003). A DNA fragment of 2092 bp including 5'-regulatory region, the first exon and intron of *lim3-RA* and *lim3-RC* was sequenced for each of 50 substitution lines. Eighty nine polymorphic sites (markers) found were non-uniformly distributed along the DNA fragment: the remote, distal 5'-regulatory region ($\pi = 0.01170$) and intron ($\pi = 0.01443$) were the most variable; the proximal 5'-regulatory region adjacent to the gene was considerably less variable ($\pi = 0.00114$); and the lowest level of variability was found in exon ($\pi = 0.00114$). The statistic data analysis confirmed the exon with such a low level of variability to be under selective pressure (Tajima, 1989). Further, we analyzed the association between the revealed polymorphism of gene *lim3* regulatory region and *Drosophila* lifespan variation. Five of previously found polymorphic markers demonstrated significant associations with *Drosophila* lifespan. Three of these markers formed a haplotype significantly associated with lifespan ($P = 0.0005$).

We supposed that changes in regulatory region might result in *lim3* expression alterations and, consequently, in *Drosophila* longevity changes. To evaluate expression level of *lim3*, we used Real Time RT-PCR to determine major *lim3-RA* transcript amount in sixteen *Drosophila* lines with different variants of the above mentioned haplotype.

Haplotype variants associated with maximum lifespan appeared to provide medium and apparently optimal expression level and were most often encountered in population. Lines with higher or lower transcription levels had decreased lifespan and possessed rare haplotype variants. The haplotype-dependent transcription level was the same for all tissues where *lim3* expression was studied: embryos, heads and testis.

The computer analysis of the markers formed this significant haplotype revealed them to affect binding motifs of different proteins, one of which was associated with chromatin remodeling.

Overall, we showed a functional relationship between the regulatory region polymorphism of the gene playing a key role in nervous system development and lifespan.

КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ СОСТАВОМ ПОЛИВАЛЕНТНЫХ КОНЬЮГАТОВ АНТИТЕЛ С НАНОЧАСТИЦАМИ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА И ИХ АФФИННОСТЬЮ

Сафенкова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

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

E-mail: saf-iri@yandex.ru

Факс/тел.: (495) 954-28-04

Антитела, конъюгированные с наночастицами, в первую очередь с наночастицами коллоидного золота (НКЗ), широко применяются в качестве средств визуализации и доставки, катализаторов, в аналитических системах, а также в терапевтических целях. В зависимости от выбора условий иммобилизации для одних и тех же реагентов могут быть получены конъюгаты, существенно отличающиеся по свойствам. Поэтому зависимость функциональных свойств конъюгата (прежде всего - способности связываться с антигеном) от его структуры представляет значительный интерес. Иммобилизация антител на поверхности НКЗ приводит к образованию поливалентных структур с аффинностью (равновесной константой реакции с антигеном), отличающейся от аффинности соответствующих антител. Анализ зависимости между структурой конъюгатов антител с НКЗ и их аффинностью, на сегодняшний день практически не охарактеризованной, составлял задачу проведенного исследования.

Взаимодействие поливалентных конъюгатов антител со структурами, несущими на своей поверхности большое число идентичных антигенных детерминант, является наиболее показательным поливалентным взаимодействием. В этом случае возможно оценить функциональные свойства поливалентного конъюгата как целостной частицы. В нашей работе в качестве поливалентного антигена был использован вирус шарки сливы (ВШС). ВШС имеет нитевидную форму частиц и состоит из более чем 2000 копий белка оболочки (молекулярная масса 36,4 кДа), покрывающих единственную молекулу РНК.

Для работы было получено два моноклональных антитела (Ат1, Ат2) против ВШС. Варьируя соотношение золотохлористоводородной кислоты и цитрата, было синтезировано пять препаратов НКЗ со средним диаметром частиц 6,4, 12,6, 23,4, 33,4 и 52 нм, по данным электронной микроскопии. НКЗ разного размера были выбраны с целью получить конъюгаты с разной площадью посадки для антител, а, следовательно, конъюгаты разной валентности. Данные реагенты обеспечили возможность синтеза десяти конъюгатов, несущих от 3 до 200 молекул антител на поверхности одной НКЗ. Для каждого конъюгата были оптимизированы условия конъюгации: рН и концентрация антител для иммобилизации.

Равновесные константы диссоциации и кинетика реакции взаимодействия были измерены с помощью поверхностного плазмонного резонанса, используя ВІАсоге Х. На поверхность СМЗ чипа ковалентно иммобилизовали специфические антитела. Далее последовательно вводился вирус в постоянной концентрации и антитела или их конъюгаты в различных

концентрациях. После стадий ассоциации и диссоциации регенерировали поверхность до первого слоя антител. Для моноклональных антител получены близкие значения равновесных констант (Кд): $1,46 \cdot 10^{-8}$ М (Ат1) и $1,73 \cdot 10^{-8}$ М (Ат2). Также были определены равновесные константы для конъюгатов НКЗ с соответствующими антителами: $1,69 \cdot 10^{-9}$ М (Ат1-НК36,4), $2,94 \cdot 10^{-10}$ М (Ат1-НК312,6), $5,4 \cdot 10^{-11}$ М (Ат1-НК323,4), $5,24 \cdot 10^{-11}$ М (Ат1-НК333,4), $7,02 \cdot 10^{-12}$ М (Ат1-НК352), $2,39 \cdot 10^{-9}$ М (Ат2-НК36,4), $4,42 \cdot 10^{-10}$ М (Ат2-НК312,6), $9,9 \cdot 10^{-11}$ М (Ат2-НК323,4), $7,09 \cdot 10^{-11}$ М (Ат2-НК333,4), $2,62 \cdot 10^{-11}$ М (Ат2-НК352).

Сравнение значений, представленных выше, позволяет сделать вывод о том, что аффинность конъюгатов изменяется в соответствии с размером коллоидного носителя (т.е. в соответствии с валентностью конъюгата). Аффинность реакции взаимодействия ВШС с антителами ниже аффинности взаимодействия ВШС с соответствующими антителами в конъюгатах от одного (конъюгаты с НКЗ с диаметром 6,4 нм) до трех порядков (конъюгаты с НКЗ с диаметром 52 нм). С ростом валентности конъюгата количество точек связывания внутри комплекса увеличивается. Таким образом, для конъюгатов НКЗ большего размера кинетическая константа диссоциации уменьшается, а кинетическая константа ассоциации увеличивается. Кроме того, с увеличением размеров конъюгата повышается аффинность взаимодействия.

Таким образом, увеличение площади носителя и, соответственно, соотношения антитело/НКЗ позволяет синтезировать конъюгаты антител, обладающие значительно большей аффинностью и, благодаря этому, наиболее перспективные для биоаналитического использования.

Работа поддержана Программой Президиума РАН "Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов".

CORRELATION BETWEEN COMPOSITION OF MULTIVALENT CONJUGATES OF ANTIBODIES WITH COLLOIDAL GOLD NANOPARTICLES AND THEIR AFFINITY

Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.

Institute of Biochemistry RAS, Moscow

E-mail: saf-iri@yandex.ru

Fax/tel.: (495) 954-28-04

Antibodies conjugated with nanoparticles, especially with colloidal gold nanoparticles (GNPs), have numerous applications in analytical techniques, imaging, delivery, therapy. The conjugates of different composition can be obtained for the same reagent by a choice of conditions of immobilization. In this connection the influence of the conjugates' composition on their functional properties (first of all - on their binding with antigens) is a subject of specific interest. Immobilization of antibodies on a GNP's surface leads to formation of multivalent structure with the affinity (equilibrium constant of the reaction with antigen) that differs from affinity of native antibodies. The aim of this study is about dependences between composition of GNPs conjugates with antibodies and their affinity because currently there is a lack of information about it. The interaction of multivalent conjugates with multiepitopic structures is the most indicative for this purpose as well as in this case functional properties of multivalent conjugate as an integrated reactant could be estimated. In our study plum pox virus (PPV) was chosen as multivalent antigen to be characterized. PPV with flexuous rod-shaped form of particles consists of more than 2,000 copies of a single-coat protein with Mm 36.4 kDa encapsulating a single RNA molecule.

Two monoclonal antibodies against PPV (Ab1 and Ab2) have been obtained. Varying HAuCl₄ / citrate ratio, five GNP preparations with average diameter of particles equal to 6.4, 12.6, 23.4, 33.4 and 52 nm (according to electron microscopy measurements) were synthesized. GNPs of various sizes were used to obtain conjugates with different area for immobilization of antibodies, and, consequently, conjugates with different valency. The formed row of preparations was allowed to synthesize ten conjugates containing from 3 to 200 molecules of antibodies per one GNP. For each conjugate optimal conditions for the immobilization were determined by varying pH and concentration of antibodies.

Surface plasmon resonance (using BIAcore X) was applied to study the affinity and kinetics of the conjugate-PPV interactions. Antibodies were immobilized covalently on surface of CM3 chip. Then the virus at a fixed concentration and antibodies or their conjugates at varying concentrations were injected sequentially. After association and dissociation stages the surface was regenerated to the first layer of the antibodies. The obtained equilibrium dissociation constants (K_d) for native antibodies have close values, namely $1.46 \cdot 10^{-8}$ M for Ab1 and $1.73 \cdot 10^{-8}$ M for Ab2. K_d for the conjugates were $1.69 \cdot 10^{-9}$ M (Ab1-GNP6.4), $2.94 \cdot 10^{-10}$ M (Ab1-GNP12.6), $5.4 \cdot 10^{-11}$ M (Ab1-GNP23.4), $5.24 \cdot 10^{-11}$ M (Ab1-GNP33.4), $7.02 \cdot 10^{-12}$ M (Ab1-GNP52), $2.39 \cdot 10^{-9}$ M (Ab2-GNP6.4), $4.42 \cdot 10^{-10}$ M (Ab2-GNP12.6), $9.9 \cdot 10^{-11}$ M (Ab2-GNP23.4), $7.09 \cdot 10^{-11}$ M (Ab2-GNP33.4), $2.62 \cdot 10^{-11}$ M (Ab2-GNP52).

The comparison of the given above values allow to conclude that the conjugates' affinities change in the accordance with the sizes of colloidal carriers (i.e. with the conjugates' valency). Affinity of the interaction of PPV with conjugates is higher as compared with the interaction of PPV with corresponding for antibodies from 1 order (conjugates with 6.4 nm GNP) to 3 orders (conjugates with 52 nm GNP). Growth of the conjugates valency causes growth of the number of connection points in the immune complex. Thus, kinetic constant of dissociation decreases and kinetic constant of association increases for GNP conjugates of higher size. Increase of the conjugate size corresponds to growth of its affinity.

Therefore, at increase of the area of the carrier and corresponding growth of antibody/GNP ratio is an efficient tool to synthesize conjugate that will possess considerably higher affinity and therefore will be the most perspective for bioanalytical application.

The work was supported by the Program of Fundamental Researches of the Presidium of the Russian Academy of Sciences "Principles of fundamental studies of nanotechnologies and nanomaterials".

**ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К
ДИФТЕРИЙНОМУ ТОКСИНУ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ
ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ**

Симонова М.А., Шошина Н.С., Валякина Т.И.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
E-mail: valyakina@ibch.ru
Тел.: (495) 335-35-22

Дифтерийный токсин, продуцируемый клетками патогенных бактерий *Corynebacterium diptheriae*, является главным патологическим фактором дифтерии – заболевания, которое представляет серьезную проблему для здоровья населения во многих регионах мира. Задачей настоящей работы явилось получение моноклональных антител (МА) к дифтерийному токсину (ДТ), способных с высокой чувствительностью (предел детекции ниже 2 нг/мл) определять ДТ в планшетном сэндвич-варианте иммуоферментного анализа (ИФА) и в формате биологического микрочипа. Гибридомы, продуцирующие МА к ДТ, были получены слиянием клеток миеломы SP2/0 и лимфоцитов подколенных лимфатических узлов мышей BALB/c, иммунизированных ДТ (ГУ НИИ микробиологии и эпидемиологии им. Н.Ф. Гамалеи) или конъюгатом ДТ с полистирольными микросферами (ДТ-ПМ). В результате гибридизации лимфоцитов мышей, иммунизированных ДТ, было получено 13 стабильных продуцирующих моноклональные антитела клонов гибридом, и в результате гибридизации лимфоцитов мышей, иммунизированных ДТ-ПМ – 9 клонов. Методом Вестерн-блот анализа было показано, что МА, полученные в результате слияния клеток миеломы и лимфоцитов мышей, иммунизированных ДТ, связывались преимущественно с В-фрагментом, тогда как МА, полученные в результате слияния клеток миеломы и лимфоцитов мышей, иммунизированных ДТ-ПС, связывались исключительно с А-фрагментом токсина. Из панели полученных МА отбирали пары для сэндвич-варианта ИФА, которые позволяли детектировать ДТ в концентрации ниже 2 нг/мл. Сэндвич-анализ проводили, используя полученные в результате обоих вариантов иммунизации МА в качестве как связывающих, так и детектирующих антител. Были отобраны 5 пар МА, предел детекции ДТ для которых составил не более 1,3 нг/мл. Присутствие в пробах с дифтерийным токсином биологического материала (смывов носоглотки здорового человека) не снижало чувствительность определения токсина в сэндвич-ИФА. Для антител, образующих пары в сэндвич-ИФА с требуемым пределом детекции, были определены типы тяжелых цепей и константы аффинности. Все антитела относились к классу IgG, подклассам IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3. Величины констант варьировали от $0,013 \times 10^9$ до $14 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$. Выяснилось, что пары для детекции ДТ в сэндвич-ИФА образовывались как между антителами, полученными в результате иммунизации мышей ДТ, так и ДТ-ПС. В формате микрочипа отобранные пары подтвердили высокую чувствительность детекции ДТ. Предел детекции ДТ для лучшей пары составил 1,6 нг/мл. При использовании этих пар в формате микрочипа была показана возможность одновременного определения ДТ и восьми других токсинов, а именно рицина, летального фактора сибиреязвенного токсина, протективного антигена сибиреязвенного токсина, холерного токсина и токсинов стафилококков SeB, SeA, SeI и SeG.

**OBTAINING OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO DIPHTHERIA
TOXIN FOR PRODUCING OF HIGH SENSITIVE ASSAYS**

Simonova M.A., Shoshina N.S., Valyakina T.I.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow
E-mail: valyakina@ibch.ru
Tel: (495) 335-35-22

Diphtheria toxin is produced by pathogenic bacteria *Corynebacterium diptheriae*. It is the main pathological factor of diphtheria – disease that steel serious danger for populations of many world regions. In present work we obtained monoclonal antibodies (MAbs) to diphtheria toxin (DT), which were able to detect the last one in concentration no more than 2 ng/ml in sandwich enzyme linked solid phase immunoassay (ELISA) and microchip immunoassay. The MAbs were arisen by hybridoma technology. Myeloma cells SP2/0 were fused with lymphocytes from popliteal lymph nodes of mice immunized with DT (Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow) or DT conjugated with polystyrene microparticles (DT-cPM). As result after hybridization of the lymphocytes of mice immunized with intact DT we obtained 13 hybridoma clones which were stable produced MAbs to DT and after hybridization of the lymphocytes of mice immunized with DT-cPM – 9 clones. We use Western blot analysis to determinate the antigenic specificity of the obtained antibodies. MAbs which were obtained after mice immunization with intact DT bound mainly B-fragment of the toxin, and MAbs arose as result of mice immunization with DT-cPM bound only A-fragment. From the panel of MAbs obtained after both immunizations we were selected the pairs of the antibodies which were able to detect DT in ELISA in concentration no more than 2 ng/ml. The 5 pairs of MAbs were obtained which were able to detect DT in concentration from 1.3 ng/ml. In presence of nazopharyngs lavage samples from healthy person the sensitivity of DT detection did not decrease. We have been determinate types of heavy chains and affinity constants for MAbs which were formed pairs with appropriate sensitivity of DT detection. All MAbs were IgG class and IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3 subclasses. The affinity constants values were varied from 0.013×10^9 to $14 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$. In microchip analysis the selected pairs also were able to detect DT with high sensitivity. The DT detection limit was 1.6 ng/ml in this analysis. In microchip analysis it was shown possibility of simultaneous DT detection with another 8 toxins, namely ricin, lethal anthrax factor, protective antigen of anthrax toxin, cholera toxin, and staphylococcal enterotoxins SeB, SeA, SeI and SeG.

**НОВЫЙ МЕТОД АНАЛИЗА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ
ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПАТОГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА И
ЖИВОТНЫХ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ
ТРАНСКРИПТОМА *M. TUBERCULOSIS IN VIVO***

Скворцов Т.А., Игнатов Д.В., Ант А.С. *, Ажикина Т.Л., Свердлов Е.Д.

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

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

*ГУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН

E-mail: timofey.skvortsov@gmail.com

Факс: (495) 330-65-38; тел.: (495) 330-65-47

Цель исследования. Изменения в экспрессии, возникающие в ответ на защитную реакцию организма-хозяина, являются необходимым условием для выживания и функционирования патогенных бактерий. Анализ этих изменений важен для понимания патогенеза инфекционного заболевания и выработки подходов к эффективному лечению. Изучение специфической экспрессии генов возбудителей в инфицированном хозяине затруднено из-за сложностей, связанных с выделением бактериальной РНК, и проблемы отделения бактериальной РНК от громадного избытка РНК хозяина. Целью исследования стала разработка универсального метода анализа профиля транскрипции внутриклеточных микроорганизмов и применение его для изучения динамики полногеномной экспрессии *M. tuberculosis* в ходе развития инфекционного процесса в резистентной и восприимчивой к заболеванию линиях мышей.

Материалы и методы. В работе были использованы мыши линии В6, устойчивые к инфекции *M. tuberculosis*, и линии I/St, чувствительные к инфекции. Суммарная РНК легких мышей обеих линий была выделена через 4 и 6 недель с момента заражения бактериями *M. tuberculosis* штамма H37Rv. Далее была проведена совместная денатурация и ренатурация избытка бактериальной геномной ДНК с синтезированной на матрице суммарной РНК кДНК, в результате была выделена фракция, обогащенная бактериальной кДНК. Для ряда генов с помощью количественной ПЦР были сравнены уровни транскрипции в образце суммарной кДНК и фракции бактериальной кДНК. Затем было проведено тотальное секвенирование полученных образцов, данные обработаны биоинформатически и статистически.

Результаты. Возможность применения разработанной методики для качественной и количественной оценки экспрессии генов была подтверждена с помощью ПЦР. В результате анализа данных были получены сведения о качественных и количественных отличиях в профилях транскрипции бактерий из резистентной и восприимчивой к инфекции линий мышей. Отмечены различия в профилях экспрессии генов ряда функциональных категорий, в частности, категории генов вирулентности, энергетического обмена и ряда других.

Заключение. Разработан эффективный и универсальный метод, позволяющий изучать профили транскрипции внутриклеточных паразитических бактерий. Показана высокая чувствительность и

специфичность метода. Набор транскриптов, полученный данным способом, сохраняет как качественные, так и количественные характеристики транскриптома бактерии из инфицированных тканей, и может быть использован для изучения экспрессии генов патогенов *in vivo*. Анализ этих последовательностей, транскрибирующихся в условиях реальной инфекции, позволит в дальнейшем предложить ранее неизвестные мишени для создания новых лекарств и мониторинга инфекций.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 08-04-01053), Программы поддержки ведущих научных школ России (проект НШ 2395.2008.4) и Программы по молекулярной и клеточной биологии Президиума РАН.

NEW METHOD OF GENE EXPRESSION ANALYSIS OF INTRACELLULAR PATHOGENS AND ITS APPLICATION FOR THE STUDY OF *M. TUBERCULOSIS* TRANSCRIPTOME *IN VIVO*

Skvortsov T.A., Ignatov D.V., Apt A.S. *, Azhikina T.L., Sverdlov E.D.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

*Central Institute for Tuberculosis, Moscow

E-mail: timofey.skvortsov@gmail.com

Fax: (495) 330-65-38; tel.: (495) 330-65-47

The aim of the research. Changes in gene expression in response to host defense mechanisms are necessary for the survival and functional activity of pathogenic bacteria. Analyzing these changes is crucial for a better understanding of the pathogenesis of infectious disease and development of effective treatment approaches. Study of pathogen-specific gene expression in the infected host is hampered by difficulties in isolation of bacterial RNA and its separation from the huge excess of host RNA. Developing a universal method to analyze intracellular pathogen transcription profiles and applying it to study *M. tuberculosis* genome-wide expression dynamics in the course of infectious disease progression in two mouse strains, susceptible and resistant to infection, has become the aim of our research.

Materials and methods. In our work we used mice of B6 strain (resistant to *M. tuberculosis* infection) and I/St strain (susceptible to *M. tuberculosis* infection). Total RNA from lungs of mice of both strains was extracted at 4 and 6 weeks after infection with *M. tuberculosis* H37Rv bacteria. Afterwards denaturation and renaturation of excess of bacterial genomic DNA combined with cDNA synthesized from total RNA as a template were conducted, and, as a result, a fraction enriched with bacterial cDNA was extracted. Transcription levels for a number of genes were compared in samples of total cDNA and bacterial cDNA fractions by means of quantitative PCR. After that total sequencing of obtained samples was conducted and acquired data processed statistically and bioinformatically.

Results. The possibility of applying the developed technique for quantitative and qualitative assessment of gene expression was confirmed by means of PCR. As a result of data analysis information about qualitative and quantitative differences in transcription profiles of bacteria from resistant and susceptible to infection mouse strains was obtained. Differences in expression profiles were found for genes belonging to several functional categories, particularly: virulence genes, energy metabolism genes and several other categories.

Conclusion. A new and effective method of studying intracellular parasitic bacteria transcription profiles was developed. High sensitivity and specificity of the method were shown. The set of transcripts acquired using this method preserves both qualitative and quantitative traits of bacterial transcriptome obtained from infected tissues and can be used for the study of pathogen gene expression *in vivo*. Analysis of such sequences, transcribed in a real infection, will allow suggesting new drug targets and infection monitoring techniques in the future.

This work was supported by grants from the RFBR (grant 08-04-01053), the State support of the Leading Scientific Schools (NS-2395.2008.4) and the Program of Presidium of RAS "Molecular and Cell Biology".

ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА МАГНИТНЫХ НОСИТЕЛЯХ

Солдатова Л.С., Бабич О.О., Просеков А.Ю.

ГОУ ВПО Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, Кемерово

E-mail: soldatovals@rambler.ru

Факс: (3842) 74-42-32, тел.: (3842) 73-50-98

Одним из приоритетных направлений современной биотехнологии является изучение ферментов и ферментных систем. Ферменты в качестве биологических катализаторов применяются в различных отраслях промышленности: пищевой, текстильной, фармацевтической, кожевенной, в сельском хозяйстве и медицине. Повсеместное использование энзимов в биотехнологии до последнего времени сдерживалось вследствие ряда причин. В связи с этим актуальной проблемой является продление и увеличение каталитической активности ферментов.

Одним из наиболее перспективных направлений исследований на пути решения указанных проблем является получение гетерогенных биокатализаторов, а именно использование иммобилизованных ферментов, имеющих ряд очевидных преимуществ перед растворимыми энзимами: возможность отделения биокатализатора от реакционной среды, непрерывность проведения технологического процесса с направленным регулированием скорости и выхода реакции, целенаправленное изменение свойств фермента.

В настоящее время достигнуты значительные успехи в области разработки технологий иммобилизованных ферментных препаратов. Известно большое разнообразие органических и неорганических носителей и способов иммобилизации биомолекул на твердой матрице. Однако предлагаемым способом иммобилизации биологических веществ присущи недостатки, главным образом, связанные с использованием дорогостоящих реагентов и многостадийных процессов. В связи с этим целью настоящей работы являлась разработка эффективной нетрудоёмкой технологии иммобилизации биомолекул на инертном носителе для последующего использования в различных областях биотехнологии.

Объектом исследований являлся протеолитический фермент α -химотрипсин, в качестве материала для иммобилизации были выбраны наночастицы магнетита Fe_3O_4 . Выбор инертного носителя обусловлен проявлением у магнитных нанобъектов уникальных физических и химических свойств, а также их высокоразвитой активной поверхностью и высокой сорбционной емкостью. Благодаря своим размерам, сопоставимым с размером клеток и биомолекул, наночастицы способны взаимодействовать с биообъектами, что позволяет разнообразить их практическое применение. Наночастицы, обладающие магнитными свойствами, представляют значительный интерес для биотехнологии, что связано с возможностью управления ими при воздействии внешнего магнитного поля.

Для получения наночастиц магнетита использовался метод Массарта – взаимодействие растворов хлоридов железа (II) и (III) в соотношении 1:2 с добавлением раствора NH_4OH с последующим отделением образующихся частиц Fe_3O_4 с помощью магнитного сепаратора.

С целью иммобилизации исследуемого фермента на частицы магнетита в работе были использованы два способа: стандартный карбодимидный и адсорбционный. Количество иммобилизованного белка оценивалось по методу Дюма, основанному на измерении теплопроводности молекулярного азота, образующегося после сжигания анализируемого образца при температуре около 1000°C в атмосфере кислорода и последующего восстановления всех образующихся оксидов азота. Протеолитическая активность нативного и иммобилизованного ферментов оценивалась в соответствии с требованиями ГОСТ 20264.2-74.

Сравнительная характеристика физического (адсорбционного) и химического (карбодимидного) способов иммобилизации α -химотрипсина на инертной матрице из магнитного нанокompозитного материала показала, что из двух рассмотренных способов активации поверхности наночастиц наиболее эффективна карбодимидная методика. Данный способ позволяет ковалентно присоединять к наночастицам магнетита до 95% изучаемого фермента, в то время как для адсорбционного способа этот показатель составляет 50%. Оптимальными условиями функционирования полученного первым способом препарата являются широкий диапазон pH и температур. Данные, полученные при изучении стабильности исследуемых препаратов во времени, также свидетельствуют о получении наиболее активных и устойчивых иммобилизованных препаратов с применением карбодимидной методики по сравнению с адсорбционной. Установлено, что исследуемый иммобилизованный фермент после пятикратного использования в качестве катализатора сохраняет 79% и 23% протеолитической активности, соответственно, в карбодимидном и адсорбционном методах иммобилизации, что является дополнительным свидетельством эффективности ковалентного взаимодействия химотрипсина с нанокompозитным материалом.

Предлагаемый способ ковалентной иммобилизации (карбодимидный) химотрипсина на магнитном нанокompозитном материале, кроме очевидных преимуществ перед предшественниками (высокая величина удельной активности иммобилизованного ферментного препарата, широкий диапазон pH и температур функционирования, высокая скорость ферментативного процесса, стабильность при хранении, возможность многократного использования без потери каталитической активности), отличается простотой используемых методик и доступностью реагентов.

FEATURES OF RECEPTION OF FERMENTAL PREPARATIONS, IMMOBILIZED ON MAGNETIC CARRIERS

Soldatova L.S., Babich O.O., Prosekov A.J.

GOU VPO the Kemerovo Technology Institute of the Food Industry, Kemerovo

E-mail: soldatovals@rambler.ru

Fax: (3842) 74-42-32; tel.: (3842) 73-50-98

The studying of enzymes and fermental systems is one of basic directions of modern biotechnology. Enzymes as biological catalysts are applied in various industries: food, textile, pharmaceutical, tanning, in agriculture and medicine. Universal use of enzymes in biotechnology is restrained until recently owing to a number of the reasons, basic of which are labour input of branch of enzymes from initial reagents and reaction products, instability of enzymes at storage and at action of various factors, high cost of pure fermental preparations. In this connection an actual problem is prolongation and increase of catalytic activity of enzymes.

One of the most perspective directions of researches on a way of the decision of the specified problems is reception of heterogeneous biocatalysts, namely use of immobilized enzymes having a number of obvious advantages before soluble enzymes: possibility of separation of the biocatalyst from the reactionary environment, a continuity of carrying out of technological process with the directed regulation of speed and a reaction exit, purposeful change of enzyme properties.

Now considerable successes in the field of working out of technologies of immobilized fermental preparations are reached. The big variety of organic and inorganic carriers and ways of biomolecules immobilization on a firm matrix is known. However known ways of immobilization of biological substances have many lacks, mainly, connected with use of expensive reagents and multiphase processes. Thereupon the purpose of the present work was working out of effective not labour-consuming technology of biomolecules immobilization on the inert carrier for the purpose of the subsequent use in various fields of biotechnology.

Object of research was proteolytic enzyme α -chymotrypsin, as a material for immobilization have been chosen nanoparticles Fe_3O_4 . The choice of the inert carrier is caused by display for magnetic nanoobjects unique physical and chemical properties, and also their advanced active surface and high sorption capacity. Thanks to the sizes comparable with the size of cages and biomolecules, nanoparticles are capable to cooperate with bioobjects that allows to diversify their practical application. Nanoparticles, possessing magnetic properties, represent considerable interest for biotechnology that is connected with possibility of management of them at influence of an external magnetic field.

For reception of nanoparticles the method of Massarta – interaction of solutions of chlorides of iron (II) and (III) in the ratio 1:2 with addition of solution NH_4OH with the subsequent branch of formed particles Fe_3O_4 by means of a magnetic separator was used. On purpose for immobilization of investigated enzyme on magnetic particles in work two ways have been used: standard carbodiimide activation procedure and adsorptional way. The quantity of immobilized protein was estimated on the method Duma based on measurement of heat conductivity of molecular nitrogen, the analyzed sample formed after burning at temperature nearby

1000°C in atmosphere of oxygen and the subsequent restoration of all formed nitrogen oxides. Proteolytic activity of free and immobilized enzyme was estimated according to requirements of GOST 20264.2-74.

The comparative characteristic of physical (adsorptional) and chemical (carbodiimide activation procedure) immobilization of α -chymotrypsin on an inert matrix from magnetic nanocompositional material has shown that from two considered ways of activation of a surface nanoparticles the carbodiimide activation procedure is most effective. This way allows to attach covalently to nanoparticles Fe_3O_4 95 % of studied enzyme while for adsorptional way this indicator makes 50%. Optimum operating conditions of the preparation received by the first way are a wide range pH and temperatures. The data received at studying of stability of investigated preparations in time, also testifies to reception of the most active and steady immobilized preparations with application carbodiimide technique in comparison with adsorptional. It is established that investigated immobilized enzyme after fivefold use as the catalyst keeps 79% and 23% proteolytic activity accordingly in carbodiimide and adsorptional methods that is the additional certificate of efficiency of covalent interactions of chymotrypsin with nanocompositional material.

The offered way of covalent immobilization (carbodiimide activation procedure) of chymotrypsin on magnetic nanocompositional material, except obvious advantages before the predecessor (high size of specific activity of immobilized fermental preparation, a wide range pH and temperatures, high speed of enzymatic process, stability at storage, possibility of repeated use without loss of enzymatic activity), differs by simplicity of used techniques and availability of reagents.

СТАРЕНИЕ ВЫЗЫВАЕТ ПОДАВЛЕНИЕ АНГИОГЕННЫХ СВОЙСТВ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Старостина Е.Е., Ефименко А.Ю., Калинина Н.И., Парфенова Е.В., Ткачук В.А.

Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова,
Москва

E-mail: info@fbm.msu.ru

Факс/тел.: (495) 939-24-30

Введение. Среди мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток взрослого организма стромальные клетки жировой ткани (СКЖТ) считаются одними из самых перспективных для применения в клеточной терапии. Было показано, что они обладают способностью стимулировать рост кровеносных сосудов, в том числе путем секреции ангиогенных факторов роста. Однако различные факторы, включая возраст пациентов, могут оказывать влияние на их функциональные свойства. Поэтому целью нашей работы было оценить влияние возрастного фактора на пролиферацию, жизнеспособность и ангиогенную активность СКЖТ.

Материалы и методы. СКЖТ были выделены из жировой ткани мышей линии Balb/c, возраст животных составлял 2 месяца (СКЖТмол, n=9) или 18 месяцев (СКЖТстар, n=9). Клетки культивировали до 2 пассажа. Затем в течение 48 часов их выращивали в условиях 1% (гипоксия) или 20% (нормоксия) содержания кислорода. Пролиферацию клеток оценивали с помощью коммерческого МТТ теста (Invitrogen). Длину теломер определяли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью проточной цитофлуорометрии по связыванию аннексина-V и накоплению 7-аминоактиномицина D. Анализ изменения экспрессии генов проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Ангиогенную активность суммарных продуктов секреции клеток оценивали по влиянию кондиционированной среды (КС) на образование капилляроподобных структур эндотелиальными клетками (HUVEC) на матрикеле *in vitro*.

Результаты. СКЖТ старых животных обладают в 2 раза меньшим пролиферативным потенциалом по сравнению с клетками молодых животных. Длина теломер у клеток старых животных была в 3 раза меньше по сравнению с СКЖТ молодых мышей. Более того, в популяции СКЖТ старых животных доля клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза была в 3 раза больше по сравнению с клетками молодых животных. Содержание мРНК фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), плацентарного фактора роста (PlGF) было статистически значимо больше в СКЖТмол, в то время как уровень фактора роста гепатоцитов (HGF) был выше в СКЖТстар. Гипоксия приводила к выравниванию содержания мРНК HGF в СКЖТмол и СКЖТстар. Экспрессия антиангиогенных факторов эндостатина и тромбоспондина значимо не отличалась в клетках от животных разного возраста и в схожей степени снижалась в гипоксических условиях. Наблюдалось статистически значимое повышение факторов системы

урокиназы (урокиназа, рецептор к урокиназе, металлопротеиназы 2 и 9 типов, ингибитор активатора плазминогена-1) в СКЖТстар по сравнению с СКЖТмол как в нормоксических, так и в гипоксических условиях. Суммарная длина капиллярноподобных структур, образованных HUVEC на матригеле в присутствии КС от СКЖТмол, была статистически значимо больше, чем от СКЖТстар, что свидетельствует о более выраженной секреции ангиогенных факторов клетками молодых животных. В клетках, культивированных в условиях гипоксии, способность стимулировать образование таких структур повышалась в равной степени.

Таким образом, при старении происходит подавление пролиферативной активности и жизнеспособности стромальных клеток жировой ткани, а также продукции ангиогенных факторов этими клетками. Однако стимуляция ангиогенного потенциала клеток под действием гипоксии не зависит от возраста, что указывает на то, что культивирование клеток перед трансплантацией в условиях пониженного содержания кислорода может повышать эффективность клеточной терапии.

AGEING INHIBITS PROLIFERATION, VIABILITY AND ANGIOGENIC POTENTIAL OF ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS

Starostina E.E., Efimenko A.Yu., Kalinina N.I., Parfenova E.V., Tkachuk V.A.

Faculty of Basic Medicine, Moscow State University, Moscow

E-mail: info@fbm.msu.ru

Fax/tel.: (495) 939-24-30

Objective. Among adult multipotent mesenchymal stem cells adipose-derived stromal cells (ADSC) are considered to be one of the most perspective cells for cell therapy. They are able to stimulate the growth of blood vessels, last but not least through secretion of angiogenic growth factors. However, different factors such as the age of patients can affect the functional properties of ADSC. Therefore, we investigated the influence of ageing on proliferation, viability and angiogenic activity of ADSC.

Materials and methods. ADSC were isolated from adipose tissue of young (ADSCyoung, age – 2 months, n=9) and old (ADSCold, age – 18 months, n=9) mice (BalB/c) and expanded with serial passages. Then cells were cultivated for 48 h under 1% (hypoxia) or 20% (normoxia) of oxygen. Proliferation was estimated with commercial MTT test (Invitrogen). Telomere length was measured by realtime PCR. Viability was estimated by flow cytometry as annexin-V binding and 7-AAD accumulation in cells. Gene expression of angiogenesis-related factors was determined by realtime PCR. Angiogenic activity of total cell secretion products was estimated as influence of conditioned medium (CM) from ADSC on capillary-like tube formation by HUVEC on Matrigel *in vitro*.

Results. Proliferation potential and telomere length were less in ADSCold than in ADSCyoung. Amount of cells on different apoptotic stages was higher in ADSCold. Gene expression of VEGF and PlGF was higher in ADSCyoung but expression of HGF was higher in ADSCold. Hypoxia led to the equation of HGF level in ADSCyoung and ADSCold. Expression of antiangiogenic factors (endostatin, thrombospondin) was similar in cells from animals of different age. We noted higher gene expression of urokinase system factors (uPA, uPAR, MMP2, MMP9, PAI-1) in ADSCold compared to ADSCyoung both in standard and hypoxic condition. Summary length of capillary-like tubes was higher in presence of CM from ADSCyoung in comparison to ADSCold. So ADSC from young animals produced more angiogenic factors than ADSC from old animals. Hypoxia raised ability of both ADSCyoung and ADSCold to stimulate tubes formation similarly.

In conclusion proliferation, viability and production of angiogenic factors are inhibited in ADSC from old animals compared to young animals. But it seems that stimulation of ADSC angiogenic potential by hypoxia doesn't depend on age. Therefore culturing ADSC from elder patients in hypoxic conditions before transplantation may increase efficiency of the procedure.

ИЗУЧЕНИЕ ЭНХАНСЕРНОЙ АКТИВНОСТИ ДЛИННЫХ КОНЦЕВЫХ ПОВТОРОВ ЧЕЛОВЕК-СПЕЦИФИЧНЫХ ЭНДОГЕННЫХ РЕТРОВИРУСОВ

Сунцова М.В., Гогвадзе Е.В., Буздин А.А.

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

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

E-mail: suntsova86@mail.ru

Факс: (495) 727-38-63; тел.: (495) 727-38-63

Эндогенные ретровирусы (ЭРВ) и родственные им последовательности формируют около 8% генома человека. Также известно, что они являются постоянным компонентом транскриптома человека. Например, около 50% человек-специфичных ЭРВ обладают промоторной активностью в различных тканях. Основной регуляторный потенциал ЭРВ сосредоточен в их длинных концевых повторах (LTR, от англ. long terminal repeats). Каждый LTR содержит промотор, энхансер и сигнал полиаденилирования, необходимые для транскрипции собственных последовательностей ЭРВ, но они также могут оказывать влияние и на экспрессию генов хозяина. Для исследования энхансерной активности ЭРВ было выбрано шесть локусов, в которых длинные концевые повторы человек-специфичных ЭРВ находились на расстоянии от 1,6 до 4,5 тысяч пар нуклеотидов от точек начала транскрипции известных функциональных генов человека. Для каждого локуса было создано по два типа генно-инженерных конструкций, включающих репортерный ген люциферазы светлячка под транскрипционным контролем исследуемых последовательностей. Первый тип конструкций в положении промотора содержал фрагменты генома между LTR и точкой начала транскрипции исследуемого гена. Второй тип дополнительно включал LTR. Полученными конструкциями были проведены транзиентные трансфекции четырех клеточных линий человека. После трансфекции измеряли уровень активности люциферазы в клеточных лизатах. Таким образом, в опыте сравнивался уровень экспрессии репортерного гена при трансфекции конструкциями, содержащими и не содержащими LTR. Для регуляторных областей генов *PRODH* (proline dehydrogenase 1), *SOCS4* (suppressor of cytokine signaling 4) и *KIAA1919* (sodium-dependent glucose transporter 1) в присутствии LTR было отмечено значительное повышение экспрессии репортерного гена в линии клеток тератокарциномы человека. Это означает, что для этих локусов LTR проявляют энхансерную активность и могут оказывать влияние на экспрессию соседних генов. Для проверки этой гипотезы был измерен уровень экспрессии вышеупомянутых генов в тех же самых клеточных линиях. Корреляция между уровнями экспрессии репортерного гена и "эндогенной" копии соседнего с LTR гена была отмечена только для гена *PRODH*: наблюдалась повышенная экспрессия в линии тератокарциномы и относительно низкая – в остальных клеточных линиях. Несовпадение результатов по транскрипции *in vitro* и *in vivo* для остальных генов может быть связано с вкладом метилирования в энхансерную активность LTR. В настоящее время эта гипотеза проверяется в нашей лаборатории.

ANALYSIS OF ENHANCER ACTIVITY OF HUMAN-SPECIFIC ENDOGENOUS RETROVIRAL LONG TERMINAL REPEATS

Suntsova M.V., Gogvadze E.V., Buzdin A.A.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: suntsova86@mail.ru

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

Endogenous retroviruses (ERVs) and related sequences shape ~8% of human genome. They are also a permanent component of human transcriptome. For example, at least 50% of human specific ERVs demonstrate promoter activity in different tissues. The major regulatory potential of the ERVs is concentrated in this long terminal repeats (LTRs). Each LTR harbors promoter, enhancer and polyadenylation signal, which are essential for transcription of retroviral own sequences, but they may also exert influence on host gene expression. In order to analyze natural enhancer activity of the LTRs, we performed a genome-wide bioinformatic screening and identified six loci where LTRs were located close (<5 kb) to known functional human gene transcriptional start sites (distances 1,6-4,5 kb). For each locus we designed two types of genetic constructs including firefly luciferase as a reporter gene under transcriptional control of the investigated DNA sequences. Constructs of the first type had only genomic fragments between the LTR and gene transcriptional start site, whereas second type constructs had longer genomic fragments including also the LTR sequences themselves. The obtained constructs were used for transient transfections of four human cell lines. Following transfections, luciferase activity in cell lysates was measured. In such a way we have experimentally compared reporter gene expression for the constructs with/without the LTRs. For the regulatory regions of three human genes: *PRODH* (proline dehydrogenase 1), *SOCS4* (suppressor of cytokine signaling 4) and *KIAA1919* (sodium-dependent glucose transporter 1), we detected significant increase of reporter gene expression in human teratocarcinoma cell lines. Therefore, for these loci the LTRs demonstrate enhancer activity and thereby may influence host gene expression. To check this hypothesis, we measured transcriptional levels of the above genes in the same cell lines. We observed correlation between the expression of the reporter gene and transcription of the "endogenous" copy of the LTR-adjacent gene only for the single human gene *PRODH*. There was a relatively high expression in teratocarcinoma cell lines and low or no expression – in the other cell lines. Disagreement between the results on transcription *in vitro* and *in vivo* for other genes is most probably due to epigenetic regulation of the LTR enhancer activity on the level of methylation. At present, this hypothesis is investigated in our laboratory.

СОВРЕМЕННОЕ КЛОНИРОВАНИЕ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ И БИОЭТИКА

Суханова Ю.А.

Гимназия №1306, Москва

E-mail: administration@sch1306.ru

Факс: (495) 932-99-58; тел.: (495) 932-99-58

В работе дан анализ научно-технологических, медицинских и этических проблем клонирования, сформулированы цели и задачи клонирования. Приведены результаты социологического опроса учащихся старших классов по теме "Клонирование живых организмов".

Современное клонирование – это копирование клеток, генов, антител, а также многоклеточных организмов в лабораторных условиях.

Какова же практическая польза клонирования? Клонирование животных, растений и бактерий с применением методов генной инженерии предполагает не столько воспроизведение старых, сколько создание новых организмов, обладающих заранее заданными свойствами.

Использование технологии клонирования открывает небывалую ранее, уникальную возможность решения различных теоретических и прикладных задач, стоящих перед биомедициной и сельским хозяйством. Благодаря технологии клонирования предполагается появление ускоренной генетической селекции животных и растений с исключительными производственными показателями. Клонирование микроорганизмов в сочетании с трансгенозом открывает дополнительные возможности для производства ценных биологически активных белков для лечения различных заболеваний человека.

В работе отдельно обсуждается проблема целесообразности и правомерности клонирования человека. В связи с этим рассмотрены терапевтическое и репродуктивное клонирование человека.

Делается вывод о том, что разработка методов получения большого количества стволовых клеток при терапевтическом клонировании даст возможность корректировать и лечить многие до сих пор неизлечимые заболевания, такие как диабет, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, болезни миокарда, почек, печени, заболевания костей, крови и другие. В то же время вопрос целесообразности репродуктивного клонирования человека остается в настоящее время открытым.

Для того чтобы выяснить, насколько проинформированы старшеклассники по вопросам клонирования, был проведен опрос среди 64 учащихся школы №1306. Получены следующие результаты:

1) о клонировании слышали все участники опроса. При этом учащиеся указывали разные источники информации: 57% узнали о клонировании из средств массовой информации, 24% – из фильмов и фантастики и только 19% – из научной литературы;

2) к клонированию животных, растений и микроорганизмов большинство относятся положительно – 67%, отрицательно – 9%, воздержались – 24% учащихся;

3) к клонированию человека ученики относятся по-разному, но большинство (48%) с опасением относится к проведению таких опытов. За возможность попытки клонирования человека высказались 24%, воздержались 28% учащихся.

В результате анализа литературы, посвященной современному клонированию, и проведенного социологического опроса можно сделать следующие выводы:

1) успехи в области клонирования открывают широкие перспективы для практического применения клонированных микроорганизмов, растений и животных;

2) методически и технически клонирование млекопитающих и человека на сегодняшний день разработано недостаточно;

3) этическая сторона проблемы клонирования человека в нашем обществе еще не решена;

4) школьники слабо информированы по вопросу клонирования, но, в основном, их отношение к нему позитивное. К клонированию человека подавляющее большинство учащихся относятся отрицательно.

Считаю, что отношение к клонированию в обществе должно базироваться на глубоких современных научных знаниях, поэтому основы научной информации по данной проблеме должны закладываться у человека уже в школе.

MODERN CLONING OF LIVING ORGANISMS AND BIOETHICS

Suhanova Yu.A.

Gymnasium 1306

E-mail: administration@sch1306.ru

Fax: (495) 932-99-58; Tel.: (495) 932-99-58

The present work deals with analysis of cloning-associated scientific and technological, medical and ethical issues and determines objectives goals and tasks of cloning. It also provides results of the sociological interview conducted among senior school pupils on the subject "Living Organisms' Cloning".

Modern cloning is *in vitro* copying cells, genes, antibodies as well as multicellular organisms.

What is the practical use of cloning? Cloning of animals, plants and bacteria with application of genetic engineering methods is targeted mainly at reproduction of old but at creation of new organisms with pre-selected characteristics.

Application of the cloning technology opens a revolutionary and unique possibility to solve various theoretical and applied tasks that biomedicine and agriculture are currently facing. Development of the accelerated genetic selection of animals and plants with exceptional performance properties is intended owing to the cloning technology. Combination of microorganisms cloning along with transgenesis opens additional possibilities for production of high-value biologically active proteins which can be used for treatment of various human diseases.

Special attention is given to practical use and legal issues of human cloning. Due to this work addresses therapeutic and reproductive human cloning.

The conclusion drawn from the data used in the work states that development of generation methods of a large amount of stem cells for therapeutic cloning will give a possibility to improve and treat many diseases considered irremediable, such as diabetes, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, diseases affecting myocardium, liver, kidneys, bones, blood and others. At the same time, the issue of practicability of human cloning remains unresolved.

In order to assess the information awareness of senior school pupils on cloning issues an interview was conducted among 64 pupils of School 1306, the obtained results included the following ones:

1. All participants of the interview have heard about cloning. However pupils specified different information sources: 57% have heard about cloning from mass media sources, 24% have obtained information from movies and fantasy and only 19% have learnt about cloning from scientific literature.

2. Positive attitude to cloning of animals, plants and microorganisms was registered in 67 % of cases, 9% declared their negative attitude to the issue and 24% of respondents abstained from voting.

3. Attitude to human cloning of senior school pupils is different but in majority of them (48%) experiments in this field provoke great concern. 24% of pupils spoke in favour of attempts to clone a human being whereas 28% of respondents gave no answers.

The review of literature devoted to modern cloning and results of the sociological interview allow making the following conclusions:

1. Success in the cloning sphere opens promising prospects for practical use of cloning of microorganisms, plants and animals.

2. Methods and techniques of mammals and human beings cloning are not sufficiently developed yet.

3. The ethical side of the human cloning challenge in our society is not resolved so far.

4. Senior school pupils have insufficient information on cloning but, in the majority of cases, their attitude to it is positive. Human cloning provokes negative reaction of the majority of pupils.

In my opinion, the attitude to cloning in the society must be based on deep modern scientific knowledge, that is why awareness of scientific information on this issue must be provided at school.

РАЗВИТИЕ ПОДХОДА К ПОЛУЧЕНИЮ РЕКОМБИНАНТНОГО БАКТЕРИОРОДОПСИНА В *E. COLI* НА ОСНОВЕ ГИБРИДА С МАЛЬТОЗ-СВЯЗЫВАЮЩИМ БЕЛКОМ

Тазвей А.И., Некрасова О.В.

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

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

E-mail: genchem@mx.ibch.ru

Факс: (495) 335-71-03; тел.: (495) 330-66-38

Бактериородопсин (BR, bacteriorhodopsin) – светозависимый протонный насос галофильных бактерий, представляет собой один из наиболее изученных мембранных белков. BR состоит из апобелка – бактериородопсина (BO, bacterio-opsin), и хромофорной группы – ретиналя. Пионерскими работами по установлению первичной структуры бактериородопсина, топологии белка в мембране были исследования по программе "Родопсин" под руководством Ю.А. Овчинникова. Уникальные фотохромные свойства BR создают возможность его технического применения, в частности в молекулярной оптоэлектронике, а структурные особенности молекулы – высокая термо- и химическая устойчивость, способность к обратимой денатурации – делают данный белок удобной моделью для изучения фолдинга, стабильности и функционирования мембранных белков.

Клетки *Escherichia coli* являются наиболее распространённой системой гетерологической экспрессии BR и его мутантов, однако эффективность получения BR в виде ренатурированного функционально активного белка остается невысокой. Привлекательной системой суперэкспрессии BR является гибрид BO с мальтоз-связывающим белком (MBP, maltose-binding protein), уровень биосинтеза которого составляет 170 мг/л культуры (Chen, G.-Q. and Gouaux, J. 1996. *Protein Science* 5:456-467). Молекулы MBP-BO способны образовывать водорастворимые олигомеры – т.н. "белковые мицеллы", в которых гидрофобные последовательности BO окружены гидрофильными глобулами белка MBP. Проблема состоит в том, что в таких мицеллах сайтспецифическое расщепление становится недоступным для протеиназ, поэтому протеолиз гибридного белка проводили в присутствии небольших концентраций детергента. Низкая эффективность протеолиза привела к снижению выхода целевого белка (около 20 мг/л).

Целью нашей работы явилось развитие и оптимизация метода получения рекомбинантного бактериородопсина путем экспрессии этого белка в *E. coli* в виде гибрида с MBP.

На основе вектора рЕТ28а (фирма Novagen) были сконструированы две плазмиды рMBP-BO и рSP-MBP-BO, кодирующие гибриды MBP-BO и SP-MBP-BO, в которых последовательности MBP и бактериородопсина разделены сайтом расщепления тромбина. Гибрид SP-MBP-BO содержал дополнительно N-концевой сигнальный пептид (SP) для транслокации MBP в периплазму. Подобная конструкция должна обеспечивать эффективное встраивание BO в цитоплазматическую мембрану. Оба гибрида содержали также C-концевой HisX6 таг для аффинной детекции и очистки.

Оценка эффективности экспрессии и выделения BO основывалась на результатах следующих стадий: 1) культивирования гибридов в клетках *E. coli* BL21(DE3); 2) солиubilизации гибридов детергентами; 3) проведения металлоаффинной хроматографии; 4) гидролиза гибридных белков тромбином; 5) очистки целевого белка – бактериородопсина.

Обе плазмиды обеспечивали значительный уровень биосинтеза гибридов – около 200 и 220 мг/л MBP-BO и SP-MBP-BO, соответственно. Гибриды практически полностью экстрагировались из нерастворимой фракции клеток в таких детергентах, как лаурилсаркозин – 0.5%, додецилсульфат натрия – 0.5%, и реагент CellLytic B (фирма Sigma), которые применяются обычно при выделении мембранных белков. Несколько ниже оказалась эффективность растворения гибридов в 1%-ном Тритоне X-100 (MBP-BO – около 80%, SP-MBP-BO – около 40%). Наилучшая сорбция на колонке Ni-NTA агарозы (фирма Qiagen) для обоих гибридов происходила в растворе 0.25% лаурилсаркозина (до 50% от суммарного целевого белка в случае MBP-BO и более 70% – SP-MBP-BO). Основные различия между гибридами проявились при изучении специфичности расщепления тромбином в разбавленных растворах различных детергентов. В случае MBP-BO гидролиз происходил преимущественно по сайту, расположенному в пределах последовательности MBP, что значительно снижало конечный выход целевого продукта. Гидролиз SP-MBP-BO протекал специфично и приводил к количественному выходу BO в реакции. В этом случае была отработана процедура одностадийной очистки BO, включающая расщепление гибрида SP-MBP-BO тромбином на колонке Ni-NTA агарозы.

Таким образом, несмотря на высокий уровень экспрессии обоих гибридов, потери при посадке на аффинную колонку и при гидролизе тромбином гибрида MBP-BO определили различия в выходе очищенного BO: 25 мг/л при экспрессии в виде MBP-BO и 42 мг/л – SP-MBP-BO. С помощью электрофореза в ПААГ и аналитической гель-фильтрации было показано, что чистота препаратов BO составляла около 90% (при выделении из MBP-BO) и более 95% (в случае SP-MBP-BO); в обоих препаратах BO присутствовал в виде мономера. Отличия в эффективности процедур выделения гибридов связаны, вероятно, с различной пространственной укладкой гибридных молекул и требуют дальнейшего изучения.

Выводы: 1. Сконструированы две экспрессионные плазмиды на основе рЕТ28а, обеспечивающие суперэкспрессию в *E. coli* гибридов бактериородопсина с мальтоз-связывающим белком (MBP-BO и SP-MBP-BO).

2. Для обоих гибридов разработаны процедуры выделения целевого белка, бактериородопсина, из клеток *E. coli*.

3. Создана оригинальная конструкция гибридного белка SP-MBP-BO, включающая последовательность N-концевого сигнального пептида, которая обеспечила существенное повышение эффективности выделения рекомбинантного бактериородопсина из клеток *E. coli* и высокий выход целевого продукта, бактериородопсина, – 42 мг/л культуры.

IMPROVED PRODUCTION OF RECOMBINANT BACTERIORHODOPSIN IN *E. COLI* AS A FUSION TO MALTOSE-BINDING PROTEIN

Tagvey A.I., Nekrasova O.V.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: genchem@mx.ibch.ru

Fax: (495) 335-71-03; tel.: (495) 330-66-38

Bacteriorhodopsin (BR), a light-driven proton pump from halophilic bacterium, is one of the most studied membrane proteins. BR consists of an apo-protein, bacterio-opsin (BO), and a chromophore, retinal. Basic research on the primary structure of bacteriorhodopsin and topology of the protein in the cellular membrane was carried out within the program "Rhodopsin" headed by Yu.A. Ovchinnikov. Unique photochromic properties of BR provide a possibility of its technical applications, particularly in molecular optoelectronics, and the structural features of a molecule - high thermal and chemical resistance, ability for reversible denaturation, make this protein a convenient model for studying folding, stability and functioning of membrane proteins.

Escherichia coli is the most widespread system for heterologous expression of BR and its mutants, however, efficiency of production of BR in the form of renatured functionally active protein remains low. Attractive overexpression system for BR was developed on the basis of maltose-binding protein (MBP) with the level of biosynthesis of hybrid MBP-BO up to 170 mg/l of culture (Chen, G.-Q. and Gouaux, J. 1996. *Protein Science* 5:456-467). MBP-BO formed water-soluble oligomers – so-called "protein micelles", in which hydrophobic moiety of hybrid molecules comprising BO was surrounded by hydrophilic globules of MBP. Specific cleavage sites became inaccessible for protease in such micelles, and thus, hydrolysis of a hybrid protein was carried out in the presence of low concentrations of detergents. Inefficient proteolysis resulted in the decrease of the overall yield of the target protein (about 20 mg/l).

The aim of our work was to develop and optimize a method for production of recombinant bacteriorhodopsin by expression of this protein in *E. coli* as a hybrid with MBP.

On the basis of a vector pET28a (Novagen), we constructed two plasmids, pMBP-BO and pSP-MBP-BO, encoding hybrid proteins MBP-BO and pSP-MBP-BO, respectively, in which the sequences of MBP and bacterio-opsin were separated by a thrombin cleavage site. The hybrid SP-MBP-BO contained an additional N-terminal signal peptide (SP) for the translocation of MBP in a periplasm. The design of this hybrid should provide effective insertion of BO into cytoplasmic membrane. Both hybrids contained C-terminal HisX6 affinity tag.

Efficiency of expression and purification of BO was estimated basing on the data of the following stages: 1) cultivation of *E. coli* BL21 (DE3) transformed with plasmids pMBP-BO and pSP-MBP-BO; 2) solubilization of hybrid proteins with detergents; 3) metal-affinity chromatography of hybrid proteins; 4) hydrolysis of hybrids with thrombin; 5) purification of a target protein, BO.

Both plasmids showed a considerable level of biosynthesis of the hybrids – about 200 and 220 mg/l for the MBP-BO and SP-MBP-BO, respectively. Hybrids were almost completely extracted from insoluble fraction of the cell with solutions of such detergents, as 0.5% sodium *N*-lauroylsarcosine (Sarkosyl), 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), and CelLytic B (Sigma reagent), which are commonly used for isolation of membrane proteins. Efficiency of dissolving of the hybrids with 1% Triton X-100 was somewhat lower (about 80% for the MBP-BO, and about 40% in the case of SP-MBP-BO). For both hybrids, the optimal binding to a Ni-NTA agarose (Qiagen) was achieved in 0.25% Sarkosyl (up to 50% for MBP-BO and more than 70% for SP-MBP-BO). The main differences between hybrids were shown at the stage of thrombin cleavage in the diluted solutions of detergents. Thrombin cut MBP-BO mainly at the site located within the sequence of the carrier protein, thus, poor selectivity reduced the yield of a target product. Hydrolysis of SP-MBP-BO was specific and led to a quantitative yield of BO in the reaction. For this hybrid, one-stage procedure for purification of BO including thrombin hydrolysis of agarose-bound SP-MBP-BO has been worked out.

Thus, despite a high level of expression of both hybrids, low efficiency of binding of MBP-BO to a Ni-NTA agarose and subsequent non-specific thrombin hydrolysis of this hybrid resulted in different yields of purified BO: 25 mg/l in the case of MBP-BO and 42 mg/l in the case of SP-MBP-BO. Using SDS-PAGE and analytical gel filtration, we showed that purity of BO preparations were approximately 90% for MBP-BO and more than 95% for SP-MBP-BO. In both preparations BO was present in the form of a monomer. Difference in efficiency of purification procedures between MBP-BO and SP-MBP-BO were probably due to different spatial structure of these hybrid molecules, and thus, require further study.

Conclusions: 1. On the basis of vector pET28a two plasmids were constructed, which determined overexpression in *E. coli* of bacterio-opsin as a hybrid with maltose-binding protein (MBP-BO and SP-MBP-BO).

2. For both hybrids, MBP-BO and SP-MBP-BO, procedures for effective isolation and purification of bacterio-opsin from *E. coli* cells were developed.

3. Constructing of original recombinant protein SP-MBP-BO, which included an N-terminal signal sequence resulted in a significant increase in the efficiency of isolation of bacterio-opsin from *E. coli* cells and provided a high level yield of bacterio-opsin – 42 mg/l of culture.

БИОПРЕПАРАТ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СЕМЕННОГО БЕЗВИРУСНОГО КАРТОФЕЛЯ

Тазетдинова Д.И., Алимова Ф.К.

Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина,
Казань

E-mail: didinka@rambler.ru

Факс: (843) 238-71-21; тел.: (843) 231-52-47

Картофель в России – это один из важнейших продуктов питания, потребление которого в последние годы существенно возросло. Увеличение производства семенного материала возможно только при соблюдении главного требования формирующегося отечественного рынка – повышения качества семян. Повышенные требования предъявляются к элитному и, особенно, к исходному материалу. Он должен в полной мере соответствовать требованиям государственных стандартов для оздоровленного семенного картофеля. Картофель – культура, восприимчивая к возбудителям грибковых, бактериальных и вирусных болезней. Возбудители подавляющего большинства болезней передаются с посадочным материалом. При посадке микрорастений в грунт для получения микроклубней важно, чтобы растение было хорошо развитым, с сильной корневой системой. Слабое растение не сможет противостоять болезням и погибнет. Это приводит к увеличению себестоимости семенного материала. Для решения проблемы в новых экономических условиях необходимы новые методические и технологические подходы в вопросах воспроизводства оздоровленного семенного материала, его размножения в элитном семеноводстве.

Широкое и успешное использование для биологической защиты растений против грибковых возбудителей болезней получили грибы рода *Trichoderma*, встречающиеся во всех типах почв. При исследовании биологии этих микромицетов, в первую очередь, акцентируют внимание на их антагонистической активности в отношении фитопатогенных грибов. Однако, они продуцируют и фитогормоны, которые поступают в растительный организм, приводя к более активному его развитию. Ранее нами и другими исследователями был показан органотропный эффект метаболитов грибов рода *Trichoderma* на злаковых. Однако, не было данных по влиянию на микрорастения безвирусного картофеля.

Целью работы явилось исследование свойств биопрепарата на основе *Trichoderma* для культивирования растений семенного безвирусного картофеля.

Для исследования выбрано четыре сорта картофеля: Розара, Фелокс, Невский, Скарлет.

При оценке новых препаратов важный показатель – определение их фитокомпетентности (отсутствие фитотоксичности). Фитотоксичность изолятов *Trichoderma* оценена по воздействию культуральной жидкости микромицетов на микрорастения безвирусного семенного картофеля (МБСК). Было выбрано четыре источника углерода в составе картофельно-глюкозной среды для культивирования *Trichoderma*: сахароза, маннит, глицерин, глюкоза.

В результате исследований показано, что изученные изоляты не обладали фитотоксичностью, отмечены сортоспецифичность и органотропное действие. В качестве стимуляторов роста картофеля отобраны три штамма, которые стимулировали рост корней и не стимулировали рост стебля.

Для внесения препарата в грунт нами были исследованы генотоксичность и антагонистическая активность отобранных штаммов *Trichoderma* к предварительно выделенным из клубней патогенам картофеля (возбудители альтернариоза *Alternaria solani* и фузариоза *Fusarium spp.*).

На основании полученных данных был отобран штамм *T. asperellum*, проявивший наибольшую антагонистическую активность и стимулирование корневой зоны растений, для внесения в почву, где выращивался картофель сорта Розара.

Интродукция отобранного штамма *T. asperellum* в тепличный грунт позволила снизить численность и частоту встречаемости потенциально опасных патогенных и токсинообразующих микроорганизмов и повысить урожайность микроклубней безвирусного семенного картофеля сорта Розара на 11%.

BIOPREPARATION FOR CULTIVATION OF SEED VIRALLESS POTATO

Tazetdinova D.I., Alimova F.K.

V.I. Ulyanov-Lenin Kazan State University, Kazan

E-mail: didinka@rambler.ru

Fax: (843) 238-71-21; tel.: (843) 231-52-47

Potato in Russia is one of the most important foodstuffs. Its consumption increased in the last years. Augmentation of production of seed material is possible only under the observance of general requirements of forming domestic market – increasing of seeds quality. There are the highest requirements for elite, especially, for input material. It has to satisfy the Government standard requirements for improved seed potato. Potato is very sensitive for causative agent of fungal, bacterial and viral diseases. Pathogens of biggest part of diseases are transferred with a planting material. During microplants transplanting for getting microtubers it's important to have a plant with good, strong and healthy root system. Weak plant couldn't resist for diseases and will be lost. It will lead to gain of seed material prime cost. In new economical conditions for solution of this problem new methodological and technological approaches are needed to reproduce a healthier seed material, to multiply it in elite seedage.

Soil fungi from genera of *Trichoderma* are wide and successfully used in biological defense of plants against fungal diseases causative agents. The main attention in investigation of biology of these micromycetes is for their fungal phytopathogen antagonistic activity. But they produce phytohormones leading for active plant growth as well. Earlier we and another authors showed organotropic effect of *Trichoderma* metabolites on cereals. There still were not data about an impact on microplants of viralless potato.

The aim of this research was an investigation of properties of biopreparation, based on *Trichoderma*, for cultivation of seed viralless potato plants.

We selected four potato sorts: Rosara, Felix, Nevskii, Scarlet.

For merit rating of new preparations their phytocompetence (phytotoxicity lacking) is critical. Phytotoxicity was rated by impact of micromycetes cultural liquid on seed viralless potato microplants (SVPM). We selected four carbon sources for potato glucose medium for cultivation of *Trichoderma*: sucrose, mannitol, glycerine, glucose.

It was shown that isolates didn't have the phytotoxicity. There was sort-specificity and organotropic effect. Three strains were selected as potato growth stimulators. They stimulated roots growth and didn't stimulate stalks growth.

For purpose of the preparation applying in soil, we investigated gene toxicity and antagonistic activity of selected *Trichoderma* strains against preliminary isolated from tuber potato pathogens (*Alternaria solani* and *Fusarium spp.*)

According to received results we selected the strain *T. asperellum* with the highest antagonistic activity and stimulation of plant root zone.

Its introduction in hothouse soil enabled to reduce the number and frequency of occurrence of potential dangerous pathogen and toxin producing microorganisms and also to raise crop yield of microtubers of viralless seed potato Rosara on 11%.

НЕСИММЕТРИЧНЫЕ АЛЬДЕГИДНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ГОССИПОЛА: СИНТЕЗ, СТРУКТУРА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Тилибаев К.З., Юлдашев А.М., Ибрагимов Б.Т.

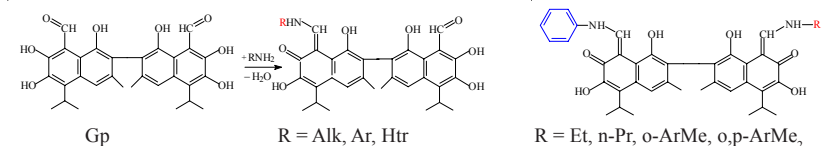
Институт биоорганической химии им. академика А.С. Садыкова, Ташкент, Узбекистан

E-mail: tilyabaevzaid@mail.ru

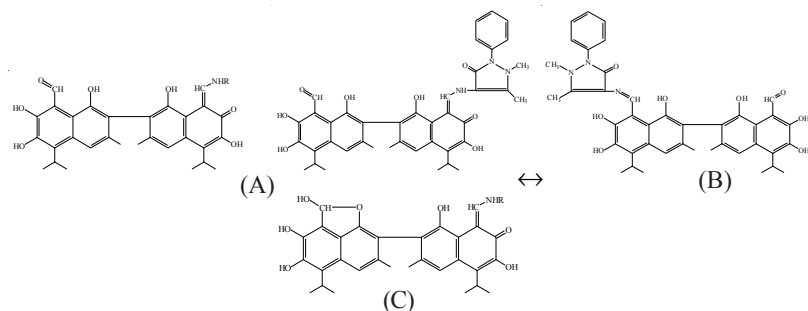
Факс: (99871) 262-70-63, тел.: (99871) 260-37-58

Госсипол (Gr) – жёлтый пигмент главной сельхозкультуры Узбекистана – хлопчатника, комплексное изучение которого было начато акад. А.С. Садыковым, долгое время рассматривался как токсичный отход масложировой промышленности. Для устранения токсичности Gr проделана большая работа по синтезу его симметричных производных, в частности, по -СНО группам, что позволило создать ряд лекарственных средств с интерферониндуцирующими, противовирусными и иммуностропными свойствами. Сведения о несимметричных альдегидных производных Gr носят отрывочный характер, их биологическая активность практически не изучалась, что и стало темой настоящего исследования.

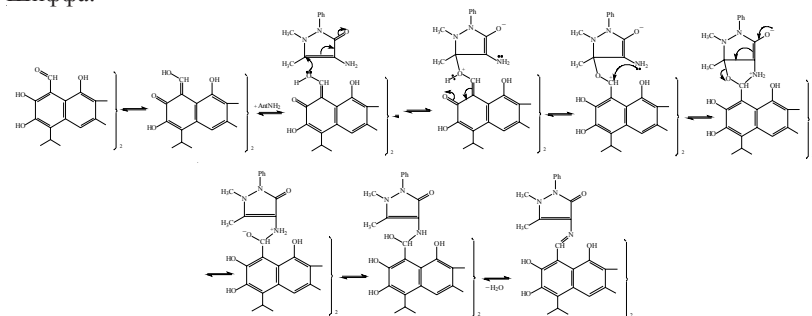
Синтезированы моноальдегидные производные Gr с алкил-, арил-, гетериламинами и барбитуровой кислотой. Для синтеза несимметричных производных Gr с летучими аминами использован твёрдофазный метод, основанный на хемосорбции амина кристаллическим полиморфом Gr - P3, в каналах которого -СНО группа одной половины молекулы спрятана в матрице кристалла, а другая, выходящая к стенке канала, – доступна для реакции с амином. Синтез несимметричных производных Gr с другими аминами осуществлен гомофазным методом с применением технологии высокого разбавления для предотвращения вступления в реакцию обеих -СНО групп Gr.



На основе моноанилинопроизводного Gr по его свободной -СНО группе синтезированы несимметричные диаминопроизводные Gr. Строение всех синтезированных соединений подтверждено УФ-, ИК-, ПМР-спектроскопией и РСА. Установлено, что несимметричные производные Gr с аминами (точнее, их замещённая часть) находятся, преимущественно, в енаминной таутомерной форме (А) в растворах и твёрдых образцах. У моноальдегидного производного Gr с 4-аминоантипирином наблюдается имин-енаминное таутомерное равновесие (В), смещение которого зависит от растворителя, незамещённая альдегидная часть молекулы сохраняется в альдегидной форме, и только в DMSO-d₆ наблюдается её переход в лактольную форму (С), как и в случае с Gr.



Исследование динамики реакции Gr с 4-аминоантипирином в CDCl_3 методом ПМР-спектроскопии позволило предложить новую схему их взаимодействия, основанную на винилгии 4-аминоантипирина и нуклеофильном присоединении к нему нафтаконкарбинольной таутомерной формы Gr с последующим переходом в аминаль и образованием основания Шиффа:



Изучение "острой" токсичности, цитотоксичности, антигрибковой, антирадикальной и мембранотропной активности Gr и его моно- и бис-модификаций показало, что несимметричные производные обладают большей активностью, чем их симметричные аналоги, что обусловлено наличием свободной -CHO-группы. Моноаминогоссипол, нетоксичный для мышей ($\text{LD}_{50} = 1500$ мг/кг), в концентрации 3 мг/мл вызывал у них гибель 50% клеток меланомы. На способ его синтеза получено положительное решение о выдаче патента РУз.

Изложенные в настоящей работе результаты по несимметричным основаниям Шиффа Gr создают перспективы для дальнейшей работы и находятся на стадии выявления тех возможностей, которые открываются для их практического применения.

UNSYMMETRICAL ALDEHYDE DERIVATIVES OF GOSSYPOL: SYNTHESIS, STRUCTURE AND BIOLOGICAL ACTIVITY

Tilyabaev K.Z., Yuldashev A.M., Ibragimov B.T.

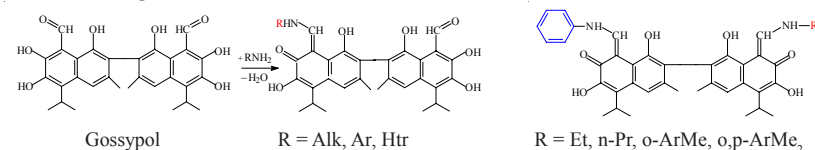
A.S. Sadykov Institute of Bioorganic Chemistry, Tashkent, Uzbekistan

E-mail: tilyabaevzaid@mail.ru

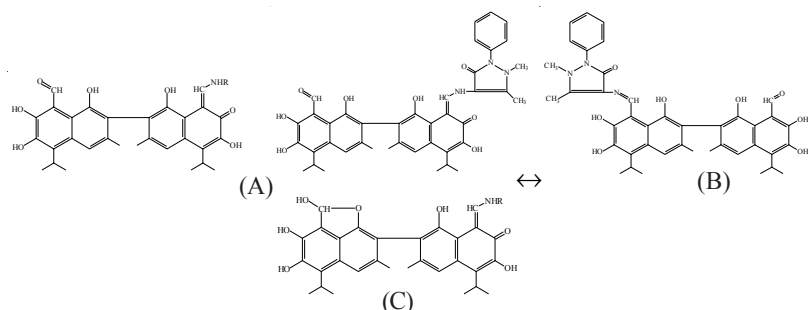
Fax: (99871) 262-70-63, tel.: (99871) 260-37-58

Cotton is the main industrial crop of Uzbekistan and its integrated study started by academician A.S. Sadykov. Gossypol – a yellow pigment of cotton plant, has been considered for a long period of time as a toxic residue of cottonseed oil industry. In order to reduce its toxicity much work on modification of its structure, in particular, on synthesis of its symmetrical aldehyde derivatives has been done, and by using these derivatives as starting materials some effective interferon inducing, antiviral and immunotropic medicines have been created. There is scanty information about unsymmetrical aldehyde derivatives of gossypol and in addition to this fact their biological activity is almost unstudied. So, it became a target of our investigation.

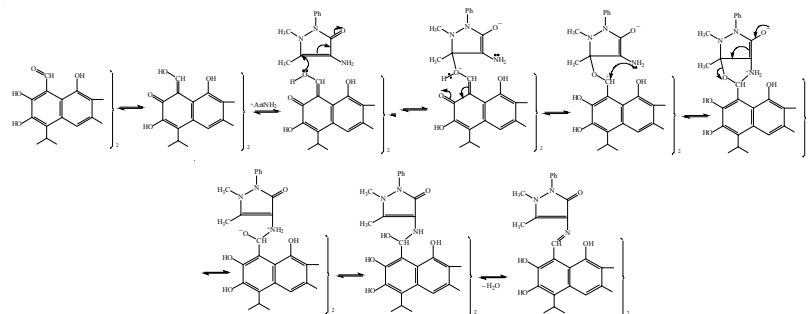
Monoaldehyde derivatives of gossypol with alkyl-, aryl-, heterocyclic amines and barbituric acid have been synthesized. In order to synthesize unsymmetrical gossypol derivatives with volatile amines solid-phase reaction has been used. This method is based on chemisorption of amine vapors by P3 gossypol crystalline polymorph that forms channels where one -CHO group of the molecule is hidden by the crystal matrix, and another one, coming out of channel wall, is available for the reaction with amine. Synthesis of unsymmetrical gossypol derivatives with non-volatile amines has been conducted by using homogeneous reaction with an application of high dilution technique to prevent both -CHO groups of gossypol from reacting with amine.



On base of gossypol mono-aniline derivative by modifying its free -CHO group unsymmetrical gossypol diaminoderivatives have been synthesized. The structures of all synthesized compounds have been verified by UV-, IR-, ¹H NMR-spectroscopy and X-ray diffraction method. It has been established that asymmetrical gossypol aminoderivatives (to put it more precisely, their amino-substituted parts) exist predominantly as enamine tautomer (A) in solutions and in solid state (crystals). For monoaldehyde derivative of gossypol with 4-аминоантипирином equilibrium between imine and enamine tautomers (B) exists and its shift is solvent dependent. Non-reacted aldehyde part of the molecule mostly exists as aldehyde tautomer and only in DMSO-d₆ it turns to a lactol form (C), which is also typical for gossypol itself.



The investigation of dynamics of reaction between gossypol and 4-aminoantipyrine in CDCl_3 by ^1H NMR-spectroscopy method allowed us to suggest a new scheme of their interaction based on vinylogy of 4-aminoantipyrine and nucleophilic addition of ketone tautomer of gossypol to 4-aminoantipyrine with the following transition to carbinol and Schiff base formation:



Comparative study of acute toxicity, cytotoxicity, antifungal, antiradical and membranotropic activities of gossypol and its mono- and bis-aldehyde derivatives demonstrated, that asymmetrical gossypol derivatives are more active than their symmetrical analogs, which can be explained by presence of free -CHO group. Monoaminogossypol, non-toxic for white mice ($\text{LD}_{50} = 1500 \mu\text{g}/\text{kg}$), in concentration of $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ caused death of 50% mice melanoma cells. For the method of its synthesis we got a positive decision on patent of RUz.

The results on asymmetrical gossypol Schiff bases presented create a good basis for further exploration and now they are on the stage of revealing opportunities that lead them to direct practical application.

БАЗА ДАННЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ УГЛЕВОДОВ

Тоукач Ф.В.

Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва

E-mail: tou@server.ioc.ac.ru

Факс: (499) 135-53-28, тел.: (499) 137-61-48

Углеводы являются одним из важнейших компонентов клеточной стенки бактерий и отвечают за иммуноспецифичность штаммов, передачу сигналов и межклеточные взаимодействия. В XXI веке наука об углеводах – гликомика – активно развивается, что связано с ее возрастающим медицинско-прикладным значением. В биохимических и иммунологических исследованиях трудно переоценить роль доступности информации по бактериальным углеводам для научного сообщества. Тем не менее, в отличие от других дисциплин, изучающих живые системы на молекулярном уровне, гликомика практически не использует преимущества, предоставляемые информационными технологиями. Компьютерные инструменты гликомики и универсальные стандарты описания данных находятся в процессе становления. Существующие углеводные базы данных сфокусированы на частных свойствах, используют несовместимые друг с другом форматы, не обладают полным покрытием и, по результатам нашего исследования, полны ошибок.

База данных бактериальных углеводов (Bacterial Carbohydrate Structure Database, BCSDB) создана для восполнения этого пробела посредством модулируемого контента и кросс-проектных взаимодействий. Она нацелена на привнесение в гликомику уровня внутренней интеграции, сравнимого с имеющимся в геномике и протеомике. BCSDB разрабатывается и обновляется с 2005 года и предоставляет данные по углеводам бактериального происхождения с известной первичной структурой. В настоящее время она является единственным в мире свободно доступным ресурсом, объединяющим первичные данные по углеводам вплоть до 2008 года. В данной работе представлена версия 3, бета-тестирование которой начато в августе 2009 года.

Две ключевые особенности проекта, отличающие его от конкурентов – это полнота покрытия и достоверность данных. База данных BCSDB содержит структурную, таксономическую, библиографическую, отнесенную ЯМР-спектроскопическую и прочую (методы установления структуры, данные по конформации, биохимии, генетике, биологической активности и т.д.) информацию для ~10000 бактериальных углеводов и гликоконъюгатов, включая гликолипиды и гликопротеины. Этот уровень покрытия примерно соответствует всем структурам в пределах класса, опубликованным до 2009 года, т.е. покрытие по бактериальным углеводам практически является полным. Это значит, что даже отрицательный результат поиска в базе данных остается значимой научной информацией.

Источниками данных для BCSDB являются: Carbbank (база данных, прекратившая существование в 1996 г.), полуавтоматическое аннотирование и ручная обработка реферируемой научной литературы, а также опыт коллектива в гликомике (дополнение публикаций и исправление ошибок в

них). Перед помещением данных в BCSDB они всесторонне проверяются и корректируются, что делает BCSDB единственным в гликоинформатике проектом с модулируемым контентом.

Интеграция с другими проектами гликомики позволяет использовать вторичные данные, расширяет покрытие за пределы прокариотов и обеспечивает сквозной доступ к сервисам других баз данных. В частности, налажено автоматическое взаимодействие с проектами "GlycomeDB" (поддерживается Немецким центром исследования рака, DKFZ), "PubMed" (поддерживается Национальным центром информации по биотехнологии, NCBI), "Taxonomy" (также NCBI), "BIOPSEL" (предсказание спектров ¹³C ЯМР для произвольной углеводной структуры на основе данных из BCSDB и теоретических вычислений; поддерживается автором). Специально для BCSDB были разработаны и внедрены на уровне стандартов однозначный, но в то же время читаемый язык описания углеводных структур и инструменты конвертирования между ним и другими языками гликомики.

BCSDB и ее сервисы-надстройки доступны для свободного использования и модулируемого пополнения на web-сайте <http://www.glyco.ac.ru/bcsdb3/>. Интерфейс BCSDB включает интернет-доступную пользовательскую часть, административную часть и программные средства (API) для автоматического обмена данными с другими проектами гликомики. Пользователи могут в удобной форме делать поисковые запросы (в том числе с нечеткой логикой), содержащие фрагменты химической структуры, библиографию, таксономию, фрагменты спектров ЯМР.

Разработка BCSDB и сопутствующих сервисов инициирована в рамках проекта Международного научно-технического центра (грант 1197р), поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант 05-07-90099), Комиссией по грантам при президенте РФ (грант МК-1700.2005.4) и Немецким центром исследования рака (стипендия). Предыдущие версии BCSDB и связанные исследования были опубликованы в NAR database issue (*Nucleic Acid Research – Database Issue*, 2007, v.35, pp. D280-D286), BMC Structural Biology (*BMC Structural Biology*, 2008, v.8(1), p. 35) и представлены на многих международных симпозиумах. Текущая версия BCSDB впервые представлена на данной конференции.

BACTERIAL CARBOHYDRATE STRUCTURE DATABASE

Toukach F.V.

N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: tou@server.ioc.ac.ru

Fax: (499) 135-53-28; tel.: (499) 137-61-48

Carbohydrates are one of the major constituents of the bacterial cell wall and are important for immunological properties of microorganisms, signal transduction and cell-cell recognition. The role of the provision of data on bacterial carbohydrates to the scientific community in biomedical and immunological research can hardly be overestimated. However, in contrast to other disciplines studying molecular basis of life, glycomics is lacking information-technology-based advantages. Universal integration standards and computer-assisted tools in glycomics are still in the making. Existing carbohydrate databases are focused on particular properties, utilize proprietary formats, do not provide complete coverage and, accordingly to our dedicated study, are full of errors.

Bacterial Carbohydrate Structure Database (BCSDB) aims at closing this gap its by curated content and cross-database integration, thus bringing of glycomics to the same level of integrity as exists in genomics and proteomics. BCSDB has been continuously developed and updated since 2005 to provide the data on bacterial carbohydrates with known primary structure. Currently it is the only free database with primary data on carbohydrate structures published up to 2009. Now we present version 3, the result of the database architecture rearrangement done in 2009.

Two key features of this project are coverage and data consistency. The database contains structural, taxonomical, bibliographical, assigned NMR spectroscopic and other (elucidation methods, conformational, biochemical, and genetic data etc.) information on ~10000 bacterial carbohydrates and glycoconjugates, including glycoproteins and glycolipids. The coverage approaches nearly all structures published within this class before 2009. This means that even negative answer to the search request to BCSDB still remains a valuable scientific information.

The sources of data were "CarbBank" (manually curated carbohydrate database ceased in 1996), manual and semi-automated processing of publications. All data have been checked for consistency by experts in carbohydrate biochemistry prior to the upload and corrected when necessary, which makes BCSDB the only glycoinformatic project with fully-moderated content.

The BCSDB interface includes the web-based user part, administrator part and programming gateways for automated data interchange with other databases. Users can search the database using fragments of structure, bibliography, taxonomical annotations, fragments of NMR spectra, common structural motifs. The integration with other projects in glycomics ("GlycomeDB", meta-database from Deutsches Krebsforschungszentrum, "PubMed", bibliographical database from National Center for Biotechnology Information (NCBI), "Taxonomy", Taxonomical database from NCBI) has been achieved on the level of programming interface. The unambiguous but nevertheless human-readable carbohydrate

structure description language has been developed for this project and translation tools to and from other known glycan representations are provided.

BCSDB is available on the Internet for free usage and validated user data submission (<http://www.glyco.ac.ru/bcsdb3/>).

This work was supported by the CTR Program of the US Department of Defense (ISTC Partner), Russian Foundation for Basic Research, Russian Federation President grant program, Deutsches Krebsforschungszentrum Gaestwissenschaft program, and Foundation for Russian Science support.

Previous versions of BCSDB and related studies were reported in NAR database issue (*Nucleic Acid Research — Database Issue, 2007, v.35, pp. D280-D286*), BMC Structural Biology (*BMC Structural Biology, 2008, v.8(1), p. 35*) and on many international symposia. Current version of BCSDB has not been yet reported elsewhere.

ИЗУЧЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В КЛЕТКЕ ПРИ АКТИВАЦИИ ТИРОЗИНКИНАЗНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

*Тюрин-Кузьмин П.А., Сафронова Н.М. *, Воротников А.В., Белоусов В.В. **

Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

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

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

E-mail: tyurinkuzmin.p@gmail.com

Факс: (495) 932-99-04; тел.: (495) 932-99-04

Перекись водорода синтезируется в клетках при стимуляции тирозинкиназных рецепторов ростовых факторов, к которым относятся рецепторы эпидермального (EGFR) и тромбоцитарного (PDGFR) факторов роста, фактора роста сосудистого эндотелия (VEGFR) и некоторых других. Основным источником H_2O_2 при прохождении сигнала от тирозинкиназных рецепторов являются НАДФН-оксидазы. H_2O_2 выступает в качестве вторичного мессенджера. Он инактивирует ряд тирозинфосфатаз, лимитирующих активацию тирозинкиназных рецепторов, MAP-киназного и PI3-киназного сигнальных каскадов. Инактивация тирозинфосфатаз удлинняет сигнальные эффекты ростовых факторов и вызывает продолжительные биологические ответы, связанные с направленной миграцией, пролиферацией и дифференцировкой клеток.

Механизм действия H_2O_2 на тирозинфосфатазы не до конца ясен. Известно, что в клетке содержатся сильные антиоксидантные системы, разрушающие H_2O_2 . Так, пероксиредоксин 2 (Ptx2) взаимодействует с H_2O_2 с константой скорости $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, в то время как для ключевой тирозинфосфатазы PTP-1B константа скорости реакции взаимодействия с H_2O_2 составляет $20 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, а концентрация в клетке Ptx2 превышает концентрацию PTP-1B на два порядка. Таким образом, согласно кинетическим расчетам, H_2O_2 в клетке не должна взаимодействовать с PTP-1B. Тем не менее, PTP-1B окисляется при физиологической стимуляции рецепторных тирозинкиназ.

Мы предполагаем, что одним из возможных механизмов взаимодействия H_2O_2 с PTP-1B является локальное повышение концентрации H_2O_2 вблизи субстрата. Ptx2 в этой области клетки окисляется и, так как его восстановление тиоредоксином происходит сравнительно медленно, избыток H_2O_2 взаимодействует с PTP-1B.

Целью нашей работы было изучение внутриклеточной локализации и диффузии H_2O_2 , синтезируемой НАДФН-оксидазой при стимуляции тирозинкиназных рецепторов PDGFR в фибробластах линий 3T3 и EGFR в эпителиальных клетках линии HeLa.

Мы изготовили набор вариантов биосенсора NurPer с различной внутриклеточной локализацией. Генетически кодируемый биосенсор NurPer

обладает высокой чувствительностью и специфичностью к H_2O_2 , изменяя спектр возбуждения флуоресценции при взаимодействии с последней. Полученные варианты биосенсора мы экспрессировали в клетках линий HeLa и 3T3 и наблюдали за изменением спектральных характеристик биосенсора в режиме реального времени при помощи флуоресцентной микроскопии. По изменению соотношения пиков возбуждения флуоресценции биосенсора мы регистрировали изменения уровня H_2O_2 в различных компартментах клетки при стимуляции факторами роста.

Было обнаружено, что при стимуляции эпителиальных клеток EGF H_2O_2 синтезируется НАДФН-оксидазой, которая расположена в эндосомо-подобных структурах, содержащих клатрин и интернализированный EGFR. Около плазматической мембраны уровень H_2O_2 практически не меняется, что свидетельствует о том, что H_2O_2 в клетке выделяется локально и не распространяется по всей цитоплазме. Напротив, в фибробластах после их стимуляции PDGF H_2O_2 синтезируется, в основном, вблизи плазматической мембраны. В обоих случаях концентрация H_2O_2 повышается также на мембране эндоплазматического ретикулума. При ингибировании НАДФН-оксидаз апоцитинином выделения H_2O_2 не происходит.

Таким образом, полученные нами данные позволяют утверждать, что при стимуляции рецепторных тирозинкиназ ростовыми факторами H_2O_2 продуцируется и действует локально в отдельных компартментах клетки. Диффузия H_2O_2 между компартментами клетки ограничена.

Работа поддержана грантом ГК № 02.512.11.2216.

INTRACELLULAR HYDROGEN PEROXIDE LOCALIZATION FOLLOWING ACTIVATION OF TYROSINE KINASE RECEPTORS

Tyurin-Kuzmin P.A., Safronova N.M., Vorotnikov A.V., Belousov V.V.**

Fundamental Medicine Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: tyurinkuzmin.p@gmail.com

Fax: (495) 932-99-04; tel.: (495) 932-99-04

Hydrogen peroxide (H_2O_2) is generated in response to activation of tyrosine kinase receptors such as epidermal growth factor receptor (EGFR) and platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) by EGF and PDGF, respectively. In this case H_2O_2 acts as a second messenger and inactivates tyrosine phosphatases. However, cells contain powerful antioxidant systems that degrade H_2O_2 . Peroxiredoxin 2 (Prx2) interacts with H_2O_2 with rate constant $2 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$, whereas for the rate constant of the key tyrosine phosphatase PTP-1B is $20 M^{-1}s^{-1}$. In addition, the intracellular concentration of Prx2 is two orders of magnitude higher than that of PTP-1B. However, despite the oxidation of PTP-1B by H_2O_2 seems to be kinetically unfavorable, it appears to occur in cells upon physiological stimulation of tyrosine kinase receptors. We hypothesize that prolonged local increases of H_2O_2 levels in the vicinity to the substrate are responsible for PTP-1B regulation by H_2O_2 . Prx2 becomes oxidized in this part of the cell, but fails to recover due to its slow reduction by thioredoxin. As a consequence, the excess H_2O_2 effectively interacts with and inhibits PTP-1B.

In our work we aimed to reveal compartmentalized localization of H_2O_2 in cells and demonstrate the role of NADPH oxidase in its production during stimulation of PDGFR in 3T3 fibroblasts and EGFR in HeLa epithelial cells. We produced a panel of HyPer-derived biosensors containing different signals for intracellular localization. HyPer is a genetically encoded biosensor that has high sensitivity and specificity to H_2O_2 . Its excitation spectrum changes upon interaction with H_2O_2 . We expressed the biosensor variants in HeLa and 3T3 cell lines and monitored spectral parameters of biosensors using the lifetime fluorescence microscopy. The ratio changes in biosensor excitation maxima were determined and levels of H_2O_2 in various cell compartments were visualized during receptor stimulations.

We found that upon EGF stimulation of epithelial cells, H_2O_2 is produced in small endosome-like intracellular compartments containing clatrin and internalized EGFR. Near the plasma membrane the H_2O_2 levels were not virtually changed. Therefore cell produces H_2O_2 locally, which does not spread to other cell compartments. In contrast, 3T3 fibroblasts generate H_2O_2 in the region of the plasma membrane upon stimulation with PDGF. Both types of cells reveal clear signs of H_2O_2 generation at the endoplasmic reticulum membrane. The inhibition of NADPH oxidase by apocynin blocks H_2O_2 production in both the EGF-stimulated HeLa cells and PDGF-treated 3T3 fibroblasts.

In conclusion, our results demonstrate that stimulation of tyrosine kinase receptors results in production of H_2O_2 that acts locally in cellular cytoplasmic compartment. H_2O_2 diffusion between different cell compartments is limited.

Supported by the grant № 02.512.11.2216 from the Federal Agency for Science and Innovation.

ОДНОВРЕМЕННЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ СЕМИ ТИПОВ СТАФИЛОКОККОВЫХ ЭНТЕРОТОКСИНОВ НА БИОЛОГИЧЕСКОМ МИКРОЧИПЕ

Фейзханова Г.У., Филиппова М.А., Рубина А.Ю.

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

E-mail: gouzele@gmail.com

Факс: (499) 135-14-05; тел.: (499) 135-99-80

Staphylococcus aureus является наиболее частым виновником пищевых отравлений. Энтеротоксины – вещества, которые вырабатываются *S. aureus* во время их жизнедеятельности. Для самих *S. aureus* эти токсины являются промежуточными продуктами обмена веществ или веществами, с помощью которых они борются за существование с другими бактериями. Для человека энтеротоксины – это сильнейшие яды. Известно несколько типов стафилококковых энтеротоксинов, в том числе *SEA*, *SEB*, *SEC1*, *SED*, *SEE*, *SEG*, *SEI*. Основная трудность их идентификации связана со значительной антигенной схожестью данной группы родственных токсинов. Для идентификации и анализа патогенных организмов *S. aureus* и энтеротоксинов, которые они вырабатывают, используются различные лабораторные методы, включающие тесты на животных, микробиологические методы, анализ ДНК с использованием ПЦР, иммунологические методы: радиоиммунологический, иммунофлуоресцентный и иммуноферментный анализы. К недостаткам большинства традиционных иммунологических методов относится невозможность одновременно тестировать образец на наличие нескольких биологически активных соединений. Эта проблема решается с помощью биологических микрочипов, которые позволяют проводить многопараметрический анализ образца.

Целью наших исследований являлось создание микрочипа, с помощью которого можно определять концентрации семи типов энтеротоксинов стафилококка в образце. Технология гидрогелевых микрочипов была разработана в ИМБ РАН под руководством академика А.Д. Мирзабекова и совершенствуется по настоящее время. Белковый гидрогелевый микрочип представляет собой матрицу индивидуальных гелевых ячеек на поверхности подложки (стекла, пластика или металла), содержащих различные ковалентно иммобилизованные в объеме ячейки зонды (антитела, антигены).

Для проведения одновременного анализа семи типов стафилококковых энтеротоксинов (*SEA*, *SEB*, *SEC1*, *SED*, *SEE*, *SEG*, *SEI*) был выбран метод двухстадийного "сэндвич"-иммуноанализа с флуоресцентной регистрацией сигнала. Создан микрочип с иммобилизованными моноклональными антителами против всех исследуемых энтеротоксинов и разработан протокол проведения анализа. Анализ проводили в две стадии: инкубация смеси энтеротоксинов с биотинилированными антителами против этих энтеротоксинов и проявка биочипов флуоресцентно меченым (Cy5) стрептавидином. Регистрацию результатов анализа проводили на анализаторе биочипов с использованием фильтров 650/670 нм (возбуждение/регистрация) и обрабатывали с помощью программного обеспечения *ImaGelResearch*, разработанного в ИМБ РАН.

На первом этапе необходимо было выбрать рабочие пары антител для каждого энтеротоксина. Сотрудниками лаборатории иммунохимии ФИБХ РАН (группой Ф.А.Бровко) были получены панели антител против каждого из семи энтеротоксинов. На микрочипах был проведен скрининг предоставленных нам панелей антител и выбраны пары антител для каждого энтеротоксина, обеспечивающие высокую дискриминацию (отношение максимального сигнала к фоновому сигналу) и не дающие неспецифических перекрестных взаимодействий с другими энтеротоксинами и антителами к ним. Также были подобраны оптимальные концентрации для всех иммобилизованных и проявляющих антител.

Далее были изготовлены микрочипы с выбранными антителами против семи энтеротоксинов, и для каждого энтеротоксина получены графики зависимости интенсивности флуоресцентного сигнала от концентрации данного антигена в смеси (калибровочные кривые). Линейный диапазон калибровочных кривых для всех энтеротоксинов составил от 0 до 200 нг/мл. Оценка чувствительности разработанного метода показала, что анализ на биочипах позволяет статистически достоверно определять концентрации энтеротоксинов в смеси в диапазоне от 0,1 нг/мл (для *SEE*) до 3 нг/мл (для *SEB*).

На следующем этапе нами было проведено тестирование разработанного метода на образцах биологических жидкостей и пищевых продуктов. Смесь семи энтеротоксинов добавляли в различных концентрациях в сыворотку крови и молоко и получали калибровочные кривые. В результате была показана возможность одновременного количественного определения данного набора энтеротоксинов в различных средах.

SIMULTANEOUS IMMUNOASSAY OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS ON BIOLOGICAL MICROCHIPS

Feyzkhanova G.U., Filippova M.A., Rubina A.Yu.

Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow

E-mail: gouzele@gmail.com

Fax: (499) 135-14-05, tel.: (499) 135-99-80

Staphylococcus aureus bacteria are the most frequent cause of food poisoning. Enterotoxins are substances produced by *S. aureus* during their growth and activity. These toxins are intermediate products of *S. aureus* metabolism that help the bacteria to struggle for the existence with other bacteria. The toxins are extremely poisonous for human organisms. Several types of staphylococcal enterotoxins (SEs) are known including *SEA*, *SEB*, *SECI*, *SED*, *SEE*, *SEG*, *SEI*. The difficulty of identification of toxins within the group of these related toxins is explained by their close antigenic similarity. For the identification and assay of *S. aureus* pathogenic organisms and their enterotoxins, different laboratory methods are used including tests on animals, microbiological methods, PCR-based DNA assay, and immunological methods: radioimmunoassay, immunofluorescence, and enzymeimmunoassay. The drawback of the majority of traditional methods is that they do not allow carrying out simultaneous test for the presence of several biologically active compounds in a sample. This problem can be solved using biological microchips that can be used to analyse a sample for many parameters.

The aim of our research was to develop microchips that allow simultaneous measuring of concentrations of seven types of enterotoxins in a sample. The hydrogel microchips technology has been developed in the Engelhardt Institute of Molecular Biology of the RAS (EIMB RAS) under the direction of A.D. Mirzabekov and at the present time the technology continues to improve. Protein hydrogel microchip is a matrix of individual gel elements fixed on the surface of a support (glass, plastic or metal). These elements contain different probes (antigens, antibodies) covalently immobilized within the whole volume of the microchip gel element.

For the simultaneous assay of seven types of SEs (*SEA*, *SEB*, *SECI*, *SED*, *SEE*, *SEG*, *SEI*), "sandwich-type"-immunoassay with fluorescent registration has been chosen. Microchip with immobilized monoclonal antibodies to all enterotoxins under study has been developed and the protocol of the assay has been elaborated. The assay involves two steps: application of a mixture of enterotoxins and biotinylated antibodies against these enterotoxins on biochips and, after incubation, development of biochips by Cy5-labeled streptavidin. Results of the assay were recorded using a fluorescent Biochip Analyzer with 650/670 nm excitation/emission filters and processed using special *ImaGelResearch* software developed in EIMB RAS.

Firstly it was necessary to choose pairs of antibodies against each enterotoxin for the sandwich assay. The panels of antibodies against each SE have been developed in the laboratory of immunochemistry (Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS) headed by F.A. Brovko. Screening of these antibody panels using hydrogel microchips has been carried out. Secondly, the antibody pairs that demonstrated high discrimination ratio (the ratio of the maximum signal

to the background signal) and did not show non-specific cross-reactions with other SEs and antibodies have been selected. Optimal concentrations for all immobilized and developing antibodies have been also chosen.

Microchips with the selected antibodies against seven enterotoxins were manufactured and used for the sandwich assay. Plots of fluorescence intensity versus concentration of toxin in the mixture (calibration plots) were obtained for each enterotoxin. The linear range of calibration plots was from 0 to 200 ng/ml. Analytical sensitivity of the method has been estimated. The biochip-based method allows statistically accurate measuring of low concentrations of enterotoxins in a mixture: from 0.1 ng/ml for *SEE* to 3 ng/ml for *SEB*.

Next, testing of the method using biologic fluids and food samples has been carried out. The mixture of seven SEs was added in several concentrations to blood serum and milk and the calibration plots were obtained. As a result, it was shown that the biochip-based immunoassay method permits simultaneous quantitative determination of the set of seven enterotoxins in different media.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ГАНГЛИОЗИДОВ С РАЗЛИЧНЫМИ СУБЪЕДИНИЦАМИ IL-2 РЕЦЕПТОРА

Холоденко Р.В., Водовозова Е.Л., Холоденко И.В., Молотковская И.М.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
E-mail: khol@mail.ru
Факс: (495) 330-40-11, тел.: (495) 330-40-11

Ганглиозиды ингибируют IL-2-зависимую пролиферацию Т-лимфоцитов, тем самым подавляя одну или несколько стадий проведения сигнала от цитокина. Известно, что один из основных механизмов ингибирования пролиферации Т-лимфоцитов, индуцированной IL-2, – это прямое взаимодействие между ганглиозидом и цитокином, приводящее к перехвату молекулы IL-2 ганглиозидом. Однако, по-видимому, ганглиозиды образуют комплексы также и с рецептором к IL-2 (IL-2R); формирование таких комплексов может блокировать прохождение сигнала по IL-2-зависимому пути. Несмотря на огромный интерес исследователей к этому вопросу, его биологические и структурные аспекты изучены недостаточно.

В данной работе была использована IL-2-зависимая цитотоксическая мышиная Т-клеточная линия CTLL-2. Для исследования механизмов взаимодействия ганглиозидов с IL-2R были использованы два подхода: окрашивание различных субъединиц IL-2R с последующим цитометрическим анализом, а также фотоаффинное мечение живых клеток зондом ^{125}I -Dcp-GM1 с последующим анализом продуктов сшивки после их иммунопреципитации с антителами к α -, β - и γ -субъединицам IL-2R.

Было показано, что обработка клеток ганглиозидами (GM1, GM2) приводит к резкому уменьшению интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных антителами к IL-2R α -субъединице. Так, доля окрашенных клеток уменьшается на 30% после предварительной обработки их GM1, и на 10% – после их инкубации с GM2. Мечение обработанных ганглиозидами клеток антителами к субъединице IL-2R β приводит лишь к незначительному изменению интенсивности флуоресценции: для GM1 – на 3% и для GM2 – на 6%.

Чтобы определить характер маскирования IL-2R, вызываемого ганглиозидом GM1, было проведено фотоаффинное мечение. Фотоактивируемая группа зонда ^{125}I -Dcp-GM1, несущая группу ^{125}I -Dcp на конце ацильной цепи, близка по свойствам к природному ганглиозиду. При таком расположении фотофора сшивка зонда с субъединицами рецептора возможна лишь в том случае, когда ганглиозид встраивается в плазматическую мембрану. Детекцию продуктов пришивки после лизиса клеток с последующей иммунопреципитацией с антителами к соответствующим субъединицам IL-2R и SDS-ПААГ-электрофореза проводили автордиографически. Автордиограмма выявила полосу лишь β -субъединицы IL-2R.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что экзогенно добавленный GM1 может взаимодействовать с α - и β -субъединицами IL-2R различным образом. Если взаимодействие IL-2R β -субъединицы с GM1 возможно лишь при встраивании ганглиозида в плазматическую мембрану, то α -субъединица рецептора взаимодействует только с невстроенным ганглиозидом.

INTERACTION OF EXOGENOUS GANGLIOSIDES WITH IL-2R SUBUNITS

Kholodenko R.V., Vodovozova E.L., Kholodenko I.V., Molotkovskaya I.M.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow
E-mail: khol@mail.ru
Fax: (495) 330-40-11; tel.: (495) 330-40-11

Gangliosides were shown to inhibit the IL-2-dependent proliferation of T-cells, implying that gangliosides interfere with one or more of the IL-2-driven events. It is known that one of important mechanisms of the inhibition is the direct interaction between ganglioside and the cytokine and, as a result, the capture of IL-2 molecule by ganglioside. But gangliosides apparently can also form complexes with IL-2R; such complexes influence on the signal transduction through IL-2R. This effect of gangliosides may lead to the failure of this pathway. Despite the large interest in the subject, biological and structural aspects of this problem are poorly understood. In this study we propose possible mechanisms determining interactions between exogenous gangliosides and IL-2R subunits.

The work was carried out using IL-2-dependent cytotoxic T-cell mouse line CTLL-2. Two different approaches for study on mechanisms of exogenous gangliosides' interaction with IL-2R were applied: antibody staining of IL-2R subunits followed by flow cytometry analysis, and photoaffinity labeling of living cells with ^{125}I -Dcp-GM1 followed by analysis of the cross-linking products after immunoprecipitation with antibodies to IL-2R α -, β - and γ -subunits.

It has been shown that the fluorescence intensity of the antibody-labeled IL-2R α -subunit decreases sharply after treatment of cells with gangliosides. The fluorescent labeled cell fraction decreases by 30% after cells incubation with ganglioside GM1, and by 10% after incubation with GM2. Labeling of the cells with antibodies to the IL-2R β -subunit results in a less significant fluorescence decrease after cells incubation either with GM1 (3%) or with GM2 (6%).

To determine the mode of the ganglioside GM1 masking influence, photoaffinity cross-linking has been used. Photoactivable probe ^{125}I -Dcp-GM1 with ^{125}I -Dcp group at the end of long acyl chain is rather similar to the natural ganglioside. In case of such photophore localization, cross-linking with receptor subunits occurs only if ganglioside probe incorporates into plasma membrane. Electrophoresis following immunoprecipitation with appropriate antibodies resulted in appearance of the radioactive band only for β -subunit of IL-2R, but not for IL-2R α -subunit.

These results demonstrate that exogenous ganglioside GM1 can interact with α - and β - subunits of IL-2R in different modes. Interaction of IL-2R β -subunit with ganglioside GM1 requires incorporation of the ganglioside into plasma membrane, but α -subunit of IL2R interacts with ganglioside, non-incorporated into membrane, but rather absorbed on its surface.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ И РАКОВЫХ КЛЕТОК ПРИ КО-КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА РАЗЛИЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СУБСТРАТАХ

Шафигуллина А.К.¹, Ялвач М.Э.², Блатт Н.Л.³, Киясов А.П.¹, Ризванов А.А.^{1,2,3}

¹Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

²Университет Едиптепе, Стамбул, Турция

³Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина, Казань, Россия

E-mail: sh.aygul@gmail.com

Факс: (843) 236-03-93; тел.: (843) 2927399

Введение. Общим недостатком большинства систем для культивирования клеток *in vitro* является отсутствие микроокружения, которое формируется совокупностью таких факторов, как наличие межклеточных контактов, внеклеточного матрикса и секретлируемых факторов. Особый интерес представляет собой взаимодействие раковых клеток со своим микроокружением и с региональными стволовыми клетками организма. Специфика микроокружения раковой клетки может влиять на ее физиологический статус и чувствительность к терапии. Разработка систем *in vitro*, позволяющих более точно моделировать ниши, в которых находятся раковые клетки, является актуальной проблемой, позволяющей повысить эффективность доклинических исследований по разработке и тестированию новых фармакологических противораковых препаратов. Не менее важным является изучение взаимодействия раковых клеток с региональными стволовыми клетками организма. Существующая гипотеза раковых стволовых клеток объясняет возникновение, устойчивость и рецидив некоторых видов онкологических заболеваний при традиционных видах химио- и радиотерапии. Ученые предполагают, что существует определенная популяция раковых клеток, которая обладает свойствами, присущими стволовым клеткам. Обладая повышенной резистентностью, данная клеточная популяция является источником новых раковых клеток, которые появляются после прекращения лечебного курса. Само возникновение онкологических патологий также возможно связано с раковым перерождением единичной соматической стволовой клетки, которая в результате неконтролируемого деления приводит к развитию заболевания. Известно, что стволовые клетки способны взаимодействовать со своим микроокружением, влияя на статус дифференцировки окружающих клеток и вызывая их репрограммирование. В данном контексте исследование взаимодействия стволовых и раковых клеток представляет интерес для понимания процессов взаимодействия этих двух клеточных популяций.

Цель работы. Изучить взаимодействие мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и клеток нейробластомы SH-SY5Y человека при ко-культивировании на различных биологических субстратах, а также определить влияние ко-культивирования на отдельные клеточные популяции при неблагоприятных воздействиях окружающей среды.

Материалы и методы. Культура МСК была получена методом эксплантации из зачатков зубов мудрости человека. Анализ МСК проведен с помощью проточной цитофлуориметрии и ОТ-ПЦР в реальном времени. Ко-культивирование МСК осуществлено с культурой клеток нейробластомы SH-SY5Y человека. Каждый тип клеток был помечен *in vitro* флуоресцентными красителями: зеленым РКН67 (Сигма) для МСК и красным РКН26 (Сигма) для SH-SY5Y. Пластиковую поверхность для культуры клеток модифицировали нанесением поли-L-лизина, матригеля, фибронектина, желатина или коллагена. Ко-культуры подвергали воздействию противораковых препаратов доксирубицина и цис-платины, а также окислительному стрессу (пероксид водорода).

Результаты. Культура клеток из зачатков третьих моляров человека имела фенотип, характерный для МСК (CD29+, CD73+, CD90+, CD105+, CD14-, CD34-, CD44-, CD45-, CD133-, CD166-). Ко-культивирование МСК и SH-SY5Y приводило к спонтанной самоорганизации клеток: "островки" раковых клеток, окруженные "протоками" фибробласто-подобных МСК. Данный тип организации был отмечен при ко-культивировании клеток на поли-L-лизине, фибронектине, желатине, коллагене и немодифицированном культуральном пластике. При ко-культивировании обнаружены клетки, окрашенные зелеными и красными флуоресцентными метками, что свидетельствует о слиянии стволовых и раковых клеток с образованием гибридных клеток. При культивировании на поверхности, покрытой слоем матригеля, наблюдалось формирование плотного сгустка МСК, окруженного "ореолом" клеток SH-SY5Y (тип распределения "летающая тарелка"). Ко-культивирование клеток привело к повышению жизнеспособности стволовых клеток в 2 раза по сравнению с чистой культурой МСК при условиях окислительного стресса в присутствии перекиси водорода.

Выводы. Впервые получены данные по самоорганизации стволовых и раковых клеток человека при ко-культивировании на различных биологических субстратах. Подобная способность к самоорганизации может быть использована в области тканевой инженерии и биотехнологии. Разработана эффективная система *in vitro* для исследования индивидуальных клеточных популяций при ко-культивировании на основе дифференциального *in vitro* мечення флуоресцентными красителями. Данная система позволяет изучать поведение отдельных клеточных популяций при исследовании межклеточных взаимодействий между стволовыми и раковыми клетками. Дальнейшая работа позволит создать принципиально новую систему *in vitro* для доклинического скрининга противораковых препаратов и исследовать роль слияния раковых и стволовых клеток в патогенезе онкологических заболеваний.

INTERACTION OF MESENCHYMAL STEM CELLS AND NEUROBLASTOMA SH-SY5Y CELLS DURING CO-CULTURE ON DIFFERENT BIOLOGICAL SURFACES

*Shafigullina A.K.*¹, *Yalvac M.E.*², *Blatt N.L.*³, *Kiyasov A.P.*¹, *Rizvanov A.A.*^{1,2,3}

¹Kazan State Medical University, Kazan, Russia

²Yeditepe University, Istanbul, Turkey

³V.I. Ulyanov-Lenin Kazan State University, Kazan, Russia

E-mail: sh.aygul@gmail.com

Fax: (843) 236-03-93; tel.: (843) 292-73-99

Introduction. The common drawback of almost every *in vitro* cell culture system is the absence of appropriate microenvironment, which is formed by such factors as cell-cell contacts, extracellular matrix and soluble factors. Interaction of cancer cells with their microenvironment and regional stem cells is of particular interest. Specifics of cancer cell microenvironment can influence physiological status of cells and their susceptibility to anticancer therapies. Development of *in vitro* systems which allow more accurate modeling of cellular niche can increase efficiency of preclinical assays for screening anticancer drugs. It is also important to study interactions between cancer cells and regional stem cells. There is a cancer stem cell hypothesis which explains occurrence, resistance and recurrence of cancers after traditional chemo- and radiation therapies. It is thought that there is a defined population of cancer cells with stem cells properties. This population possesses increased resistance to traditional therapy and serves as a new source of cancer cells, which reoccur after anticancer treatments. An origin of cancer disease could also be related to oncogenic transformation of a single somatic stem cell. It is known that stem cells are able to interact with their microenvironment, influence differentiation status of neighboring cells and cause their reprogramming. This is why it is important to study interactions of cancer and stem cells.

Aim. The purpose of this work was: to study interactions between mesenchymal stem cells (MSC) and neuroblastoma SH-SY5Y cells during co-cultures on different coated surfaces; to determine the effect of co-culture of cancer and stem cells on each cellular population under various stress conditions.

Materials and methods. MSC line was derived by explantation cell growth from human third molar tooth germs. MSC analysis was carried out by flow cytometry and Real-Time PCR. MSC were co-cultured with human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Cell were labeled *in vitro* by fluorescent dyes: green PKH67 (Sigma) for MSC and red PKH26 (Sigma) for SH-SY5Y. Plastic cell culture surfaces were coated by poly-L-lysine, Matrigel, fibronectin, gelatin or collagen. Co-cultures were exposed to anti-cancer drugs doxorubicin and cis-platin and to oxidative stress (hydrogen peroxide).

Results. MSC from human wisdom tooth germs had following surface antigen profile: CD29+, CD73+, CD90+, CD105+, CD14-, CD34-, CD44-, CD45-, CD133-, CD166-. MSC and SH-SY5Y co-culture lead to spontaneous cells self organization: channel-like organization of MSCs and island-like of SH-SY5Y on poly-L-lysine, fibronectin, gelatin, collagen and untreated cell culture plastic. Detection of cells labeled by both green and red fluorescent dyes demonstrated

rare fusion events between cancer and stem cells. Another type of organization was observed on Matrigel covered surface: space saucer-like structure with flat layer of SH-SY5Y cells surrounding a bulge of MSCs. Co-cultured stem cells had two times higher viability under oxidative stress conditions compared to pure MSC cell culture.

Discussion. We demonstrated for the first time self organization of cancer and stem cells during co-culture on various coated surfaces. These properties can be used in different fields of tissue engineering and biotechnology. We developed an efficient *in vitro* system for studying individual cell populations during co-culture using differential live fluorescent labeling. Further research will focus on developing novel systems for pre-clinical screening of anti-cancer compounds and on investigation of cell fusion events between cancer and stem cells in pathogenesis of oncologic disorders.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ
ПЕРВИЧНЫХ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ
ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ,
КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В СРЕДЕ С ФАКТОРАМИ
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В БЕСФИДДЕРНЫХ И
БЕССЫВОРОТОЧНЫХ УСЛОВИЯХ**

Шейна Ю.И., Еремеев А.В.

Красноярский центр репродуктивной медицины, Красноярск

E-mail: shein1@mail.ru

Факс/тел.: (391) 264-08-95

Различные нарушения фертильности, затрагивающие приблизительно 15% супружеских пар во всем мире, связаны, в основном, с нарушением гаметогенеза. Недавние работы показали возможность получения половых клеток из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши. Аналогичные исследования проводились и с человеческими стволовыми клетками. В ходе этих работ были либо спонтанно, либо с помощью обогащения среды специфическими факторами получены ооцито-подобные структуры. Для направленной дифференцировки ЭСК в половые клетки необходимо понимание процессов, протекающих на различных стадиях образования гамет. К ним можно отнести: влияние различных факторов и гормонов на процесс дифференцировки, включение на различных этапах определенных генов, ответственных за миграцию, деление и созревание клеток. Кроме того, если говорить о дальнейшей возможности использования полученных гамет из человеческих ЭСК в качестве альтернативного способа лечения различных видов бесплодия, необходима разработка методов культивирования ЭСК в отсутствие компонентов животного происхождения. В связи с этим целью настоящей работы было исследование динамики экспрессии маркеров первичных половых клеток в ЭСК человека при их культивировании в среде, обогащенной факторами дифференцировки, в условиях отсутствия фидерных клеток и сыворотки.

Эмбриональные клетки человека 49-ой линии культивировались на стандартной среде для эмбриональных стволовых клеток с добавлением морфогенетического белка 4 (BMP4), эпидермального фактора роста (EGF), ретиноевой кислоты, фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов. Культивирование клеток проводилось в течение четырех недель. Для идентификации прохождения клетками стадий дифференцировки каждые 3 дня осуществлялся забор клеток для проведения обратной транскрипции и ПЦР для анализа экспрессии следующих маркеров: Oct4, ifitm3, DPPA3, DDX4, ZP3.

Культивирование клеток в среде, содержащей BMP4, приводило к дифференцировке колоний ЭСК. Оценивалась морфология колоний методом простой фазово-контрастной микроскопии. Была обнаружена плотностно-зависимая способность колоний к дифференцировке. Дифференцировка культуры в лаг-фазе происходила по всей колонии, а при практически монослойном состоянии – только по периферии.

В ходе исследования экспрессии генов, отвечающих за дифференцировку первичных половых клеток, путем проведения обратной транскрипции и ПЦР была прослежена динамика появления интересующих генов в зависимости от времени культивирования ЭСК человека на обогащенной среде. Анализ показал, что OCT4, являющийся маркером плюрипотентности, стабильно экспрессируется до третьей недели культивирования, и затем постепенно исчезает к концу срока проведения эксперимента. Ген *stella* (DPPA3) интенсивно начинал экспрессироваться со второй недели культивирования, и постепенно уровень экспрессии снижался к третьей неделе. Это может свидетельствовать о том, что клетки в эти сроки начинали дифференцировку в первичные половые клетки, т.к. данный ген ответственен за процесс вступления ЭСК на путь образования гамет. *Fragillis* (IFITM3) стабильно присутствует во всех клетках в ходе дифференцировки. Данный маркер экспрессируется на ранних стадиях образования ППК, но, кроме того, он также присутствует во многих тканях взрослого организма, что позволяет предположить, что в ходе длительного культивирования ЭСК человека с BMP4 клетки, находящиеся в нестабильной стадии дифференцировки, могут начать дифференцироваться по другому пути. Это подтверждают и данные по экспрессии генов-маркеров более поздней стадии дифференцировки ППК, таких как DDX4 и ZP3: в ходе эксперимента экспрессия этих генов не наблюдалась.

EXPRESSION OF PRIMORDIAL GERM CELL'S MARKERS IN HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS, WHICH WERE CULTIVATED IN MEDIUM SUPPLEMENTED WITH FACTORS OF DIFFERENTIATION IN CONDITIOUS WITHOUT FEEDER LAYER AND SERUM

Sheina J.L., Ereemeev A.V.

Krasnoyarsk Center of Reproductive Medicine, Krasnoyarsk

E-mail: Shein1@mail.ru

Fax/tel.: (391) 264-08-95

Different abnormalities of fertility, affecting approximately 15% of married couples all over the world, are associated with disfunctions of gametogenesis. Recent studies showed the possibility of obtaining primordial germ cells from mouse embryonic stem cells. Also similar investigations were made with human ESCs. In these studies, germ cells were generated via spontaneous EB formation, and EB formation with recombinant human bone morphogenetic proteins (BMPs). It is necessary to understand all processes, which occur in different stages of gametogenesis for making direct differentiation of ESC into PGC. It can be the influence of different factors and hormones, switching on specific genes, which are responsible for migration, fission or maturation of cells. In terms of this the aim of our study was to observe the dynamics of expression of PGC's markers in human ESC which were cultivated in medium supplemented with differentiation factors in feeder-free and serum-free conditions.

Human ESC of 49-th line were cultivated on basic medium for ESC supplemented with bone morphogenic protein 4 (BMP4), epidermal growth factor (EGF), retinoic acid, follicle-stimulating hormone, and luteinizing hormone. Cells were cultivated for four weeks. To identificate how cells pass stages of differentiation, cell sampling was made every three days for RT-PCR analysis of PGC's markers expression such as, ifitm3, DPPA3, vasa, GDF9 and ZP3.

Cell cultivation in medium supplemented with BMP4 and other factors lead to differentiation of ESC's colonies. Morphology of colonies was observed by phase-contrast microscopy. Density-dependend ability for differentiation of colonies was detected. In log-phase of growth cell's differentiation took place all over the colony, while in monolayer differentiation was observed only in outlying districts.

During the analysis of gene expression by RT-PCR the of PGC's markers was shown the time-dependend dynamics of their expression in human ESC which were cultivated in supplemented medium. Oct4 is marker of pluripotency and it is constant expressed till the third week of cultivation and then slowly decrease and disappear at the end of the experiment. *Stella* (DPPA3) began to express from second week of cultivation and expression decreased in the third week. This data suggested that in that time cells began to differentiate into primordial germ cells. *Fragillis* (IFITM3) was constant expressed during all experiment. This marker is expressed in early stages of differentiation of primordial germ cells, but it is also exists in different tissues of adults. It suggests that during long term of cultivation human embryonic stem cells can begin to differentiate into another ways. This hypotheses can be proved by the fact that genes of late stages of differentiation into primordial germ cells (DDX4, ZP3) don't expressed during experiment.

ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ $\alpha 7$ НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НЕЙРОНАМИ СПИНОМОЗГОВЫХ ГАНГЛИЕВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СЕЛЕКТИВНЫХ α -НЕЙРОТОКСИНОВ

Шелухина И.В., Крюкова Е.В., Липс К.С. **, Куммер В. *, Цетлин В.И.

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

*Институт анатомии и клеточной биологии Университета им. Ю. Либиха, Гиссен, Германия

**Университетская клиника Гиссена-Марбурга, Гиссен, Германия

E-mail: ivshelukhina@mail.ru

Факс: (495) 335-57-33; тел.: (495) 330-73-74

Первичные афферентные нейроны спинномозговых ганглиев передают сенсорную информацию с периферии в спинной мозг. Данные нейроны являются ложноуниполярными, т.е. от них отходит один отросток, который разделяется на дендрит, передающий нервные импульсы с периферии к телу клетки, и аксон, по которому они поступают далее в спинной мозг. Агонисты никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (НАХР) способны как возбуждать периферические чувствительные нервные волокна, так и оказывать обезболивающее действие. Вероятной причиной столь разных эффектов холинергических агонистов является стимуляция ими различных подтипов НАХР, расположенных на нейронах спинномозговых ганглиев. По данным радиолигандного анализа, иммуногистохимии и электрофизиологии нейроны спинномозговых ганглиев, характеризующиеся определенной функцией в организме, экспрессируют детерминированный набор НАХР. В данных ганглиях найдены мРНК всех нейрональных субъединиц НАХР. Нейроны спинномозговых ганглиев не являются однородной популяцией. Они различаются размерами, внутриклеточной структурой, спектром экспрессируемых белков, содержанием пептидов, электрофизиологическими и другими свойствами. Существует корреляция между некоторыми характеристиками нейронов и выполняемой ими функцией. Так, нейроны малого размера с тонкими аксонами передают информацию о болевых и температурных ощущениях, тогда как нейроны с большим диаметром тел и аксонов участвуют в передаче механорецептивной информации. В нашей работе мы исследовали, какие подтипы нейронов спинномозговых ганглиев экспрессируют $\alpha 7$ НАХР.

Имуногистохимия является наиболее распространенным методом исследования локализации различных субъединиц НАХР. Однако, недавние исследования на тканях нокаутных мышей доказали, что большое число антител оказалось неприменимо для этой цели из-за наличия неспецифического окрашивания; в связи с этим, все больше внимания уделяется использованию их в качестве селективных маркеров нейротоксинов.

Разработанная нами методика позволяет применять Alexa Fluor 488-меченный α -бунгаротоксин для специфического гистохимического окрашивания $\alpha 7$ nAХР в спинномозговых ганглиях. Для контроля за специфичностью взаимодействия и предотвращения возможного связывания α -бунгаротоксина с рецепторами мышечного типа нами были использованы α -кобратоксин и α -нейротоксин II, соответственно. Эффективность метода была протестирована на $\alpha 7$ -трансфицированных клетках, мембранах электрического органа ската *Torpedo*, а также срезах языка и спинномозговых ганглиев нормальных и нокаутных по гену $\alpha 7$ -субъединицы мышей.

Данный метод обладает большим разрешением по сравнению с ранее применявшейся для подобных исследований ауторадиографией, что позволило различить окрашивание плазматической мембраны нейронов и локализованное вокруг ядра окрашивание, скорее всего связанное с рецепторами в эндоплазматическом ретикулуме. Иногда рядом с окрашенными телами нейронов можно было заметить специфично меченные α -бунгаротоксином структуры, напоминающие дуги. Данное окрашивание могло соответствовать сателлитным клеткам (глиям), плотно окружающим всю поверхность нейрона. Однако эксперименты по двойному мечению цитоплазмы нейронов и $\alpha 7$ nAХР не подтвердили этого. Разработанная методика была применена для исследования распределения $\alpha 7$ nAХР на нейронах спинномозговых ганглиев грудного и поясничного отделов взрослых крыс. Для выяснения, какова функциональная роль нейронов, экспрессирующих $\alpha 7$ nAХР, мы, во-первых, измерили средний диаметр их тел и сравнили полученное распределение по размерам с таковым для всех нейронов в ганглии, во-вторых, провели двойное окрашивание срезов спинномозговых ганглиев Alexa Fluor 488-меченным α -бунгаротоксином и антителами к гистохимическим маркерам подтипов нейронов.

В совокупности полученные результаты дают основание полагать, что среди нейронов спинномозговых ганглиев всех функциональных подтипов встречаются клетки, экспрессирующие $\alpha 7$ nAХР. При этом позитивное мечение Alexa Fluor 488-меченным α -бунгаротоксином наблюдалось, в среднем, для 3,68% нейронов спинномозговых ганглиев, однако среди нейронов большого диаметра меченые клетки составляли более заметную часть – 10-12%, что согласовывалось с данными двойного окрашивания. Таким образом, анализ полученных результатов свидетельствует о возможном участии $\alpha 7$ nAХР в механорецепции.

HISTOCHEMICAL INVESTIGATION OF $\alpha 7$ NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS EXPRESSION BY DORSAL ROOT GANGLIA NEURONS USING SELECTIVE α -NEUROTOXINS

*Shelukhina I.V., Krukova E.V., Lips K.S. **, Kummer W. *, Tsetlin V.I.*

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

*Institute for Anatomy and Cell Biology, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany

**University Hospital of Giessen-Marburg, Giessen, Germany

E-mail: ivshelukhina@mail.ru

Fax: (495) 335-57-33; tel.: (495) 330-73-74

Primary afferent neurons of dorsal root ganglia (DRG) transmit sensory information from the periphery to the spinal cord. These neurons are of the pseudounipolar type, meaning they have one process dividing into the dendrite conducting nerve impulses from periphery toward the cell body and the axon conducting them away from the cell body to the spinal cord. Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) agonists excite peripheral sensory nerve fibers, but also induce analgesic effects. Such different effects of cholinergic agonists could depend on the expression of different nAChR subtypes located on DRG neurons. On the basis of binding assays, immunohistochemistry and electrophysiological studies it appears that DRG neurons possessing different functions express a distinct set of nAChRs, and mRNA of all neuronal nAChR subunits has been detected in DRG. DRG neurons are a diverse population. They differ in cell size, ultrastructure, spectrum of expressing proteins, peptide content, electrophysiological and other properties. Some characteristics of DRG neurons correlate with their functions. For example, small neurons with thin axons convey information about pain and temperature, whereas large neurons with thick axons convey mechanoreceptive information. In our study we explored which functional subtypes of DRG neurons expressed $\alpha 7$ nAChRs.

Immunohistochemistry has been the most popular tool for investigation of nAChR subunit distribution. However, recent studies with nAChR subunit knockout mice demonstrated that a large panel of antibodies is unsuitable due to unspecific staining. Thus, it is getting more popular to use neurotoxins as selective markers.

The developed protocol allows specific histochemical detection of $\alpha 7$ nAChRs in DRG utilizing Alexa Fluor 488-conjugated α -bungarotoxin (Alexa- α Bgt). We applied α -cobratoxin to control the specificity of Alexa- α Bgt binding and α -neurotoxin II to prevent the possible reaction of α -bungarotoxin to muscle-type receptors. The efficiency of the method was tested utilizing $\alpha 7$ nAChR-transfected cells, membranes from *Torpedo* electric organ, tongue and DRG sections from wild-type and $\alpha 7$ nAChR knockout mouse.

The spatial resolution is higher for the developed method than for applied earlier autoradiography. It allowed to discriminate between the labeling of neuron plasmatic membrane and granular perinuclear labeling, that possibly corresponded to the endoplasmatic reticulum.

Sometimes we could find Alexa- α Bgt labeled structures like arcs near the stained body of neuron. It could be associated with labeled satellite cells (glial cells) tightly surrounding neuron. However, further experiments demonstrated that Alexa- α Bgt binding colocalised with labeled cytoplasm of neurons for all the investigated sections and we were not able to distinguish any additional stained structures.

The method was applied to investigate the cell distribution of $\alpha 7$ nAChRs in thoracic and lumbar DRG of adult rats. To reveal the function of DRG neurons expressing $\alpha 7$ nAChRs at the first step we compared distribution histograms of mean cell diameters of Alexa- α Bgt labeled neurons and a total population of DRG neurons. At the second step we characterized Alexa- α Bgt-binding neurons by double-labeling experiments with antibodies to the histochemical markers of DRG neurons subtypes.

In total the results demonstrated that there are some cells expressing $\alpha 7$ nAChRs among DRG neurons of all the functional subtypes. The average percentage of Alexa- α Bgt labeled cells among total neurons in DRG was 3,68%. However, the $\alpha 7$ nAChRs positive cells were found more often among neurons with large diameter cell body (10-12%) and it agreed with data of double-labeling experiments. Thus, data analysis indicates the possible role of $\alpha 7$ nAChRs in mechanoreception.

ЛИПИД-БЕЛКОВЫЕ НАНОДИСКИ – УНИВЕРСАЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ, РЕНАТУРАЦИИ И СТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ И МЕМБРАНОАКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ

Шенкарев З.О.

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

Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

E-mail: zh@nmr.ru

Факс: (495) 335-50-33; тел.: (495) 330-74-83

Мембраноассоциированные и мембраноактивные белки и пептиды (МБ) играют большую роль в выполнении разнообразных биологических функций как в отдельной живой клетке, так и в целых организмах и их сообществах. Эти молекулы ответственны за энергетические процессы в клетке, межклеточную рецепцию и коммуникацию, а также за работу нервной, эндокринной и иммунной систем высших животных. Несмотря на огромную важность, в настоящее время механизмы работы многих МБ остаются плохо изученными. Основные трудности в функциональных и структурных исследованиях МБ связаны с тем, что эти биомолекулы обладают природной пространственной структурой только в присутствии биологической мембраны или подходящей мембраномоделирующей среды (мембранного миметика). Традиционно используемые мембраномоделирующие среды (органические растворители с низкой полярностью, мицеллы детергентов и небольшие сферические липид/детергентные бицеллы) обладают рядом существенных недостатков и во многих случаях не способны полноценно моделировать мембранное окружение биомолекулы. С другой стороны, системы, содержащие бислойные мембраны (липосомы, бицеллы), имеют очень большие размеры и не могут быть использованы для структурных исследований напрямую.

В настоящей работе была изучена возможность применения новой мембраномоделирующей среды – липид-белковых нанодисков (ЛБН), для стабилизации в растворе, ренатурации и структурных исследований МБ методами ЯМР спектроскопии. ЛБН представляют собой дискообразные частицы диаметром 10 нм и толщиной 4 нм [1]. Каждая из этих частиц имеет в своем составе регион бислойной мембраны (~150 липидов), стабилизированный димером апополипротеина А1 человека (apoA1). Фрагмент липидной мембраны в составе нанодиска сохраняет многие биофизические свойства настоящих бислойных систем, что обуславливает лучшие мембраномоделирующие характеристики ЛБН по сравнению с классическими мембранными миметиками.

Возможность применения ЛБН для ренатурации рекомбинантных МБ, полученных в результате гетерологической экспрессии в бактериальных клетках, была исследована на примере бактериального K^+ -канала KcsA (*Streptomyces lividans*) и фотоактивируемого протонного насоса галобактерий, – бактериородопсина (BR). KcsA, имеющий нативную тетрамерную организацию, выделенный в мягких условиях из мембран *E. coli*, был

денатурирован до мономерной формы путем осаждения с помощью трихлоруксусной кислоты и последующего растворения в жестком детергенте (SDS). Денатурированный вариант BR был получен в результате растворения телец включения *E. coli* в SDS. Денатурированные варианты обоих белков смешивали с apoA1 и липидами различного состава. Затем из этой смеси удаляли SDS с помощью специфического сорбента, в результате чего происходило самообразование нанодисков с одновременным включением исследуемых белков в мембраны ЛБН. При этом в случае KcsA наблюдалось формирование тетрамеров белка, а в случае BR при добавлении кофактора транс-ретиная определялось появление характерного пика поглощения на длине волны 550 нм, свидетельствующее об активной форме BR. Таким образом, впервые была показана применимость нанодисков для ренатурации рекомбинантных белков.

Возможность структурных исследований МБ, встроенных в мембраны ЛБН, методами спектроскопии ЯМР высокого разрешения впервые была изучена на примере KcsA, вольт-сенсорного домена потенциалзависимого K⁺-канала KvAP (VSD, *Aeropyrum pernix*) и антибиотика антиамебина I (Аам-I, *Emericellopsis minima*). ¹⁵N-Меченные аналоги этих молекул были встроены в мембраны ЛБН различного состава. Формирование стабильных комплексов, демонстрирующих изотропное вращение в растворе, было подтверждено методами гель-фильтрации и ³¹P-ЯМР спектроскопии. Для KcsA в составе ЛБН на основе DMPC, для VSD в составе ЛБН на основе DMPC и DMPG, а также для Аам-I в составе ЛБН на основе DOPG, DLPC, DMPC, POPC были измерены 2D ¹H-¹⁵N корреляционные спектры и проведено сравнение со спектрами в классических мембраномоделирующих средах. ЯМР спектры МБ, полученные в ЛБН, несмотря на значительно большую ширину ¹H^N линий, имели достаточное качество для проведения структурных исследований. В качестве примеров структурной информации, которая может быть получена для МБ в составе ЛБН, методом спинового зонда была определена топология взаимодействия Аам-I с мембранами ЛБН различного состава, а также получен спектр 3D ¹⁵N-NOESY, позволяющий измерять расстояния между протонами в молекуле пептида.

Полученные данные указывают на применимость нанодисков для стабилизации в растворе, ренатурации и структурных исследований МБ методами ЯМР спектроскопии. Возможность формирования нанодисков различного липидного состава открывает широкие перспективы для исследования мембранных белков в практически природном окружении.

Литература

1. Nath A., Atkins W.M., Sligar S.G. (2007) *Biochemistry* **46**:2059-2069.

LIPID-PROTEIN NANODISCS – VERSATILE MEDIUM FOR STABILIZATION, REFOLDING AND STRUCTURAL INVESTIGATIONS OF MEMBRANE PROTEINS AND MEMBRANE-ACTIVE PEPTIDES

Shenkarev Z.O.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

E-mail: zh@nmr.ru

Fax: (495) 335-50-33; tel.: (495) 330-74-83

Membrane-associated and membrane-active proteins and peptides (MPs) play key roles in many biological processes essential for living cells, whole organisms and their communities. These molecules are responsible for cell energetics, reception of intercellular signals, as well as for functioning of nervous, endocrine and immune systems of higher animals. Presently, in spite of large interest in this field, the molecular mechanisms of MPs functioning are not very well established. The presence of biological membrane or suitable membrane mimicking medium (membrane mimetic) is required to formation and stabilization of MPs native spatial structure, thus causing main difficulties in their functional and structural investigations. The commonly used membrane mimetics (organic solvents with low polarity, detergent micelles and small lipid/detergent bicelles) display some serious shortcomings and in many cases do not able to adequately represent membrane environment. On the other hand, the real bilayered systems (in form of vesicles or bicelles) are too large to be used directly in structural studies.

The present work is devoted to possible applications of a new membrane mimicking medium – Lipid-Protein Nanodiscs (LPNs) [1]. Each LPN particle represents a fragment of lipid bilayer (~150 lipid molecules) wrapped around by dimer of human apolipoprotein A1 (apoA1). These particles have discoid shape with characteristic dimensions of 10x4 nm. The membrane fragment of LPN particle preserves many biophysical properties of real bilayered systems, and as a result the nanodiscs display better membrane mimicking characteristics as compared to traditional media. In the course of presented work the applicability of LPNs for stabilization in solution, refolding and structural NMR investigations of MPs were investigated.

The bacterial K⁺-channel KcsA (*Streptomyces lividans*) and light-driven pump of halobacteria, – Bacteriorhodopsin (BR), were used to test the ability of LPNs to promote refolding of recombinant MPs obtained via heterologous expression in bacterial cells. KcsA in native tetrameric form was extracted from *E. coli* membranes in mild conditions. After that the protein was denatured to monomeric state via treatment of trichloroacetic acid and subsequent resolubilization in harsh detergent (SDS). The denatured variant of BR was obtained upon solubilization of *E. coli* inclusion bodies in SDS. The both proteins in denatured state were mixed with apoA1 and with lipids of various compositions. After that SDS was removed from the mixtures by special sorbent and nanodiscs with encapsulated MPs were spontaneously formed. In the case of KcsA this process led to formation of protein tetramers. The characteristic absorption at 550 nm was observed for LPN/BR samples upon addition of cofactor (trans-retinal), indicating the presence

of native BR conformation. Thus the present work gives the first successful example of nanodiscs application for refolding of recombinant proteins.

The ^{15}N -labeled analogues of KcsA, voltage sensing domain of K^+ -channel KvAP (VSD, *Aeropyrum pernix*) and membrane-active antibiotic peptide antiameobin I (Aam-I, *Emericellopsis minima*) were used to investigate for the first time the possibility of NMR structural studies for MPs encapsulated in nanodiscs membranes. These MPs were embedded in LPNs of different lipid composition. Formation of stable complexes undergoing isotropic motion in solution was confirmed by size-exclusion chromatography and ^{31}P -NMR spectroscopy. The 2D ^1H - ^{15}N -correlation spectra were recorded for KcsA in the complex with LPNs containing DMPC, for VSD in LPNs containing DMPC and DMPG, and for Aam-I in LPNs based on DOPG, DLPC, DMPC, and POPC. The spectra recorded were compared with those in detergent-containing micelles and small bicelles commonly used in high-resolution NMR spectroscopy. In spite of significantly increased ^1H line-width the spectra recorded in LPNs environment still provide quality sufficient for structural investigations. In order to give an example of structural information that can be gained in LPNs environment the topology of Aam-I in the bilayers of nanodiscs with different lipid composition was determined by using the lipid-soluble relaxation probe technique. In addition the 3D ^{15}N -NOESY spectrum of Aam-I/LPN complex was measured, indicating the possibility to measure the interproton distances in the MP associated with nanodiscs.

Obtained data indicate the applicability of LPNs for stabilization in solution, refolding and structural NMR investigations of membrane proteins and membrane-active peptides. The phospholipid composition of LPNs can be easily varied, that opens wide perspectives for investigation of membrane proteins in quasi-native environment.

Reference

1. Nath A., Atkins W.M., Sligar S.G. (2007) *Biochemistry* **46**:2059-2069.

АНТИСМЫСЛОВАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ *DROSOPHILA MELANOGASTER* НАХОДИТСЯ ПОД КОНТРОЛЕМ $\rho\text{I}\rho\text{НК}$

Шниз С.Г., Пескова Е.Ю., Калмыкова А.И.

Институт молекулярной генетики РАН, Москва

E-mail: sergey@rnai.ru

Факс: (499) 196-02-21; тел.: (499) 196-00-00

Смысловые транскрипты ретротранспозонов, т.е. те, которые служат матрицей для трансляции и транспозиции, являются мишенью особого пути РНК-интерференции (РНКи), работающего в герминальных тканях и связанного с короткими РНК класса $\rho\text{I}\rho$ interacting РНК ($\rho\text{I}\rho\text{НК}$), имеющими размер 25-29 нт. и взаимодействующими с особыми белками семейства Аргонавт, относящимися к подсемейству $\rho\text{I}\rho\text{I}$. Ключевую роль в этом процессе играют антисмысловые $\rho\text{I}\rho\text{НК}$, которые по принципу комплементарности узнают кодирующие транскрипты ретротранспозонов, подчеркивая важность антисмысловых транскриптов в регуляции экспрессии мобильных элементов. Однако происхождение, биогенез и функции антисмысловых транскриптов ретротранспозонов мало изучены. Ранее у дрозофилы двунаправленная транскрипция была показана только для *TART* и *F*-элементов. Цель исследования: охарактеризовать антисмысловые транскрипты мобильного элемента *HeT-A*, основного компонента теломер *Drosophila melanogaster*; проанализировать поведение *HeT-A*-специфических $\rho\text{I}\rho\text{НК}$ обеих полярностей на фоне мутаций генов $\rho\text{I}\rho\text{НК}$ -пути: *piwi* и *aubergine*, кодирующих белки семейства Аргонавт, а также гена *spn-E*, кодирующего РНК-хеликазу; сравнить поведение смысловых и антисмысловых транскриптов для разных мобильных элементов на фоне мутаций генов $\rho\text{I}\rho\text{НК}$ -пути.

Мы показали, что мобильный элемент *HeT-A* транскрибируется по обеим цепям, и антисмысловая транскрипция *HeT-A* регулируется в яичниках промотором, расположенным в 3'-нетранслируемой области. Интересной особенностью антисмысловых некодирующих транскриптов теломерного ретроэлемента оказалось наличие множества интронов и большого количества вариантов альтернативного сплайсинга. *HeT-A*-специфические $\rho\text{I}\rho\text{НК}$ обеих полярностей определяются в яичниках дрозофилы и исчезают на фоне мутаций в генах $\rho\text{I}\rho\text{НК}$ -пути. Эти данные указывают на то, что и смысловые, и антисмысловые транскрипты могут быть мишенью $\rho\text{I}\rho\text{НК}$. Мы показали, что антисмысловая транскрипция регулируется $\rho\text{I}\rho\text{НК}$, т.к. мутации в генах $\rho\text{I}\rho\text{НК}$ -пути приводят к накоплению антисмысловых транскриптов *TART*, *HeT-A* и *I*-элемента в ядрах питающих клеток. Совместное окрашивание РНК и ДНК ретротранспозонов показало, что транскрипты обеих полярностей накапливаются на фоне мутации *spn-E* вблизи своих геномных локусов. Также удалось выявить как смысловые, так и антисмысловые $\rho\text{I}\rho\text{НК}$ в ядерной фракции яичников. Таким образом, мы обнаружили, что $\rho\text{I}\rho\text{НК}$ -сайленсинг работает в ядре, что ранее не было показано для дрозофилы. Полуколичественный ОТ-ПЦР анализ РНК, выделенной из ядерной и

цитоплазматической фракций гетеро- и гомозигот *spn-E*, показал, что смысловые и бессмысловые транскрипты по-разному отвечают на эту мутацию. Так, смысловые транскрипты *HeT-A* и *TART* накапливаются и в ядрах, и в цитоплазме, причем в цитоплазме больше; а бессмысловые транскрипты накапливаются только в ядрах, но при этом в цитоплазме их количество не меняется. Можно предположить, что в цитоплазме бессмысловые транскрипты подвергаются дополнительной репрессии при помощи других механизмов РНК-сайленсинга. Эти результаты хорошо коррелируются с картиной, наблюдаемой при *in situ* окрашивании транскриптов *TART*, *HeT-A* и *I*-элемента. Наши данные показывают, что бессмысловые некодирующие транскрипты – важная часть системы подавления активности мобильных элементов. Являясь источником piРНК, узнающих кодирующие транскрипты, бессмысловые транскрипты сами являются мишенью piРНК-сайленсинга, формируя петлю обратной связи.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (06-04-48493) и Программы РАН по молекулярной и клеточной биологии.

piRNAs CONTROL ANTISENSE EXPRESSION OF DROSOPHILA RETROELEMENTS

Shpig S.G., Peskova E. Yu., Kalmykova A.I.

Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow

E-mail: sergey@mai.ru

Fax: (499) 196-02-21; tel.: (499) 196-00-00

Sense transcripts of retroelements, which serve as a template for transpositions, were shown to be the targets of germ line pathway associated with so called Piwi-interacting RNAs (piRNAs), associated with Argonaute proteins from the Piwi subfamily. Antisense piRNAs plays a key role in this mechanism, highlighting the importance of antisense expression in retrotransposon silencing. However, biogenesis of antisense RNAs is poorly understood. Previously, *TART* and *F*-elements bidirectional transcription was reported. We show that *HeT-A* is also bidirectionally transcribed, and the *HeT-A* antisense transcription in ovaries is regulated by a promoter localized within its 3'-untranslated region. A remarkable features of non-coding telomeric retroelement antisense transcripts is the presence of multiple introns and poly(A) tails. Retrotransposon-specific piRNAs of both polarities are present in the same tissue. Sense and antisense *HeT-A* piRNAs were shown to be unstable in the ovaries of the piRNA mutants. These data indicate that long retroelement transcripts of both directions may be considered as natural targets of the piRNA pathway. We have shown here that expression of natural antisense transcripts of retroelements is regulated by the RNA silencing machinery. This regulation occurs in the nucleus since the disruption of the piRNA pathway leads to an accumulation of *TART*, *HeT-A* and *I*-element transcripts in germ cell nuclei. All together, these facts suggest piRNA-mediated interplay of sense and antisense transcripts in the cell.

This work was supported by the RAS Program for molecular and cell biology and grant from the Russian Foundation for Basic Researches (06-04-48493).

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ ИЗ *ASPERGILLUS NIGER*

Ягольник Е.Л.

Тульский государственный университет, Тула

E-mail: apelsinka8511@rambler.ru

Биохимические и кинетические свойства глюкозооксидазы (ГЛО) достаточно хорошо изучены, тогда как информация о структурной организации и динамике конформационных изменений фермента под влиянием различных факторов, в том числе субстрата, представлена неполно. Эти исследования важны при поиске путей увеличения стабильности и чувствительности ферментов, применяемых в биосенсорных системах. В настоящей работе представлены результаты экспериментальных исследований структурных изменений ГЛО, полученных микрокалориметрическим и спектральным методами, при действии субстрата D-глюкозы и некоторых растительных полифенолов, в частности флавоноидов кверцетина и дигидрокверцетина. Показано, что плавление ГЛО характеризуется пиком теплового перехода небольшой асимметричности с $T_M = 73,8^\circ\text{C}$, полушириной $3,3^\circ\text{C}$ и энтальпией $106 \text{ кДж/К}^*\text{М}$. В присутствии субстрата выше определенной концентрации (более 1 мМ) термодинамические параметры фермента изменяются значительно, в частности, температура максимума и энтальпия перехода увеличиваются до $83,7^\circ\text{C}$ и $127,3 \text{ кДж/К}^*\text{М}$, соответственно. Присутствие флавоноидов приводит к незначительному сдвигу максимума температуры перехода в сторону ее увеличения. Спектральные измерения показали, что интенсивность триптофановой флуоресценции ГЛО увеличивается при добавлении в среду инкубации D-глюкозы, а по FAD – наоборот, снижается.

Было впервые показано, что в биосенсорных SPE-электродах с иммобилизованной на их поверхности берлинской лазурью, глюкозооксидаза в комбинации с различными флавоноидами обладает большей стабильностью и временем жизни при их использовании, что очень важно для проведения аналитических работ.

THERMODYNAMIC CHARACTERISTICS AND STRUCTURAL CHANGES OF GLUCOSE OXIDASE FROM *ASPERGILLUS NIGER*

Yagolnik E.A.

Tula State University, Tula

E-mail: apelsinka8511@rambler.ru

Although biochemical and kinetic properties of Glucose Oxidase (GOX) are, on the whole, studied adequately, the information on the structure and dynamics of conformational changes of the enzyme under the influence of various factors, including a substrate, is poorly represented. These studies are crucial in the search for ways of enhancing stability and sensitivity of enzymes used in biosensor systems.

The present work offers the results of experimental studies of structural changes of GOX which have been obtained with employment of microcalorimetric and spectral methods under the action of D-glucose and some plant polyphenols, in particular flavonoids of quercetin and dihydroquercetin.

It has been shown that melting of GOX is characterized by a peak of thermal transition with a small asymmetry where $T_M = 73,8^\circ\text{C}$, half-width, $3,3^\circ\text{C}$ and enthalpy, $106 \text{ kJ/K}^*\text{M}$. In the presence of the substrate, the concentration of which is higher than a predetermined one (more than 1 mM), thermodynamic parameters of the enzyme vary greatly, especially, the maximum temperature and enthalpy of the transition increase up to $83,7^\circ\text{C}$ and $127,3 \text{ kJ/K}^*\text{M}$, respectively. The presence of flavonoids leads to a slight shift of the maximum temperature of the transition towards its increase.

Spectral measurements show that the intensity of tryptophan fluorescence of GOX increases when D-glucose is added into incubation medium and decreases with FAD. For the first time it has been shown that in biosensor SPE-electrodes with immobilized on their surface Prussian blue, GOX in combination with various flavonoids demonstrates higher stability and longer life time period during its use, what is very important for realization of analytical works.

ОСОБЕННОСТИ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ СТЕРОИДОВ ПЛЕСНЕВЫМ ГРИБОМ *CURVULARIA LUNATA* ВКПМ F-981

Ядерец В.В.

Центр "Биоинженерия" РАН, Москва

E-mail: verayaderetz@yandex.ru

Тел.: (499) 135-30-49

Проблема синтеза гидроксилсодержащих стероидов чрезвычайно актуальна в связи с широким спектром их биологической активности. В ряде новейших исследований сообщалось о наличии у 7-гидроксистероидов противораковой, радиопротекторной, иммуностимулирующей и ноотропной активностей. Однако, эффективный способ получения 7-гидроксипроизводных стероидов, необходимый для создания целого ряда новых лекарственных препаратов, в настоящее время отсутствует. В литературных источниках имеются данные о способности к образованию 7-гидроксипроизводных в небольшом количестве у актинобактерий и плесневых грибов.

В данной работе наличие 7-гидроксилазной активности определяли у 8 штаммов плесневых грибов родов *Absidia*, *Bipolaris*, *Cunninghamella*, *Curvularia*, *Rhizopus* с известной способностью к 11 α - и 11 β -гидроксилированию. Выбор этих микроорганизмов был обусловлен анализом модели фермент-субстратного взаимодействия, предложенной для 5 α -Н-стероидов группой ученых Оксфордского университета под руководством проф. Е. Джонса.

Согласно этой модели, для направленного гидроксилирования стероидной молекулы необходимо присутствие в ней не менее двух кислородсодержащих заместителей. Предполагается существование на поверхности ферментной глобулы трех сайтов, имеющих триангулярную локализацию и выполняющих функции связывания с ферментом и гидроксилирования. Теоретически возможны 4 ориентации молекулы стероида по отношению к ферменту, из которых наиболее предпочтительны нормальная и альтернативная ориентации. При рассмотрении пространственной структуры молекул тестостерона (**I**) и дегидроэпиандростерона (**II**) видно, что при связывании фермента и стероида по С(3) и С(17) альтернативой 11-гидроксилированию является 7-гидроксилирование.

В качестве субстрата для начальной оценки предполагаемой 7-гидроксилазной активности вышеуказанных грибов использовали Δ^5 -3 β -гидроксистероид – **II**. Результаты его трансформации не противоречили вышеприведенной гипотезе – все изучаемые культуры осуществляли 7 α -гидроксилирование **II**, но с разной интенсивностью. Штамм *C. lunata* ВКПМ F-981, отличающийся высокой 11 β -гидроксилазной активностью в отношении Δ^4 -прегнанов, проявил максимальную 7 α -гидроксилазную активность в отношении **II** и его ацетата (**AII**) и был использован в трансформации шестнадцати Δ^4 -3-кето- и Δ^5 -3 β -гидроксистероидов ряда андростана и прегнана. С помощью отмытого от питательной среды и

суспендированного в фосфатном буфере мицелия этого гриба получены с количественным выходом 7 α -гидроксипроизводные андростенов **II** и **AII** при нагрузке до 10 г/л, и с выходом 35-70% при нагрузке 2-5 г/л – 7 α -гидроксипроизводные андрост-5-ен-3 β ,17 β -диола и стероидов ряда прегнана. У некоторых прегн-5-енов 7 α -гидроксилирование сопровождалось 11 β -гидроксилированием.

При трансформации Δ^4 -3-кетостероидов на направление вводимых гидроксигрупп оказывали влияние природа кислородсодержащих заместителей при С(17), либо С(20) и величина заместителя при С(17). Так, **I** (17 β -ол-3-он) при нагрузке 4 г/л гидроксилировался в 11 β -гидрокси-**I** с выходом 75%, тогда как основными продуктами трансформации Δ^4 -3,17-дикетоандростенов (андростендиона (**III**), андростадиендиона и 9 α -**III**) были 14 α -гидрокси-производные. По-видимому, связывание фермента с молекулами этих стероидов происходило в нормальной перевернутой ориентации, при которой 11 β -положение было экранировано ангулярными группами, и гидроксилирование происходило по симметричному ему 14 α -положению.

Основными продуктами трансформации изучаемых Δ^4 -3-кетопреганов были 11 β -гидроксипроизводные, а в качестве побочных соединений выделены 7 α - или 14 α -гидроксипроизводные. Мицелий *C. lunata* проявил высокую гидроксилазную активность по отношению к Δ^4 -3-кетостероидам – **III** и кортексолону, трансформация которых была выполнена при нагрузках 6.0 г/л и 20 г/л, соответственно, с выходом очищенных продуктов 50% 14 α -гидрокси-**III** и 55% гидрокортизона.

Таким образом, модель гидроксилирования, разработанная на 5 α -Н-андростанах, может быть применена и для дегидростероидов как андростанового, так и прегнанового ряда. Она также позволяет в поиске нужного штамма сократить до минимума количество исследуемых культур, которое иногда исчисляется несколькими сотнями.

FEATURES OF STEROID HYDROXYLATION BY *CURVULARIA LUNATA* VCPM F-981

Yaderetz V.V.

Center "Bioengineering" RAS, Moscow

E-mail: verayaderetz@yandex.ru

Tel.: (499) 135-30-49

The problem of synthesis of hydroxyl-containing steroids is extremely actual because of a wide spectrum of their biological activity. It was informed in a number of the newest researches that 7-hydroxysteroids have anticancer, radioprotective, immunomodulating and nootropic activities. However the effective method of obtaining of 7-hydroxylated derivatives necessary for development of a whole number of new drugs is absent in present. There are data about ability to form 7-hydroxylated derivatives in a small amount by actinobacteria and fungi. In this work the presence of 7-hydroxy activity was identified at eight strains of genus *Absidia*, *Bipolaris*, *Cunninghamella*, *Curvularia*, *Rhizopus* with known ability to 11 α - and 11 β -hydroxylation. The choice of these microorganisms has been caused by the analysis of the model of enzyme-substance interaction which was offered for 5 α -H-steroids by group of scientists under the direction of prof. E.R.H. Jones from Oxford University.

According to this model, it is necessary the presence at least two oxygen substituents for directed hydroxylation of steroid molecule. The existence on a surface of fermental globule of three sites having threeangular localisation and carrying out function of binding with enzyme and function of hydroxylation is proposed. Theoretically four orientations of steroid molecule relative to enzyme are possible and normal and alternative orientations of a molecule are most preferable. By consideration of spatial structure of molecules of testosterone (**I**) and dehydroepiandrosterone (**II**) it is visible that at enzyme and steroid linkage on C(3) и C(17) alternative 11-hydroxylation is 7-hydroxylation.

For an initial estimation assumed 7-hydroxylase activity of fungi mentioned above Δ^5 -3 β -hydroxysteroid – **II** was used. Results of its transformation did not contradict to the hypothesis of prof. E.R.H. Jones and all studied cultures carried out 7 α -hydroxylation of **II** but with different intensity. Having a high 11 β -hydroxylase activity towards Δ^4 -pregnanes strain *C. lunata* VCPM F-981 showed maximum of 7 α -hydroxylase activity to **II** and its acetate (**AII**) and it was used for transformation of sixteen Δ^4 -3-keto- and Δ^5 -3 β -hydroxysteroids of androstane and pregnane series. Using washed from a nutrient medium and slurring in the phosphatic buffer mycelium of this mold it were obtained 7 α -hydroxylated androstens **II** и **AII** at the loading 10 g/l with quantitative yield and 7 α -hydroxylated derivatives of androst-5-en-3 β ,17 β -diol and steroids of pregnane series with yield 35-70% from 2-5 g/l. 7 α -Hydroxylation of some pregn-5-ens was accompanied by 11 β -hydroxylation.

At transformation Δ^4 -3-ketosteroides the nature of oxygen substituents at C(17) or C(20) and size of the substituents at C(17) effected on a direction entered hydroxyl group. So, **I** (17 β -ol-3-one) at the loading 4 g/l was hydroxylated to 11 β -hydroxy-**I** with the yield 75%. Whereas the main products of transformation

of Δ^4 -3,17-diketoandrostene (androstenedione (**III**), androstadiendione and 9 α -**III**) were 14 α -hydroxy-derivatives. Apparently, binding of enzyme and molecules of these steroids occurred at the normal capsized orientation at which 11 β -position was shielded by angular groups and hydroxylation occurred at symmetric to it 14 α -position.

The main transformation products of studied Δ^4 -3-ketopregnanes were 11 β -hydroxylated derivatives and as by-product were 7 α - or 14 β -hydroxylated derivatives. The mycelium of *C. lunata* strain showed high hydroxylase activity towards Δ^4 -3-ketosteroids – **III** and cortexolone which transformation were made at the loadings 6.0 g/l and 20 g/l respectively with yield of purified products 50% 14 α -hydroxy-**III** and 55% hydrocortisone.

Thus, the model of hydroxylation developed on 5 α H-androstanes can be applied for dehydrosteroids of androstane and pregnane series. In searching of necessary strain it allows to reduce to a minimum quantity of investigated cultures which is sometimes estimated in several hundreds.

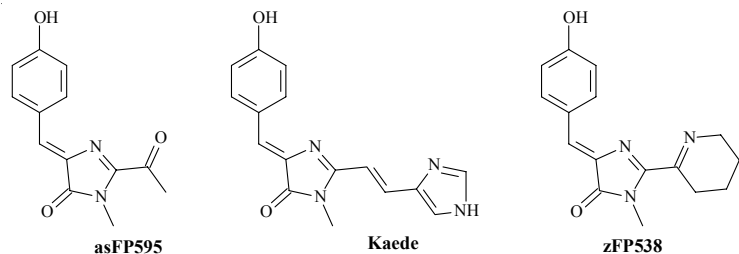
СИНТЕЗ И СВОЙСТВА МОДЕЛЬНЫХ ХРОМОФОРОВ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ

Ямпольский И.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
E-mail: imp@evrogen.ru
Тел.: (495) 429-80-20

Белки семейства зеленого флуоресцентного белка GFP широко известны благодаря уникальному механизму формирования хромофорной группы, а также возможности их использования в качестве генетически кодируемых флуоресцентных меток для прижизненной визуализации процессов жизнедеятельности отдельных клеток и целых организмов.

Нами были синтезированы хромофоры GFP-подобных белков, относящиеся к различным структурным типам: хромофор пурпурного хромобелка asFP595 (1), красного фотоконвертируемого белка Kaede (2) и желтого флуоресцентного белка zFP538 (3).



Также был синтезирован ряд структурных аналогов хромофора Kaede с целью изучить взаимосвязь: структура – спектральные свойства в данном ряду. Было обнаружено, что хромофор типа Kaede, содержащий остаток аспарагина, обладает наиболее длинноволновыми максимумами поглощения и флуоресценции.

Синтез модельных соединений позволил установить строение хромофоров в белках, изучить спектральные характеристики природных и неприродных имидазолонов, моделировать влияние белкового окружения. В перспективе модельные соединения могут быть использованы при изучении механизмов созревания и функционирования хромофоров, а также с целью создания новых флуоресцентных красителей с уникальными свойствами.

Литература

1. Yampolsky, I.V., Remington, S.J., Martynov, V.I., et al. (2005) *Biochemistry*, **44**, P.5788-5793.
2. Yampolsky, I.V., Kislukhin, A.A., Amatov, T.T., et al. (2008) *Bioorganic Chemistry*, **36**, P.96-104.
3. Yampolsky I.V., Balashova T.A., and Lukyanov K.A. (2009) *Biochemistry*, in press.

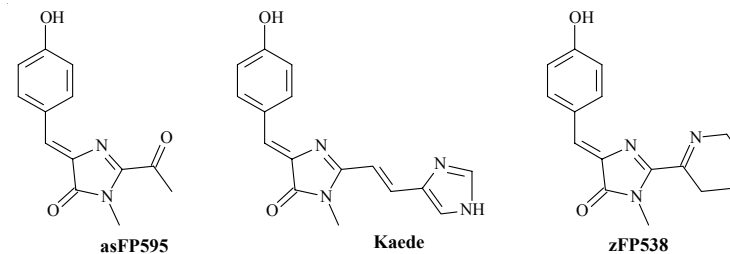
SYNTHESIS AND PROPERTIES OF THE MODEL CHROMOPHORES OF FLUORESCENT PROTEINS

Yampolsky I.V.

Shemiakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow
E-mail: imp@evrogen.ru
Tel.: (495) 429 80 20

The proteins of the Green Fluorescent Protein (GFP) family are widely known due to the unique mechanism of chromophore formation. They are extensively used as genetically encoded fluorescent tags for *in vivo* imaging in cells and entire organisms.

We synthesized chromophores of GFP-like proteins belonging to different structural types: the chromophore of the purple chromoprotein asFP595 (1), red photoconvertible protein Kaede (2) and yellow fluorescent protein zFP538 (3).



We have also synthesized several structural analogs of the Kaede chromophore to study the structure – spectral properties relationship within this range of compounds. We found that a Kaede-like chromophore containing asparagine residue possesses the most red-shifted absorption and fluorescence maxima.

Synthesis of model compounds allowed to establish chromophore structures within native proteins, to study spectral characteristics of natural and non-natural chromophores and to model the protein shell effect on spectral properties. Our future studies will focus on using model compounds to study mechanisms of chromophore maturation and functioning, and on creating novel fluorescent dyes with unique properties.

References

1. Yampolsky, I.V., Remington, S.J., Martynov, V.I., et al. (2005) *Biochemistry*, **44**, P.5788-5793.
2. Yampolsky, I.V., Kislukhin, A.A., Amatov, T.T., et al. (2008) *Bioorganic Chemistry*, **36**, P.96-104.
3. Yampolsky I.V., Balashova T.A., and Lukyanov K.A. (2009), *Biochemistry*, in press.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абдуллин Т.И.	168	Виноградова Т.В.	117	Зубов В.П.	192	Майзель М.Л.	49, 53
Абрамов Ю.А.	102	Водовозова Е.Л.	113, 254	Зубцова Ж.И.	85	Мануйлова Е.Г.	134
Ажикина Т.Л.	216	Воеводская О.А.	34	Ибрагимов Б.Т.	239	Маркова Ж.Г.	134
Акимов М.Г.	3	Волкова Т.Д.	95	Игнатов Д.В.	216	Мартынов В.И.	179
Александрова И.Ю.	95	Волынский П.Е.	145	Исламов Р.Р.	202	Марченко А.Н.	157
Алимова Ф.К.	236	Вольпина О.М.	95	Кабешев Б.О.	89	Медвинская Н.И.	95
Алферов С.В.	34	Воробьева Н.Е.	38	Калинина Н.И.	223	Мельник Б.С.	59
Андрианова Е.П.	7	Воротников А.В.	247	Калмыкова А.И.	271	Мельникова Д.Н.	137
Анохин К.В.	161	Вохмянина О.А.	41	Каманин С.С.	91	Мерзляк Е.М.	190
Антипин А.А.	157	Высоких М.Ю.	161	Камынина А.В.	95	Мингалеева Р.Н.	141
Апт А.С.	216	Гвоздев В.А.	69, 102, 110	Кандыба А.Г.	113	Минеев К.С.	49, 130, 145
Арефьева А.С.	10	Георгиева С.Г.	38	Капустин Д.В.	192	Миропольская Н.А.	149
Арляпов В.А.	91	Герасимов Н.Ю.	45	Каравайко Г.И.	73	Митькевич О.В.	157
Арсеньев А.С.	49, 53, 120, 130, 145, 175	Глинка Е.М.	10	Карнова Л.С.	98	Митяев М.В.	117
Артемченко Е.О.	49, 53	Гогвадзе Е.В.	226	Картель Н.А.	26	Михеева Э.Р.	153
Асеев Л.В.	14	Голощапов А.Н.	45	Касимова Т.Д.	106	Мологковская И.М.	254
Бабич О.О.	219	Гончарук М.В.	49	Кашеверов И.Е.	130	Морозкина Е.В.	157
Балалаева И.В.	81, 153	Гончарук С.А.	49, 53	Кибанов М.В.	69, 102	Морозова С.А.	200
Баландин С.В.	137, 172	Гранфис К.	113	Кирпичников М.П.	49, 53, 130, 161, 183	Морозова Ю.А.	196
Бантыш О.Б.	18	Гривенникова В.Г.	183	Киясов А.П.	202, 256	Музафаров Е.Н.	98
Барачевский В.А.	21, 126	Гулий О.И.	57	Копанцев Е.П.	117	Муфазалов И.А.	161
Беликов Н.Е.	21, 126	Гуреев С.А.	89	Кораблёва Н.В.	106	Мухамедьяров М.А.	202
Белоусов В.В.	247	Гурьянов С.Г.	59	Корбут А.П.	110	Нагорных М.О.	165
Белугин Б.В.	23	Деев С.М.	81	Короев Д.О.	95	Нгуен В.Т.	34
Беневоленский С.В.	157	Демина О.В.	21, 126	Костанян И.А.	30	Недоспасов С.А.	161
Бердичевец И.Н.	26	Дзангиев Б.Б.	210	Краюшкин М.М.	21	Некрасова О.В.	232
Блатт Н.Л.	256	Дидук С.В.	61	Кременчугская С.Р.	7	Нестерова И.В.	95
Бобкова Н.В.	95	Дидыч Д.А.	65	Круглов А.А.	161	Никитина И.И.	168
Бовин Н.В.	41, 113	Долгих Д.А.	130, 161, 183	Крюкова Е.В.	95, 263	Носиков В.В.	134
Богатова О.В.	30	Егорова К.С.	69	Кузнецова Н.Р.	113	Овчинников Л.П.	59
Бондарь О.В.	168	Еремеев А.В.	260	Кузьмин Д.В.	117	Овчинникова Т.В.	137, 172
Бони И.В.	14	Ермолук Я.С.	49, 53	Кузьмичёв П.К.	53, 120	Оленина Л.В.	69
Бонцевич Д.Н.	89	Ефименко А.Ю.	223	Кульбачинский А.В.	149	Оленкина О.М.	69
Борисов В.В.	7	Ефремов Р.Г.	145	Куммер В.	263	Островерхова Т.В.	183
Бочаров Э.В.	49, 53, 145	Жердев А.В.	210	Купраш Д.В.	161	Пазынина Г.В.	41
Буздин А.А.	18, 226	Журавлева А.Е.	73	Курек Д.В.	124	Пантелеев П.В.	172
Булатов Э.Р.	168	Зараева Г.А.	77	Кутышенко В.П.	59	Парамонов А.С.	130, 175
Бурлакова Е.Б.	45	Захарова М.В.	165	Кушниров В.В.	157	Парфенова Е.В.	223
Бурьянов Я.И.	98	Захарченко Н.С.	98	Лавров С.А.	102, 110	Пасюкова Е.Г.	206
Валякина Т.И.	214	Зацепина О.В.	10	Лаптев А.В.	21, 126	Пахомов А.А.	179
Варламов В.П.	124	Зворыкина С.В.	161	Леспино Д.	113	Пеньков Д.Н.	161
Васильков А.Ю.	89	Здобнова Т.А.	81	Липкин В.М.	30	Пепелина Т.Ю.	183
Виноградов А.Д.	183	Земцов Р.В.	21, 126	Липс К.С.	263	Пескова Е.Ю.	271
		Золотухина Т.В.	134	Лукин А.Ю.	21, 126	Петровская Л.Е.	120
				Люкманова Е.Н.	130, 175	Пиотровский М.С.	187
						Плескова С.Н.	153

Плетнев В.З.	190	Ткачук В.А.	223
Плетнева Н.В.	190	Тоневицкий А.Г.	200
Плетюшкина О.Ю.	161	Тоукач Ф.В.	243
Поздеев В.И.	30	Трофимов Д.Ю.	200
Просеков А.Ю.	219	Тюрин-Кузьмин П.А.	247
Простякова Л.И.	192	Фейзханова Г.У.	250
Пустовалова Ю.Е.	49, 145	Филимонов В.В.	59
Ракитина Т.В.	30	Филиппова М.А.	85, 250
Рапопорт Е.М.	41	Финкина Е.И.	137, 172
Рафаилова Э.А.	196	Фолимонов А.С.	7
Ребриков Д.В.	200	Ходонов А.А.	21, 126
Ризванов А.А.	202, 256	Холоденко И.В.	254
Рубина А.Ю.	85, 250	Холоденко Р.В.	254
Рыбина О.Ю.	206	Цаплина И.А.	73
Савватеева Е.Н.	85	Цетлин В.И.	95, 130, 263
Самохин А.Н.	95	Цыбульская М.В.	85
Сапожников А.М.	10	Чепурнова М.А.	98
Сафенкова И.В.	210	Черняк Б.В.	161
Сафронова Н.М.	247	Черткова Р.В.	161, 183
Свердлов Е.Д.	117, 216	Чудаков Д.М.	190
Северинов К.В.	165	Чупин В.В.	53, 120
Северов В.В.	41	Шалгунов В.С.	95
Севрин Ш.	113	Шафигуллина А.К.	256
Семисотнов Г.В.	59	Швец В.И.	21, 126
Серёгин Ю.А.	134	Шевкоплас Е.В.	200
Скворцов Е.В.	196	Шейна Ю.И.	260
Скворцов Т.А.	216	Шелухина И.В.	95, 263
Скулачев В.П.	161	Шенкарев З.О.	130, 175, 267
Смирнова Е.В.	30	Шидловский Ю.В.	38
Смирнова К.В.	61	Шилова Н.В.	134
Соболь А.Г.	49	Шингарова Л.Н.	175
Соболь В.А.	53	Шошина Н.С.	214
Солдатова Л.С.	219	Шпаковский Г.В.	26
Солонин А.С.	165	Шпиз С.Г.	271
Спивак С.Г.	26	Шулепко М.А.	130
Старостина Е.Е.	223	Шульга А.А.	49, 53
Сунцова М.В.	226	Щербо Д.	190
Сурина Е.Р.	157	Эльдаров М.А.	7
Суханова Ю.А.	228	Эрлих Г.	124
Тагвей А.И.	232	Юдина Н.Ю.	91
Тазетдинова Д.И.	236	Юлдашев А.М.	239
Тер-Аванесян М.Д.	157	Ягольник Е.Л.	274
Тиялбаев К.З.	239	Ядерец В.В.	276
Тимченко А.А.	59	Ялвач М.Э.	256
Тихонов Р.В.	53	Ямпольский И.В.	280
Ткач Е.Н.	49, 145		

AUTHOR INDEX

Abdullin T.I.	170	Demina O.V.	22, 128
Abramov Y.A.	104	Deyev S.M.	83
Akimov M.G.	5	Diduk S.V.	63
Aleksandrova I.Ju.	97	Didych D.A.	67
Alferov S.V.	36	Dolgikh D.A.	132, 163, 185
Alimova F.K.	238	Dzantiev B.B.	212
Andrianova E.P.	9	Efimenko A. Yu.	225
Anokhin K.V.	163	Efremov R.G.	147
Antipin A.A.	159	Egorova K.S.	71
Apt A.S.	218	Ehrlich H.	125
Arefieva A.S.	12	Eldarov M.A.	9
Arlyapov V.A.	93	Eremeev A.V.	262
Arseniev A.S.	51, 55, 122, 132, 147, 177	Ermolyuk Ya.S.	51, 55
Artemenko E.O.	51, 55	Feyzkhanova G.U.	252
Aseev L.V.	16	Filimonov V.V.	60
Azhikina T.L.	218	Filippova M.A.	87, 252
Babich O.O.	221	Finkina E.I.	139, 174
Balalaeva I.V.	83, 155	Folimonov A.S.	9
Balandin S.V.	139, 174	Georgieva S.G.	40
Bantysh O.B.	20	Gerasimov N.Yu.	47
Barachevsky V.A.	22, 128	Glinka E.M.	12
Belikov N.E.	22, 128	Gogvadze E.V.	227
Belousov V.V.	249	Goloshchapov A.N.	47
Belugin B.V.	25	Goncharuk M.V.	51
Benevolensky S.V.	159	Goncharuk S.A.	51, 55
Berdichevets I.N.	28	Grandfils	115
Blatt N.L.	258	Grivennikova V.G.	185
Bobkova N.V.	97	Guliy O.I.	58
Bocharov E.V.	51, 55, 147	Gureev S.A.	90
Bogatova O.V.	32	Guryanov S.G.	60
Bondar O.V.	170	Gvozdev V.A.	71, 104, 112
Boni I.V.	16	Ibragimov B.T.	241
Bontsevich D.N.	90	Ignatov D.V.	218
Borisov V.V.	9	Islamov R.R.	204
Bovin N.V.	43, 115	Kabeshhev B.O.	90
Bulatov E.R.	170	Kalinina N.I.	225
Burlakova E.B.	47	Kalmykova A.I.	273
Buryanov Ya.I.	100	Kamanin S.S.	93
Buzdin A.A.	20, 227	Kamynina A.V.	97
Chepurnova M.A.	100	Kandyba A.G.	115
Chernyak B.V.	163	Kapustin D.V.	194
Chertkova R.V.	163, 185	Karavaiko G.I.	75
Chudakov D.M.	191	Karnova L.S.	100
Chupin V.V.	55, 122	Kartel N.A.	28

Kasheverov I.E.	132	Miropolskaya N.A.	151	Rubina A.Yu.	87, 252	Tikhonov R.V.	55
Kasimova T.D.	108	Mitkevich O.V.	159	Rybina O.U.	208	Tilyabaev K.Z.	241
Khodonov A.A.	22, 128	Mityaev M.V.	119	Safenkova I.V.	212	Timchenko A.A.	60
Kholodenko I.V.	255	Molotkovskaya I.M.	255	Safronova N.M.	249	Tkach E.N.	51, 147
Kholodenko R.V.	255	Morozkina E.V.	159	Samokhin A.N.	97	Tkachuk V.A.	225
Kibanov M.V.	71, 104	Morozova S.A.	201	Sapozhnikov A.M.	12	Tonevitsky A.G.	201
Kirpichnikov M.P.	51, 55, 132, 163, 185	Morozova U.A.	198	Savvateeva E.N.	87	Toukach F.V.	245
Kiyasov A.P.	204, 258	Mufazalov I.A.	163	Schulga A.A.	51, 55	Trofimov D.Y.	201
Koozmin D.V.	119	Mukhamedyarov M.A.	204	Semisotnov G.V.	60	Tsaplina I.A.	75
Kopantsev E.P.	119	Muzafarov E.N.	100	Seryogin Yu.A.	136	Tsetlin V.I.	97, 132, 265
Korablyova N.V.	108	Nagornyykh M.O.	167	Severin V.V.	167	Tsybul'skaya M.V.	87
Korbut A.P.	112	Nedospasov S.A.	163	Severov V.V.	43	Tyurin-Kuzmin P.A.	249
Koroev D.O.	97	Nekrasova O.V.	234	Sevrin C.	115	Valyakina T.I.	215
Kostanyan I.A.	32	Nesterova I.V.	97	Shafigullina A.K.	258	Varlamov V.P.	125
Krayushkin M.M.	22	Nguyen V.T.	36	Shalgunov V.S.	97	Vasilkov A.U.	90
Kremenchugskaya S.R.	9	Nikitina I.I.	170	Shcherbo D.	191	Vinogradov A.D.	185
Kruglov A.A.	163	Nosikov V.V.	136	Sheina J.I.	262	Vinogradova T.V.	119
Krukova E.V.	97, 265	Olenina L.V.	71	Shelukhina I.V.	97, 265	Vodovozova E.L.	115, 255
Kulbachinskiy A.V.	151	Olenkina O.M.	71	Shenkarev Z.O.	132, 177, 269	Voevodskaya O.A.	36
Kummer W.	265	Ostroverkhova T.V.	185	Shevkopyas E.V.	201	Vokhmyanina O.A.	43
Kuprash D.V.	163	Ovchinnikov L.P.	60	Shidlovskii Yu.V.	40	Volkova T.D.	97
Kurek D.V.	125	Ovchinnikova T.V.	139, 174	Shilova N.V.	136	Volpina O.M.	97
Kushnirov V.V.	159	Pakhomov A.A.	181	Shingarova L.N.	177	Volynsky P.E.	147
Kutyshenko V.P.	60	Pantelev P.V.	174	Shoshina N.S.	215	Vorobyeva N.E.	40
Kuzmichev P.K.	55, 122	Paramonov A.S.	132, 177	Shpakovski G.V.	28	Vorotnikov A.V.	249
Kuznetsova N.R.	115	Parfenova E.V.	225	Shpiz S.G.	273	Vyssokikh M.Y.	163
Laptev A.V.	22, 128	Pasyukova E.G.	208	Shulepko M.A.	132	Yaderetz V.V.	278
Lavrov S.A.	104, 112	Pazynina G.V.	43	Shvets V.I.	22, 128	Yagolnik E.A.	275
Lespineux D.	115	Penkov D.N.	163	Simonova M.A.	215	Yalvac M.E.	258
Lipkin V.M.	32	Pepelina T.Y.	185	Skulachev V.P.	163	Yampolsky I.V.	281
Lips K.S.	265	Peskova E.Yu.	273	Skvortsov T.A.	218	Yudina N.Yu.	93
Lukin A. Yu.	22, 128	Petrovskaya L.E.	122	Skvortcov E.V.	198	Yuldashev A.M.	241
Lyukmanova E.N.	132, 177	Piotrovsky M.S.	189	Smirnova E.V.	32	Zakharchenko N.S.	100
Manuylova E.G.	136	Pleskova S.N.	155	Smirnova K.V.	63	Zakharova M.V.	167
Marchenko A.N.	159	Pletjushkina O.Y.	163	Sobol A.G.	51	Zaraeva G.A.	79
Markova J.G.	136	Pletnev V.Z.	191	Sobol V.A.	55	Zatsepina O.V.	12
Martynov V.I.	181	Pletneva N.V.	191	Soldatova L.S.	221	Zdobnova T.A.	83
Mayzel M.L.	51, 55	Pozdeev V.I.	32	Solonin A.S.	167	Zemtsov R.V.	22, 128
Medvinskaya N.I.	97	Prosekov A.J.	221	Spivak S.G.	28	Zherdev A.V.	212
Melnik B.S.	60	Prostyakova A.I.	194	Starostina E.E.	225	Zhuravleva A.E.	75
Melnikova D.N.	139	Pustovalova Yu.E.	51, 147	Suhanova Yu.A.	230	Zolotuchina T.V.	136
Merzlyak E.M.	191	Rafailova E.A.	198	Suntsova M.V.	227	Zubov V.P.	194
Mikheeva E.R.	155	Rakitina T.V.	32	Surina E.R.	159	Zubtsova Z.I.	87
Mineev K.S.	51, 132, 147	Rapoport E.M.	43	Sverdlov E.D.	119, 218	Zworykina S.V.	163
Mingaleeva R.N.	143	Rebrikov D.V.	201	Tagvey A.I.	234		
		Rizvanov A.A.	204, 258	Tazetdinova D.I.	238		
				Ter-Avanesyan M.D.	159		

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

МЕТАБОЛИЗМ N-АЦИЛДОФАМИНОВ В ТКАНЯХ И КЛЕТКАХ ЖИВОТНЫХ <i>Акимов М.Г.</i>	3
METABOLISM OF N-ACYLDOPAMINES IN ANIMAL TISSUES AND CELLS <i>Akimov M.G.</i>	5
ПРОДУКЦИЯ ПОЛИЭПИТОПНОГО БЕЛКА ВИРУСА ЯЩУРА В БАКТЕРИЯХ И РАСТЕНИЯХ С ЦЕЛЮ ПОЛУЧЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ <i>Андреанова Е.П., Кременчугская С.Р., Борисов В.В., Эльдаров М.А., Фолимонов А.С.</i>	7
PRODUCTION OF FMDV POLYEPITOPRE PROTEIN IN BACTERIA AND PLANTS AS A POTENTIAL VACCINE <i>Andrianova E.P., Kremenchugskaya S.R., Borisov V.V., Eldarov M.A., Folimonov A.S.</i>	9
КОНСТРУИРОВАНИЕ НОВОГО ВЕКТОРА ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ETA-EGFP ГИБРИДНОГО БЕЛКА И ЕГО ЭФФЕКТЫ В КЛЕТКАХ HeLa <i>Арефьева А.С., Глинка Е.М., Сапожников А.М., Зацепина О.В.</i>	10
CONSTRUCTION OF THE NOVEL VECTOR FOR EXPRESSION OF ETA-EGFP FUSION PROTEIN AND ITS EFFECTS IN HeLa CELLS <i>Arefieva A.S., Glinka E.M., Sapozhnikov A.M., Zatsepina O.V.</i>	12
РЕГУЛЯЦИЯ ОПЕРОНА <i>rpsB-tsf</i> , КОДИРУЮЩЕГО РИБОСОМНЫЙ БЕЛОК S2 И ФАКТОР ЭЛОНГАЦИИ Ts <i>Асеев Л.В., Бони И.В.</i>	14
REGULATION OF THE <i>rpsB-tsf</i> OPERON ENCODING RIBOSOMAL PROTEIN S2 AND ELONGATION FACTOR Ts <i>Asseev L.V., Boni I.V.</i>	16
НОВОЕ СЕМЕЙСТВО МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА, ОБРАЗОВАННОЕ ПРИ ЗАХВАТЕ ПЕРВОГО ЭКЗОНА ГЕНА <i>MAST2</i> РЕТРОТРАНСПОЗОНОМ SVA <i>Бантыш О.Б., Буздин А.А.</i>	18
NOVEL FAMILY OF HUMAN TRANSPOSABLE ELEMENTS FORMED DUE TO A FUSION OF THE FIRST EXON OF GENE <i>MAST2</i> WITH RETROTRANSPOSON SVA <i>Bantysh O.B., Buzdin A.A.</i>	20
СИНТЕЗ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ДИАРИЛЭТЕНОВЫХ АНАЛОГОВ РЕТИНАЛЯ <i>Беликов Н.Е., Лантев А.В., Земцов Р.В., Лукин А.Ю., Демина О.В., Барачевский В.А., Краюшкин М.М., Швец В.И., Ходонов А.А.</i>	21

SYNTHESIS AND SPECTRAL PROPERTIES OF DIARYLETHENE RETINAL ANALOGS <i>Belikov N.E., Laptev A.V., Zemtsov R.V., Lukin A.Yu., Demina O.V., Barachevsky V.A., Krayushkin M.M., Shvets V.I., Khodonov A.A.</i>	22
ЛОКАЛИЗАЦИЯ PIP-АКВАПОРИНОВ В СТЕРИН-ОБОГАЩЕННЫХ ДОМЕНАХ ПЛАЗМАЛЕММЫ <i>Белугин Б.В.</i>	23
PIP-AQUAPORIN LOCALIZATION IN STEROL-ENRICHED PLASMA MEMBRANE DOMAINS <i>Belugin B.V.</i>	25
КЛЮЧЕВОЙ ФЕРМЕНТ СТЕРОИДОГЕНЕЗА ЖИВОТНЫХ ФУНКЦИОНИРУЕТ В РАСТЕНИЯХ, ПОВЫШАЯ ИММУНИТЕТ И УСКОРЯЯ ПРОЦЕССЫ РОСТА И РАЗВИТИЯ <i>Бердичевец И.Н., Спивак С.Г., Картель Н.А., Шпаковский Г.В.</i>	26
KEY ENZYME OF ANIMAL STEROIDOGENESIS CAN FUNCTION IN PLANTS IMPROVING THEIR IMMUNITY AND INCREASING THE PROCESSES OF GROWTH AND DEVELOPMENT <i>Berdichevets I.N., Spivak S.G., Kartel N.A., Shpakovski G.V.</i>	28
НОВЫЙ БЕЛОК ГАПОНИН В КЛЕТКАХ CHO-K1 ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С ГАРДН И ЛОКАЛИЗУЕТСЯ В ЯДРЕ КЛЕТКИ <i>Богатова О.В., Ракитина Т.В., Смирнова Е.В., Поздеев В.И., Липкин В.М., Костанян И.А.</i>	30
NEW PROTEIN HAPONIN IN CHO-K1 INTERACTING WITH GAPDH IS LOCALIZED IN CELL NUCLEUS <i>Bogatova O.V., Rakitina T.V., Smirnova E.V., Pozdeev V.I., Lipkin V.M., Kostanyan I.A.</i>	32
ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ГЕНЕРАЦИЮ ЭДС В МИКРОБНОМ БИОТОПИВНОМ ЭЛЕМЕНТЕ <i>Воеводская О.А., Нгуен В.Т., Алферов С.В.</i>	34
TEMPERATURE EFFECT ON THE EMF GENERATION IN THE MICROBIAL FUEL CELL <i>Voevodskaya O.A., Nguen V.T., Alferov S.V.</i>	36
НОВЫЙ МЕХАНИЗМ АКТИВАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ПРИ ПОМОЩИ СУПЕРКОМПЛЕКСА BTFLy, ОБЪЕДИНЯЮЩЕГО КОАКТИВАТОРЫ TFIIID И БРАНМА <i>Воробьева Н.Е., Шидловский Ю.В., Георгиева С.Г.</i>	38
NOVEL MECHANISM OF TRANSCRIPTION ACTIVATION BY BTFLy SUPERCOMPLEX COMBINING TFIIID AND BRAHMA COATIVATORS <i>Vorobyeva N.E., Shidlovskii Yu.V., Georgieva S.G.</i>	40

УГЛЕВОДСВЯЗЫВАЮЩИЙ ПАТТЕРН КЛЕТОЧНЫХ ГАЛЕКТИНОВ ЧЕЛОВЕКА ТАНДЕМНОГО ТИПА <i>Вохмянина О.А., Рапопорт Е.М., Пазынина Г.В., Северов В.В., Бовин Н.В.</i>	41
CARBOHYDRATE-BINDING PATTERN OF HUMAN TANDEM-REPEAT-TYPE CELLULAR GALECTINS <i>Vokhmyanina O.A., Rapoport E.M., Pazyнина G.V., Severov V.V., Bovin N.V.</i>	43
РОЛЬ СТРУКТУРЫ МЕМБРАН ПРИ РАЗВИТИИ ДЕМЕНЦИИ АЛЬЦГЕЙМЕРОВСКОГО ТИПА И ЕЕ ТЕРАПИИ <i>Герасимов Н.Ю., Голощапов А.Н., Буракова Е.Б.</i>	45
MEMBRANES STRUCTURE ROLE DURING ALZHEIMER'S-LIKE DEMENTIA PROGRESSION AND THERAPY <i>Gerasimov N.Yu., Goloshchaporov A.N., Burlakova E.B.</i>	47
СТРУКТУРНАЯ БИОЛОГИЯ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ФРАГМЕНТОВ РЕЦЕПТОРНЫХ ТИРОЗИНКИНАЗ: НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ <i>Гончарук М.В., Ермолюк Я.С., Шульга А.А., Гончарук С.А., Ткач Е.Н., Пустовалова Ю.Е., Майзель М.Л., Минеев К.С., Бочаров Э.В., Артеменко Е.О., Соболев А.Г., Арсеньев А.С., Кирпичников М.П.</i>	49
STRUCTURAL BIOLOGY OF RECEPTOR TYROSINE KINASES TRANSMEMBRANE FRAGMENTS: NEW INSIGHT INTO MOLECULAR BASIS OF MEMBRANE PROTEINS FUNCTION <i>Goncharuk M.V., Ermolyuk Ya.S., Schulga A.A., Goncharuk S.A., Tkach E.N., Pustovalova Yu.E., Mayzel M.L., Mineev K.S., Bocharov E.V., Artemenko E.O., Sobol A.G., Arseniev A.S., Kirpichnikov M.P.</i>	51
БАКТЕРИАЛЬНЫЙ СИНТЕЗ, ОЧИСТКА И РЕФОЛДИНГ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ <i>Гончарук С.А., Ермолюк Я.С., Шульга А.А., Тихонов Р.В., Майзель М.Л., Соболев В.А., Бочаров Э.В., Кузьмичев П.К., Чупин В.В., Артеменко Е.О., Арсеньев А.С., Кирпичников М.П.</i>	53
BACTERIAL SYNTHESIS, PURIFICATION AND REFOLDING OF FULL-LENGTH MEMBRANE PROTEINS <i>Goncharuk S.A., Ermolyuk Ya.S., Schulga A.A., Tikhonov R.V., Mayzel M.L., Sobol V.A., Bocharov E.V., Kuzmichev P.K., Chupin V.V., Artemenko E.O., Arseniev A.S., Kirpichnikov M.P.</i>	55
ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕКТРООПТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ СУСПЕНЗИЙ КЛЕТОК <i>ESCHERICHIA COLI</i> ПРИ ДЕЙСТВИИ АМПИЦИЛЛИНА <i>Гулий О.И.</i>	57
ELECTROOPTICAL PARAMETERS OF AMPICILLIN-TREATED <i>ESCHERICHIA COLI</i> CELL SUSPENSIONS <i>Guliy O.I.</i>	58

МАЖОРНЫЙ БЕЛОК мРНК УВ-1: СТРУКТУРНЫЕ И АССОЦИАТИВНЫЕ СВОЙСТВА <i>Гурьянов С.Г., Мельник Б.С., Филимонов В.В., Тимченко А.А., Кутышенко В.П., Овчинников Л.П., Семисотнов Г.В.</i>	59
MAJOR mRNP PROTEIN УВ-1: STRUCTURAL AND ASSOCIATION PROPERTIES <i>Guryanov S.G., Melnik B.S., Filimonov V.V., Timchenko A.A., Kutyshenko V.P., Ovchinnikov L.P., Semisotnov G.V.</i>	60
РОЛЬ МУТАЦИЙ В ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ОНКОГЕНА <i>LMP1</i> ВИРУСА ЭПШТЕЙНА-БАРР <i>Дидук С.В., Смирнова К.В.</i>	61
ROLE MUTATIONS OF EPSTEIN-BARR VIRUS ONCOGENE <i>LMP1</i> IN ITS FUNCTIONAL ACTIVITY <i>Diduk S.V., Smirnova K.V.</i>	63
ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КАРТИРОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ЛОКУСЕ <i>FXVD5-COX7A1</i> ХРОМОСОМЫ 19 ЧЕЛОВЕКА <i>Дидыч Д.А.</i>	
IDENTIFICATION AND MAPPING OF REGULATORY ELEMENTS WITHIN <i>FXVD5-COX7A1</i> LOCUS ON HUMAN CHROMOSOME 19 <i>Didych D.A.</i>	67
ВЫЯСНЕНИЕ МЕХАНИЗМА ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ БЕЛКА STELLATE В СЕМЕННИКАХ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> <i>Егорова К.С., Кибанов М.В., Оленкина О.М., Гвоздев В.А., Оленина Л.В.</i>	69
REVEALING THE MECHANISM OF PATHOGENETIC ACTION OF STELLATE PROTEIN IN TESTES OF <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> <i>Egorova K.S., Kibanov M.V., Olenkina O.M., Gvozdev V.A., Olenina L.V.</i> ...	71
ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ПЕРЕСТРОЙКИ У ТЕРМОФИЛЬНЫХ СУЛЬФОБАЦИЛЛ, ИНДУЦИРУЕМЫЕ РАЗЛИЧНЫМИ ФАКТОРАМИ <i>Журавлева А.Е., Цаплина И.А., Каравайко Г.И.</i>	73
PHENOTYPIC REORGANIZATION INDUCED BY VARIOUS FACTORS IN THERMOPHILIC SULFOBACILLI <i>Zhuravleva A.E., Tsaplina I.A., Karavaiko G.I.</i>	75
ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРЕКРЕСТНО-ШИТОГО ГИДРОГЕЛЯ <i>Зараева Г.А.</i>	77
CHEMICAL MODIFICATION OF HYALURONIC ACID FOR CROSS-LINKED HYDRONELS <i>Zaraeva G.A.</i>	79
БИКОНЪЮГАТЫ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК <i>IN VITRO</i> И <i>IN VIVO</i> <i>Здобнова Т.А., Балалаева И.В., Деев С.М.</i>	81

BIOCONJUGATED QUANTUM DOTS FOR <i>IN VITRO</i> AND <i>IN VIVO</i> CANCER CELLS IMAGING <i>Zdobnova T.A., Balalaeva I.V., Deyev S.M.</i>	83
ОДНОВРЕМЕННЫЙ АНАЛИЗ ДЕВЯТИ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ОНКОМАРКЕРОВ НА БИОЛОГИЧЕСКОМ МИКРОЧИПЕ <i>Зубцова Ж.И., Савватеева Е.Н., Филиппова М.А., Цыбульская М.В., Рубина А.Ю.</i>	85
SIMULTANEOUS ANALYSIS OF SEROLOGICAL ONCOLOGICAL MARKERS ON BIOLOGICAL MICROCHIP <i>Zubtsova Z.I., Savvateeva E.N., Filippova M.A., Tsybul'skaya M.V., Rubina A.Yu.</i>	87
НОВЫЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ ХИРУРГИЧЕСКИЙ ШОВНЫЙ МАТЕРИАЛ <i>Кабешев Б.О., Бонцевич Д.Н., Гуреев С.А., Васильков А.Ю.</i>	89
NEW ANTIBACTERIAL SURGICAL SUTURAL MATERIAL <i>Kabeshev B.O., Bontsevich D.N., Gureev S.A., Vasilkov A.U.</i>	90
РАЗРАБОТКА МАКЕТА БПК-БИОСЕНСОРА ПРОТОЧНО-ИНЖЕКЦИОННОГО ТИПА НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕВЫХ ШТАММОВ <i>CANDIDA MALTOSA</i> , <i>CANDIDA BLANKII</i> И <i>DEBARYOMYCES HANSENI</i> <i>Каманин С.С., Юдина Н.Ю., Арляпов В.А.</i>	91
DEVELOPMENT OF FLOWING-INJECTIVE BOD-BIOSENSOR MODEL ON BASIS OF YEAST STRAINS <i>CANDIDA MALTOSA</i> , <i>CANDIDA BLANKII</i> AND <i>DEBARYOMYCES HANSENI</i> <i>Kamanin S.S., Yudina N.Yu., Arlyapov V.A.</i>	
СИНТЕТИЧЕСКИЙ ФРАГМЕНТ 173-193 АЛЬФА7-СУБЪЕДИНИЦЫ АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА В НЕКОНЪЮГИРОВАННОЙ ФОРМЕ ОКАЗЫВАЕТ ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ НА МЫШЕЙ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ИНДУЦИРОВАННОЙ БОЛЕЗНЬЮ АЛЬЦГЕЙМЕРА <i>Камынина А.В., Медвинская Н.И., Александрова И.Ю., Шалгунов В.С., Волкова Т.Д., Короев Д.О., Самохин А.Н., Нестерова И.В., Шелухина И.В., Крюкова Е.В., Цетлин В.И., Бобкова Н.В., Вольпина О.М.</i>	95
SYNTHETIC FRAGMENT 173-193 OF THE ALPHA7 NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR IN A NON-CONJUGATED FORM INDUCES IMMUNETHERAPEUTIC EFFECT IN MICE WITH EXPERIMENTALLY INDUCED ALZHEIMER'S DISEASE <i>Kamynina A.V., Medvinskaya N.I., Aleksandrova I.Ju., Shalgunov V.S., Volkova T.D., Koroev D.O., Samokhin A.N., Nesterova I.V., Shelukhina I.V., Krukova E.V., Tsetlin V.I., Bobkova N.V., Volpina O.M.</i>	97
КОЛОНИЗАЦИЯ РАСТЕНИЙ ТОМАТА АССОЦИАТИВНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ <i>Карнова Л.С., Чепурнова М.А., Захарченко Н.С., Музафаров Е.Н., Бурьянов Я.И.</i>	98

COLONIZATION OF TOMATO PLANTS ASSOCIATIVE MICROORGANISMS <i>Karnova L.S., Chepurnova M.A., Zakharchenko N.S., Muzaфарov E.N., Buryanov Ya.I.</i>	100
ИССЛЕДОВАНИЕ МЕЖХРОМОСОМНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИ ТРАНС-ДЕЙСТВУЮЩЕМ ЭФФЕКТЕ ПОЛОЖЕНИЯ У <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> <i>Кибанов М.В., Лавров С.А., Абрамов Ю.А., Гвоздев В.А.</i>	102
STUDYING THE LONG-RANGE CHROMOSOMAL INTERACTIONS IN THE CASE OF TRANS-ACTING POSITION EFFECT IN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> <i>Kibanov M.V., Lavrov S.A., Abramov Ya.A., Gvozdev V.A.</i>	104
ИЗМЕНЕНИЕ ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫХ СВЯЗЕЙ В БЕЛКАХ КЛЕЙКОВИНЫ ПРИ ВЛАГО-ТЕПЛОВОЙ ОБРАБОТКЕ ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ УЗБЕКИСТАНА <i>Кораблёва Н.В., Касьмова Т.Д.</i>	106
CHANGES INTRAMOLECULAR BANDS IN THE GLUTEN PROTEINS DURING WATER-THERMAL PROCESSING OF THE WHEAT OF UZBEKISTAN <i>Korablyova N.V., Kasimova T.D.</i>	108
ПОИСК НОВЫХ МИШЕНЕЙ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ ПУТЕМ АНАЛИЗА ПРОФИЛЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ГЕРМИНАЛЬНЫХ ТКАНЯХ ДРОЗОФИЛ, МУТАНТНЫХ ПО ГЕНУ <i>SPN-E</i> <i>Корбут А.П., Лавров С.А., Гвоздев В.А.</i>	110
SEARCH FOR NEW TARGETS OF RNA INTERFERENCE BY EXPRESSION PROFILING OF GERMINAL TISSUES OF <i>DROSOPHILA SPN-E</i> MUTANTS <i>Korbut A.P., Lavrov S.A., Gvozdev V.A.</i>	112
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ЛИПОСОМЫ С ДИГЛИЦЕРИДНЫМИ КОНЪЮГАТАМИ МЕТОТРЕКСАТА И МЕЛФАЛАНА: ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ С КОМПОНЕНТАМИ КРОВИ <i>Кузнецова Н.Р., Кандыба А.Г., Бовин Н.В., Севрин Ш., Леспино Д., Гранфис К., Водовозова Е.Л.</i>	113
ANTITUMOR LIPOSOMES LOADED WITH DIGLYCERIDE ESTERS OF METHOTREXATE AND MELPHALAN: STUDIES ON STABILITY AND НЕМОСОМПАТИБИТИ <i>Kuznetsova N.R., Kandyba A.G., Bovin N.V., Sevrin C., Lespineux D., Grandfils C., Vodovozova E.L.</i>	115
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ, НЕСУЩИХ СУИЦИДАЛЬНЫЙ ГЕН ПОД КОНТРОЛЕМ ОПУХОЛЬ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПРОМОТОРА НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ ЧЕЛОВЕКА <i>Кузьмин Д.В., Митяев М.В., Виноградова Т.В., Копанцев Е.П., Свердлов Е.Д.</i>	117

STUDY OF THE INFLUENCE OF GENE-ENGINEERED CONSTRUCTS, CARRYING GENE OF SUICIDAL ACTION UNDER THE CONTROL OF TUMOR SPECIFIC PROMOTER IN THE HUMAN CANCER CELL LINES <i>Koozmin D.V., Mityaev M.V., Vinogradova T.V., Kopantsev E.P., Sverdlov E.D.</i>	119
СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ И РЕФОЛДИНГ G-БЕЛОК СОПРЯЖЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ <i>Кузьмичёв П.К., Чутин В.В., Петровская Л.Е., Арсеньев А.С.</i>	120
SOLUBILIZATION AND REFOLDING OF G-PROTEIN COUPLED RECEPTORS <i>Kuzmichev P.K., Chupin V.V., Petrovskaya L.E., Arseniev A.S.</i>	122
ТРЕХМЕРНЫЕ ХИТИНОВЫЕ МАТРИЦЫ ИЗ МОРСКИХ ГУБОК И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ <i>Курек Д.В., Варламов В.П., Эрлих Г.</i>	124
THREE-DIMENSIONAL CHITINOUS MATRICES FROM MARINE SPONGES AND THEIR FUTURE APPLICATIONS FOR BIOTECHNOLOGY <i>Kurek D.V., Varlamov V.P., Ehrlich H.</i>	125
СИНТЕЗ И ФОТОХРОМНЫЕ СВОЙСТВА ПОЛИЭНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ СПИРОПИРАНОВ <i>Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Беликов Н.Е., Земцов Р.В., Ходонов А.А., Швец В.И., Барачевский В.А., Демина О.В.</i>	126
SYNTHESIS AND PHOTOCROMIC PROPERTIES OF POLYENIC SPIROPYRAN DERIVATIVES <i>Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Zemtsov R.V., Khodonov A.A., Shvets V.I., Barachevsky V.A., Demina O.V.</i>	128
СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКЗОГЕННЫХ И ЭНДОГЕННЫХ НЕЙРОМОДУЛЯТОРОВ НИКОТИНОВОГО АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА <i>Люкманова Е.Н., Шулепко М.А., Кашеверов И.Е., Шенкарев З.О., Минеев К.С., Парамонов А.С., Арсеньев А.С., Долгих Д.А., Цетлин В.И., Кирпичников М.П.</i>	130
STRUCTURE-FUNCTIONAL STUDIES OF MOLECULAR MECHANISMS OF INTERACTION BETWEEN EXOGENOUS AND ENDOGENOUS NEUROMODULATORS AND NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR <i>Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Kasheverov I.E., Shenkarev Z.O., Mineev K.S., Paramonov A.S., Arseniev A.S., Dolgikh D.A., Tsetlin V.I., Kirpichnikov M.P.</i>	132
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ мРНК ДЛЯ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ СИНДРОМА ДАУНА <i>Мануйлова Е.Г., Маркова Ж.Г., Шилова Н.В., Золотухина Т.В., Носиков В.В., Серёгин Ю.А.</i>	134

DETECTION OF AN OPPORTUNITY OF CIRCULATING mRNA USAGE FOR PRENATAL DIAGNOSTICS OF DOWN SYNDROME <i>Manuylova E.G., Markova J.G., Shilova N.V., Zolotuchina T.V., Nosikov V.V., Seryogin Yu.A.</i>	136
ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ЛИПИД-ТРАНСПОРТИРУЮЩЕГО БЕЛКА ЧЕЧЕВИЦЫ В КЛЕТКАХ <i>E. COLI</i> <i>Мельникова Д.Н., Финкина Е.И., Баландин С.В., Овчинникова Т.В.</i> ...	137
HETEROLOGOUS EXPRESSION OF LENTIL LIPID TRANSFER PROTEIN IN <i>E. COLI</i> <i>Melnikova D.N., Finkina E.I., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V.</i>	139
РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ УСИЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ РАКОВО-СПЕЦИФИЧНЫХ ПРОМОТОРОВ НА ОСНОВЕ TAT-TAR-СИСТЕМЫ HIV-1 <i>Мингалеева Р.Н.</i>	141
DEVELOPMENT OF HIV-1 TAT-TAR-SYSTEMS WITH INCREASED PROMOTER ACTIVITY FOR CANCER GENE THERAPY <i>Mingaleeva R.N.</i>	143
РЕЦЕПТОРНЫЕ КИНАЗЫ ERBB: АРХИТЕКТУРА МЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ <i>Минеев К.С., Пустовалова Ю.Е., Бочаров Э.В., Волинский П.Е., Ткач Е.Н., Ефремов Р.Г., Арсеньев А.С.</i>	145
ERBB RECEPTOR KINASES: ARCHITECTURE OF MEMBRANE DOMAINS <i>Mineev K.S., Pustovalova Yu.E., Bocharov E.V., Volynsky P.E., Tkach E.N., Efremov R.G., Arseniev A.S.</i>	147
МЕХАНИЗМЫ КАТАЛИЗА В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ <i>Миропольская Н.А., Кульбачинский А.В.</i>	149
MECHANISMS OF CATALYSIS IN THE ACTIVE CENTER OF BACTERIAL RNA POLYMERASE <i>Miropolskaya N.A., Kulbachinskiy A.V.</i>	151
ПОГЛОЩЕНИЕ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК НЕЙТРОФИЛЬНЫМИ ГРАНУЛОЦИТАМИ И ЭФФЕКТЫ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С КЛЕТКАМИ <i>Михеева Э.Р., Плескова С.Н., Балалаева И.В.</i>	153
PHAGOCYTOSIS OF QUANTUM DOTS BY NEUTROPHIL GRANULOCYTES AND EFFECTS OF THEIR INTERACTION WITH CELLS <i>Mikheeva E.R., Pleskova S.N., Balalaeva I.V.</i>	155
СЕЛЕКЦИЯ ДНК-АПТАМЕРОВ, СПЕЦИФИЧЕСКИ ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С ФИБРИЛЛЯРНОЙ ФОРМОЙ БЕЛКА Sup35 ДРОЖЖЕЙ <i>Морозкина Е.В., Сурина Е.Р., Марченко А.Н., Антипин А.А., Миткевич О.В., Кушинцов В.В., Беневоленский С.В., Тер-Аванесян М.Д.</i>	157

SELECTION OF DNA APTAMERS, SPECIFICALLY INTERACTING WITH FIBRILLAR FORM OF THE YEAST Sup35 PROTEIN <i>Morozkina E.V., Surina E.R., Marchenko A.N., Antipin A.A., Mitkevich O.V., Kushnirov V.V., Ter-Avanesyan M.D., Benevolensky S.V.</i>	159
БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ МУТАЦИИ, ПРИВОДЯЩИЕ К ЗАМЕНЕ 72 ЛИЗИНА В МОЛЕКУЛЕ СОМАТИЧЕСКОГО ЦИТОХРОМА C МЫШИ <i>Муфазалов И.А., Купраш Д.В., Пеньков Д.Н., Черняк Б.В., Плетюшкина О.Ю., Высоких М.Ю., Черткова Р.В., Кирпичников М.П., Долгих Д.А., Круглов А.А., Зворыкина С.В., Анохин К.В., Скулачев В.П., Недоспасов С.А.</i>	161
BIOLOGICAL EFFECTS OF MOUSE SOMATIC CYTOCHROME C MUTATION RESULTING IN REPLACEMENT OF LYSINE IN 72nd POSITION <i>Mufazalov I.A., Kuprash D.V., Penkov D.N., Chernyak B.V., Pletjushkina O.Y., Vyssokikh M.Y., Chertkova R.V., Kirpichnikov M.P., Dolgikh D.A., Kruglov A.A., Zworykina S.V., Anokhin K.V., Skulachev V.P., Nedospasov S.A.</i>	163
РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СИСТЕМЫ РЕСТРИКЦИИ-МОДИФИКАЦИИ <i>Eco29ki</i> <i>Нагорных М.О., Захарова М.В., Солонин А.С., Северинов К.В.</i>	165
REGULATION OF GENE EXPRESSION IN RESTRICTION-MODIFICATION SYSTEM <i>Eco29ki</i> <i>Nagornyykh M.O., Zakharova M.V., Solonin A.S., Severinov K.V.</i>	167
УНИФИЦИРОВАННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ СОЗДАНИЯ СОРБЕНТОВ И СЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК ДЛЯ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ И АНАЛИЗА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ <i>Никитина И.И., Булатов Э.Р., Бондарь О.В., Абдуллин Т.И.</i>	168
UNIFORM DEVELOPMENT OF CARBON NANOTUBE-BASED SORBENTS AND SENSORS FOR SEPARATION AND ANALYSIS OF NUCLEIC ACIDS <i>Nikitina I.I., Bulatov E.R., Bondar O.V., Abdullin T.I.</i>	170
ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА АУРЕЛИНА <i>Пантелеев П.В., Баландин С.В., Финкина Е.И., Овчинникова Т.В.</i>	172
PRODUCTION OF RECOMBINANT ANTIMICROBIAL PEPTIDE AURELIN <i>Panteleev P.V., Balandin S.V., Finkina E.I., Ovchinnikova T.V.</i>	174
ЯМР-ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННОГО ВОЛЬТ-СЕНСОРНОГО ДОМЕНА K ⁺ -КАНАЛА KvAP В МИЦЕЛЛАХ ДЕТЕРГЕНТОВ. ОТ ДИНАМИКИ К ВОЗМОЖНЫМ МОДЕЛЯМ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМОЙ АКТИВАЦИИ <i>Парамонов А.С., Шенкарев З.О., Люкманова Е.Н., Шингарова Л.Н., Арсеньев А.С.</i>	175

NMR STUDY OF ISOLATED VOLTAGE-SENSING DOMAIN OF THE K ⁺ -CHANNEL KvAP IN DETERGENT MICELLES. FROM DYNAMICS TO POSSIBLE MODELS OF VOLTAGE-GATING <i>Paramonov A.S., Shenkarev Z.O., Lyukmanova E.N., Shingarova L.N., Arseniev A.S.</i>	177
ПОСТТРАНЛЯЦИОННАЯ ХИМИЯ КРАСНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ ИЗ КОРАЛЛОВЫХ ПОЛИПОВ <i>Пахомов А.А., Мартынов В.И.</i>	179
POST-TRANSLATIONAL CHEMISTRY OF RED FLUORESCENT PROTEINS FROM ANTHOZOA CORALS <i>Pakhomov A.A., Martynov V.I.</i>	181
РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУПЕРОКСИДА В МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТАХ НА ОСНОВЕ МУТАНТНЫХ ВАРИАНТОВ ЦИТОХРОМА C <i>Пепелина Т.Ю., Черткова Р.В., Островерхова Т.В., Долгих Д.А., Гривенникова В.Г., Виноградов А.Д., Кирпичников М.П.</i>	183
DESIGN OF QUANTITATIVE MEASUREMENT SUPEROXIDE GENERATION TEST-SYSTEM IN MITOCHONDRIAL PREPARATIONS ON THE BASIS OF CYTOCHROME C MUTANT VARIANTS <i>Pepelina T.Y., Ostroyverkhova T.V., Chertkova R.V., Dolgikh D.A., Grivennikova V.G., Vinogradov A.D., Kirpichnikov M.P.</i>	185
АКТИВНОСТЬ НАДФН-ОКСИДАЗЫ ПЛАЗМАЛЕММЫ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ ПРИ СНИЖЕНИИ ТЕМПЕРАТУРЫ ВЫРАЩИВАНИЯ <i>Пиотровский М.С.</i>	187
ACTIVITY OF PLASMA MEMBRANE NADPH-OXIDASE FROM ETIOLATED MAIZE SEEDLINGS UNDER LOWERING OF GROWTH TEMPERATURE <i>Piotrovsky M.S.</i>	189
ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ДАЛЬНЕКРАСНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БИОМАРКЕРА МКАТЕ ЛЕГЛА В ОСНОВУ СОЗДАНИЯ НОВОГО ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОГО ВАРИАНТА С ПОВЫШЕННОЙ ЯРКОСТЬЮ <i>Плетнева Н.В., Щербо Д., Мерзляк Е.М., Чудаков Д.М., Плетнев В.З.</i> ..	190
X-RAY STRUCTURE OF THE FAR-RED FLUORESCENT BIOMARKER МКАТЕ PROVIDED A BASE FOR DEVELOPMENT OF THE NEW GENE ENGINEERED VARIANT WITH THE ENHANCED BRIGHTNESS <i>Pletneva N.V., Shcherbo D., Merzlyak E.M., Chudakov D.M., Pletnev V.Z.</i> ..	191
РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОЛИМЕРСОДЕРЖАЩИХ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ БИОАНАЛИЗА <i>Простякова Л.И., Капустин Д.В., Зубов В.П.</i>	192

DEVELOPMENT OF A NEW POLYMER CONTAINING CARRIER FOR BIOANALYSES <i>Prostyakova A.I., Kapustin D.V., Zubov V.P.</i>	194
ФЕРМЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ КОРМОПРОИЗВОДСТВА <i>Рафаилова Э.А., Морозова Ю.А., Скворцов Е.В.</i>	196
ENZUME PREPARATION FOR FORAGE PRODUCTION <i>Rafailova E.A., Morozova U.A., Skvortsov E.V.</i>	198
ПОИСК ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ИНДИВИДУАЛЬНУЮ СПОРТИВНУЮ УСПЕШНОСТЬ <i>Ребриков Д.В., Морозова С.А., Трофимов Д.Ю., Шевкопляс Е.В., Тоневицкий А.Г.</i>	200
GENETIC ANALYSIS OF ATHLETIC PERFORMANCE <i>Rebrikov D.V., Morozova S.A., Trofimov D.Y., Shevkoplyas E.V., Tonevitsky A.G.</i>	201
ГЕННАЯ И КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ БОКОВОГО АМИОТРОФИЧЕСКОГО СКЛЕРОЗА <i>Ризванов А.А., Мухамедьяров М.А., Киясов А.П., Исламов Р.Р.</i>	202
GENE AND CELL THERAPY OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS <i>Rizvanov A.A., Mukhamedyarov M.A., Kiyasov A.P., Islamov R.R.</i>	204
ПРИРОДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ 5'-РЕГУЛЯТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА <i>LIM3</i> <i>D. MELANOGASTER</i> , ГОМОЛОГА ГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА <i>LHX3/4</i> , ОПРЕДЕЛЯЕТ РАЗЛИЧИЯ В УРОВНЕ ЕГО ЭКСПРЕССИИ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ ДРОЗОФИЛЫ <i>Рыбина О.Ю., Пасюкова Е.Г.</i>	206
POLYMORPHISM OF THE 5'-REGULATORY REGION OF <i>D. MELANOGASTER</i> <i>LIM3</i> LOCUS, A HOMOLOG OF HUMAN <i>LHX3/4</i> , DEFINES <i>LIM3</i> EXPRESSION AND LIFESPAN VARIATION IN <i>DROSOPHILA</i> <i>Rybina O.U., Pasyukova E.G.</i>	208
КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ СОСТАВОМ ПОЛИВАЛЕНТНЫХ КОНЪЮГАТОВ АНТИТЕЛ С НАНОЧАСТИЦАМИ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА И ИХ АФФИННОСТЬЮ <i>Сафенкова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.</i>	210
CORRELATION BETWEEN COMPOSITION OF MULTIVALENT CONJUGATES OF ANTIBODIES WITH COLLOIDAL GOLD NANOPARTICLES AND THEIR AFFINITY <i>Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.</i>	212
ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ДИФТЕРИЙНОМУ ТОКСИНУ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ	

ТЕСТ-СИСТЕМ <i>Симонова М.А., Шошина Н.С., Валякина Т.И.</i>	214
OBTAINING OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO DIPHTHERIA TOXIN FOR PRODUSING OF HIGH SENSITIVE ASSAYS <i>Simonova M.A., Shoshina N.S., Valyakina T.I.</i>	215
НОВЫЙ МЕТОД АНАЛИЗА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПАТОГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ТРАНСКРИПТОМА <i>M. TUBERCULOSIS IN VIVO</i> <i>Скворцов Т.А., Игнатов Д.В., Апт А.С., Ажикина Т.Л., Сverdlov E.D.</i> ..	216
NEW METHOD OF GENE EXPRESSION ANALYSIS OF INTRACELLULAR PATHOGENS AND ITS APPLICATION FOR THE STUDY OF <i>M. TUBERCULOSIS TRANSCRIPTOME IN VIVO</i> <i>Skvortsov T.A., Ignatov D.V., Apt A.S., Azhikina T.L., Sverdlov E.D.</i>	218
ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА МАГНИТНЫХ НОСИТЕЛЯХ <i>Солдатова Л.С., Бабиц О.О., Просеков А.Ю.</i>	219
FEATURES OF RECEPTION OF FERMENTAL PREPARATIONS, IMMOBILIZED ON MAGNETIC CARRIERS <i>Soldatova L.S., Babich O.O., Prosekov A.J.</i>	221
СТАРЕНИЕ ВЫЗЫВАЕТ ПОДАВЛЕНИЕ АНГИОГЕННЫХ СВОЙСТВ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ <i>Старостина Е.Е., Ефименко А.Ю., Калинина Н.И., Парфенова Е.В., Ткачук В.А.</i>	223
AGEING INHIBITS PROLIFERATION, VIABILITY AND ANGIOGENIC POTENTIAL OF ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS <i>Starostina E.E., Efimenko A.Yu., Kalinina N.I., Parfenova E.V., Tkachuk V.A.</i>	225
ИЗУЧЕНИЕ ЭНХАНСЕРНОЙ АКТИВНОСТИ ДЛИННЫХ КОНЦЕВЫХ ПОВТОРОВ ЧЕЛОВЕК-СПЕЦИФИЧНЫХ ЭНДОГЕННЫХ РЕТРОВИРУСОВ <i>Сунцова М.В., Гогвадзе Е.В., Буздин А.А.</i>	226
ANALYSIS OF ENHANCER ACTIVITY OF HUMAN-SPECIFIC ENDOGENOUS RETROVIRAL LONG TERMINAL REPEATS <i>Suntsova M.V., Gogvadze E.V., Buzdin A.A.</i>	227
СОВРЕМЕННОЕ КЛОНИРОВАНИЕ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ И БИОЭТИКА <i>Суханова Ю.А.</i>	228
MODERN CLONING OF LIVING ORGANISMS AND BIOETHICS <i>Suhanova Yu.A.</i>	230
РАЗВИТИЕ ПОДХОДА К ПОЛУЧЕНИЮ РЕКОМБИНАНТНОГО БАКТЕРИОРОДОПСИНА В <i>E. COLI</i> НА ОСНОВЕ ГИБРИДА С МАЛЬТОЗ-	

СВЯЗЫВАЮЩИМ БЕЛКОМ <i>Тагвей А.И., Некрасова О.В.</i>	232
IMPROVED PRODUCTION OF RECOMBINANT BACTERIORHODOPSIN IN <i>E. COLI</i> AS A FUSION TO MALTOSE-BINDING PROTEIN <i>Tagvey A.I., Nekrasova O.V.</i>	234
БИОПРЕПАРАТ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СЕМЕННОГО БЕЗВИРУСНОГО КАРТОФЕЛЯ <i>Тазетдинова Д.И., Алимова Ф.К.</i>	236
БИОПРЕПАРАТ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СЕМЕННОГО БЕЗВИРУСНОГО КАРТОФЕЛЯ <i>Tazetdinova D.I., Alimova F.K.</i>	238
НЕСИММЕТРИЧНЫЕ АЛЬДЕГИДНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ГОССИПОЛА: СИНТЕЗ, СТРУКТУРА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ <i>Тялябаев К.З., Юлдашев А.М., Ибрагимов Б.Т.</i>	239
UNSYMMETRICAL ALDEHYDE DERIVATIVES OF GOSSYPOL: SYNTHESIS, STRUCTURE AND BIOLOGICAL ACTIVITY <i>Tilyabaev K.Z., Yuldashev A.M., Ibragimov B.T.</i>	241
БАЗА ДАННЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ УГЛЕВОДОВ <i>Тоукач Ф.В.</i>	243
BACTERIAL CARBOHYDRATE STRUCTURE DATABASE <i>Toukach F.V.</i>	245
ИЗУЧЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В КЛЕТКЕ ПРИ АКТИВАЦИИ ТИРОЗИНКИНАЗНЫХ РЕЦЕПТОРОВ <i>Тюрин-Кузьмин П.А., Сафронова Н.М., Воротников А.В., Белоусов В.В.</i>	247
INTRACELLULAR HYDROGEN PEROXIDE LOCALIZATION FOLLOWING ACTIVATION OF TYROSINE KINASE RECEPTORS <i>Tyurin-Kuzmin P.A., Safronova N.M., Vоротников A.V., Belousov V.V.</i>	249
ОДНОВРЕМЕННЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ СЕМИ ТИПОВ СТАФИЛОКОККОВЫХ ЭНТЕРОТОКСИНОВ НА БИОЛОГИЧЕСКОМ МИКРОЧИПЕ <i>Фейзханова Г.У., Филиппова М.А., Рубина А.Ю.</i>	250
SIMULTANEOUS IMMUNOASSAY OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS ON BIOLOGICAL MICROCHIPS <i>Feyzhanova G.U., Filippova M.A., Rubina A.Yu.</i>	252
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ГАНГЛИОЗИДОВ С РАЗЛИЧНЫМИ СУБЪЕДИНИЦАМИ IL-2 РЕЦЕПТОРА <i>Холоденко Р.В., Водовозова Е.Л., Холоденко И.В., Молотковская И.М.</i> ..	254
INTERACTION OF EXOGENOUS GANGLIOSIDES WITH IL-2R SUBUNITS <i>Kholodenko R.V., Vodovozova E.L., Kholodenko I.V., Molotkovskaya I.M.</i> ...	255

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВОХ И РАКОВЫХ КЛЕТОК ПРИ КО-КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА РАЗЛИЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СУБСТРАТАХ <i>Шафигуллина А.К., Ялвач М.Э., Блатт Н.Л., Киясов А.П., Ризванов А.А.</i>	256
INTERACTION OF MESENCHYMAL STEM CELLS AND NEUROBLASTOMA SH-SY5Y CELLS DURING CO-CULTURE ON DIFFERENT BIOLOGICAL SURFACES <i>Shafigullina A.K., Yalvac M.E., Blatt N.L., Kiyasov A.P., Rizvanov A.A.</i> ..	258
ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПЕРВИЧНЫХ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТЕЛОВОХ КЛЕТКАХ, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В СРЕДЕ С ФАКТОРАМИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В БЕСФИДЕРНЫХ И БЕССЫВОРОТОЧНЫХ УСЛОВИЯХ <i>Шейна Ю.И., Еремеев А.В.</i>	260
EXPRESSION OF PRIMORDIAL GERM CELL'S MARKERS IN HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS, WHICH WERE CULTIVATED IN MEDIUM SUPPLEMENTED WITH FACTORS OF DIFFERENTIATION IN CONDITIOUS WITHOUT FEEDER LAYER AND SERUM <i>Sheina J.I., Eremeev A.V.</i>	262
ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ $\alpha 7$ НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НЕЙРОНАМИ СПИННОМОЗГОВЫХ ГАНГЛИЕВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СЕЛЕКТИВНЫХ α -НЕЙРОТОКСИНОВ <i>Шелухина И.В., Крюкова Е.В., Лунс К.С., Куммер В., Цетлин В.И.</i> ...	263
HISTOCHEMICAL INVESTIGATION OF $\alpha 7$ NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS EXPRESSION BY DORSAL ROOT GANGLIA NEURONS USING SELECTIVE α -NEUROTOXINS <i>Shelukhina I.V., Krukova E.V., Lips K.S., Kummer W., Tsetlin V.I.</i>	265
ЛИПИД-БЕЛКОВЫЕ НАНОДИСКИ – УНИВЕРСАЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ, РЕНАТУРАЦИИ И СТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ И МЕМБРАНОАКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ <i>Шенкарев З.О.</i>	267
LIPID-PROTEIN NANODISCS – VERSATILE MEDIUM FOR STABILIZATION, REFOLDING AND STRUCTURAL INVESTIGATIONS OF MEMBRANE PROTEINS AND MEMBRANE-ACTIVE PEPTIDES <i>Shenkarev Z.O.</i>	269
АНТИСМЫСЛОВАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> НАХОДИТСЯ ПОД КОНТРОЛЕМ рРНК <i>Шнуз С.Г., Пескова Е.Ю., Калмыкова А.И.</i>	271

piRNAs CONTROL ANTISENSE EXPRESSION OF DROSOPHILA RETROELEMENTS <i>Shpiz S.G., Peskova E.Yu., Kalmykova A.I.</i>	273
ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ ИЗ <i>ASPERGILLUS NIGER</i> <i>Ягольник Е.Л.</i>	274
THERMODYNAMIC CHARACTERISTICS AND STRUCTURAL CHANGES OF GLUCOSE OXIDASE FROM <i>ASPERGILLUS NIGER</i> <i>Yagolnik E.A.</i>	275
ОСОБЕННОСТИ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ СТЕРОИДОВ ПЛЕСНЕВЫМ ГРИБОМ <i>CURVULARIA LUNATA</i> ВКПМ F-981 <i>Ядерец В.В.</i>	276
FEATURES OF STEROID HYDROXYLATION BY <i>CURVULARIA LUNATA</i> VCPM F-981 <i>Yaderetz V.V.</i>	278
СИНТЕЗ И СВОЙСТВА МОДЕЛЬНЫХ ХРОМОФОРОВ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ <i>Ямпольский И.В.</i>	280
SYNTHESIS AND PROPERTIES OF THE MODEL CHROMOPHORES OF FLUORESCENT PROTEINS <i>Yampolsky I.V.</i>	281
АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ	282
AUTHOR INDEX	285
СОДЕРЖАНИЕ	288
CONTENTS	288

Компьютерная верстка: Т.И. Яковлева

Отпечатано на полиграфическом участке ИБХ РАН
Печать офсетная. Печ. л. . Тираж 500 экз.

© Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 2009 г.

