

ПОДСЕКЦИЯ «ЦИКЛ НАУК О ЖИВОМ»

Экспертный совет подсекции:

Председатель

д.х.н., проф. Клячко Н.Л.

Зам. председателя

к.х.н., ст.н.с. Белова А.Б.

Члены совета

к.х.н., доцент Белогурова Н.Г.

д.х.н., в.н.с. Еремеев Н.Л.

д.х.н., проф. Левашов А. В.

к.х.н., в.н.с. Лысогорская Е.Н.

к.х.н., с.н.с. Спиридонова В.А.

к.х.н., с.н.с. Шпанченко О.В.

Содержание

Ферментативное определение модельных соединений лигнина гваяцильного ряда
Айзенштадт Мария Аркадьевна, Покрышкин Сергей Александрович

Изучение закономерностей включения тирозиназы в комплексы с полиэлектролитами нелинейной архитектуры
Бадалян Артавазд Мушегович, Дубачева Галина Витальевна

Борсодержащие конъюгаты на основе природных тетрапиррольных соединений.
Бриттал Д.И., Титеев Р.А., Нгуен Х. Нам

Разработка амперометрического сенсора на основе алкогольоксидазы для определения этилового спирта
Быконя Александра Николаевна, Дубачева Галина Витальевна

One SmpB molecule accompanies tmRNA during its passage through the stalled ribosomes
Bugaeva Elizaveta Yu., Shpanchenko Olga V., Dontsova Olga A.

Клонирование, экспрессия в клетках *E.coli* и свойства рекомбинантной формиатдегидрогеназы из *Staphylococcus aureus*
Войнова Наталья Сергеевна, Тишков Владимир Иванович

Изучение механизма транслокации на бактериальной рибосоме.
Головина А.Я., Сергиев П.В.

Роль N-концевого домена родопсинкиназы в механизме ее функционирования
Григорьев Илья Игоревич, Ковалева Надежда Анатольевна, Комолов Константин Евгеньевич, Чурюмова Валерия Александровна, Тихомирова Наталья Константиновна, Сенин Иван Иванович

Синтез новых поликатионных амфифилов, предназначенных для нанокапсулирования нуклеиновых кислот
Гришаева А.О., Маслов М.А., Морозова Н.Г.

Изучение комплексов белка p-50-NF-кВ с модифицированными олигонуклеотидами
Евлаков Константин Иванович

Повышение фототоксичности фотодитазина под действием плуроников
Жиентаев Тимур Махмедович

Аптамерные ДНК к интерлейкину-6 человека
Завьялова Елена Геннадиевна, Цыганова Марина Олеговна, Спиридонова Вера Алексеевна

Антимикробная активность модифицированного синтетического волокна хитозаном
Захаржевская Мария

Комплексы Gd(III) и Mn(II) на основе дифильных Каликс[4]аренов для магнитной резонансной томографии
Зиятдинова А.Б., Бурилова Е.А., Кононова А.В.

Гидрооксалаты γ -аминопропилсиланов
Коваленко Виктор Викторович

Мутантные формы люциферазы светляков с измененными спектрами биолюминесценции и повышенной термостабильностью

Кокшаров Михаил Иванович

Выделение и исследование полисахаридного комплекса липы обыкновенной

Короткова Екатерина Михайловна

Характеристика липосом, содержащих диглицеридные производные противоопухолевых препаратов мелфалана и метотрексата

Кузнецова Н.Р., Кандыба А.Г., Кадыков В.А., Хуцян С.С., Гаенко Г.П., Водовозова Е.Л., Молотковский Ю.Г.

Влияние соединений различных классов на лизис клеточных стенок бактерий под воздействием бактериолитических ферментов

Легоцкий С.А., Левашов П.А., Чертков О.В., Мирошников К.А., Левашов А.В., Клячко Н.Л.

Отнесение сигналов ЯМР и исследование структуры белка С-домена фактора терминации трансляции eRF1

Манцызов Алексей Борисович, Иванова Елена Владимировна, Бирдсалл Берри, Польшаков Владимир Иванович, Киселев Лев Львович

Обнаружение остаточных количеств высокотоксичного пестицида тетраметилтиурамдисульфида (ТМТД) в пробах молока

Николаева Татьяна Геннадьевна, Кольцов Владимир Валерьевич

Групп-специфическое определение сульфаниламидных препаратов методом поляризационно-флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА)

Нокель М.А., Нестеренко И.С., Еремин С.А.

Изучение влияния модификации нуклеотида m2G1835 23s рРНК на функционирование рибосомы E. Coli.

Остерман Илья Андреевич, Сергиев Петр Владимирович

Синтез и изучение свойств липофильных поликатионных агентов трансфекции

Петухов И.А., Маслов М.А., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А.

Получение и свойства полиэлектролитных микрочастиц, содержащих инсулин и соевый ингибитор протеиназ типа Баумана-Бирк

Печенкин Михаил Александрович

Биолюминесцентное определение АТФ: возможности использования ферментов для повышения специфичности определения бактериальных клеток

Плешакова В.А., Легоцкий С.А., Клячко Н.Л.

Выделение катепсин-L-подобной пищеварительной цистеиновой протеиназы из личинок *Tenebrio molitor*

Поплетаева С. Б.

Получение наночастиц препарата туберкулостатического действия

Попов Дмитрий Витальевич

Смешаннолигандное комплексообразование кобальта(II) и цинка(II) с анионами иминодиуксусной кислоты и бета-лактамных антибиотиков

Потифорова Светлана Валерьевна

Очистка зеатин-связывающих белков и идентификация их генов.

Прокопцева Ольга Сергеевна, Епинетов Михаил Александрович, Кондаков Сергей Эмильевич

Изучение функциональной роли метилирования нуклеотидов m2G966 и m5C967 в составе 16S рРНК

Прохорова И.В., Сергиев П.В.

Эфирные масла растений рода *Thymus* флоры Бурятии и Монголии

Рабжаева Арюна Николаевна, Раднаева Лариса Доржиевна, Жигжитжапова Светлана Васильевна

Взаимодействие ДНК метилтрансферазы Dnmt3a мыши с 2-аминопурин-содержащей ДНК: удаление 6-оксогруппы гуанина не влияет на связывание ДНК-субстрата

Рахимова Алина Рифатовна, Черепанова Наталья Александровна

Разработка метода вычленения вкладов трех эстераз на основе двухэлектродного биосенсора с помощью методов формальной кинетики

Решетняк Антон Сергеевич, Дубачева Галина Витальевна

Синтез бесфосфорных алкильных глицеролипидов с катионными головками гетероциклического ряда

Романова Светлана Геннадьевна, Серебренникова Галина Андреевна

Изучение влияния комплексов метилтрансфераз с рибосомной рнк на структуру рибосом

Сергеева О. В., Сергиев П. В.

Теломераза как потенциальный маркер для ранней диагностики рака шейки матки.

Скворцов Дмитрий Александрович, Рубцова Мария Петровна, Зверева Мария Эмильевна, Киселев Федор Львович

Изучение протеолиза гемагглютиниनावируса гриппа штамма A/Puerto Rico/8/34

Смирнова Ю. А., Кордюкова Л.В., Серебрякова М.В., Баратова Л.А., Филиппова И.Ю., Лысогорская Е.Н.

Включение дельта-сон индуцирующего пептида в состав полимерных матриц и наноэмульсий для увеличения времени его действия в организме

Суханова Т.В., Филатова Л.Ю., Ефремов Е.С., Прудченко И.А., Марквичева Е.А., Клячко Н.Л.

Выделение белков семейства Dnmt3 мыши и изучение их свойств

Тамьяр Е.Л., Кирсанова О.В.

Растения рода *Phlojodicarpus* флоры Бурятии - источники кумаринов

Тараскин Василий Владимирович, Раднаева Лариса Доржиевна, Жигжитжапова Светлана Васильевна

Ферментсодержащие пленки на основе хитозана

Татлыбаева Г., Кулиш Е.И., Мударисова Р.Х.

Экологическое состояние родников калининского района тверской области

Толкачёва Людмила Николаевна

Сравнение кинетических параметров ферментов в пленках полиэлектролитов линейной и нелинейной архитектуры.

Торгонская Анна Анатольевна, Дубачева Галина Витальевна

Свойства таксан-содержащей наноэмульсии

Углова С.В., Клячко Н.Л.

Генотипирование β-лактамаз СТХ-М типа методом гибридизационного анализа на ДНК-микрочипе

Уляшова Мария Морисовна, Рубцова Майя Юрьевна, Егоров Алексей Михайлович

Стабилизация фермента, лизирующего клетки стрептококков группы А, для использования в фармакологических препаратах

Филатова Л.Ю., Левашов А.В., Клячко Н.Л.

Аптамерные вставки в теломеразной РНК для выделения и изучения теломеразы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Щербакова Д.М. (докладчик), Соколов К.А., Зверева М.Э., Донцова О.А.

Оптимизация условий ферментативного получения линолевой кислоты из масла сафлора

Майдина, А.Б. Белова, Н.Л.Клячко

Ферментативное определение модельных соединений лигнина гваяцильного ряда*Айзенштадт Мария Аркадьевна, Покрышкин Сергей Александрович**ГОУ ВПО Архангельский государственный технический университет, Архангельск,
Россия**E-mail: aizen@rambler.ru*

За последнее десятилетие существенно возросло применение биотехнологических процессов в целлюлозно-бумажной промышленности. Основные направления применения ферментов: делигнификация целлюлозы (лигниназы, лакказы, ксиланазы), биodeградация лигнина на этапе биологической очистки производственных сточных вод (лигнинпероксидаза, марганецпероксидаза, лакказа), а также разработка высокоточных экспрессных методов определения различных загрязнителей органической и неорганической природы. Нами изучена возможность применения фермента класса оксидоредуктаз - пероксидазы, выделенной из корней хрена, в качестве катализатора процесса биоокисления лигнина. Входя в состав природного лигнинного комплекса, этот фермент селективно и эффективно катализирует окисление лигнинных соединений различного происхождения, а также характеризуется наибольшей стабильностью среди известных пероксидаз.

Однако эффективность применения данного фермента ограничивается недостаточным раскрытием механизма его действия на компоненты древесины, в особенности на лигнин. В связи с этим, целью данного исследования являлось изучение субстратной специфичности пероксидазы хрена по отношению к лигнину и его модельным соединениям с различными заместителями в боковой цепи (гваякол, феруловая кислота). Нами изучено влияние условий (рН, концентрация реагирующих соединений, концентрация фермента) на реакцию пероксидазного окисления выбранных модельных соединений, оптимизированы условия проведения данной реакции, рассчитаны кинетические параметры: порядок реакции по субстрату-восстановителю, по субстрату-окислителю; максимальная скорость реакции (V_{max}), константа Михаэлиса (K_m), эффективная константа реакции ($K_{эфф}$).

На основе полученных результатов, сделан вывод о возможности применения пероксидазы, не только в технологических целях - для интенсификации процесса биологической очистки; но и для разработки метода оценки содержания лигнинных веществ, что позволит проконтролировать их удаление из очищенных производственных сточных вод и предотвратить попадание в природный водоем.

Литература

1 Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. Кн. II. Ферменты, модели, процессы. / А.В. Болобова, А.А. Аскадский, В.И. Кондращенко, М.Л. Рабинович. – М.: Наука, 2002.- 343 с. ISBN 5-02-006421-1

2 Химия сульфитных методов делигнификации древесины./ К.Г. Боголицын, В.М. Резников. - М.: Экология, 1994.-288 с.

3 Laszlo J.A., Compton D.L. Comparison of peroxidase activities of hemin, cytochrom C and microperoxidase – 11 in molecular solvents and imidasolum – based ionic liquids // J. Mol. Cat. B.: Enzymatic. 2002. V.18. pp. 109-120.

4 Outgenoeg G., Dirksen E., Ingemann S., Hilhorst R. Horseradish Peroxidase – catalyzed oligomerization of Ferulic Acid on a Template of a Tyrosine – containing tripeptide // The Journal of Biological Chemistry. 2002. V.277. No 24. pp. 21332-21340.

Изучение закономерностей включения тирозиназы в комплексы с полиэлектролитами нелинейной архитектуры

Бадалян Артавазд Мушегович, Дубачева Галина Витальевна

Кафедра химической энзимологии, Химический факультет, Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия

В настоящее время одним из наиболее перспективных и востребованных биосенсоров является электрохимический датчик на основе фермента тирозиназы. Биосенсоры на основе тирозиназы используются как для анализа фенола, так и для анализа активности токсикологически важных ферментов, использующих производные фенола в качестве субстратов.

Для создания чувствительных и стабильных датчиков необходимо эффективно иммобилизовать тирозиназу на поверхности графитового электрода. В литературе описан ряд различных подходов и методов иммобилизации тирозиназы, большинство из которых основаны на взаимодействии фермента с противоположно заряженными полиэлектролитами (линейными, сшитыми, разветвленными и т.д.). По этой причине выбор полиэлектролита играет исключительную роль при создании биосенсоров.

В данной работе впервые для создания электрохимических биосенсоров был использован новый класс полиэлектролитов - полиэлектролиты нелинейной архитектуры, а именно, так называемые «полимерные звезды» и «полимерные щетки».

Для изучения закономерностей включения тирозиназы в комплексы с полимерными звездами и щетками были исследованы возможности создания как комплексов в растворе, так и наноструктурированных пленок. Комплексы тирозиназы в растворе были исследованы методом динамического светорассеяния. Наноструктурированные пленки были получены методом послойного нанесения полиэлектролитов (layer-by-layer technology, LBL technology), изучены при помощи атомно-силовой микроскопии (АСМ). Также была исследована активность тирозиназных биосенсоров, созданных на основе полученных пленок.

Борсодержащие конъюгаты на основе природных тетрапиррольных соединений.¹

Бриттал Д.И., Титеев Р.А., Нгуен Х. Нам

Московская Государственная Академия Тонкой Химической Технологии

им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия.

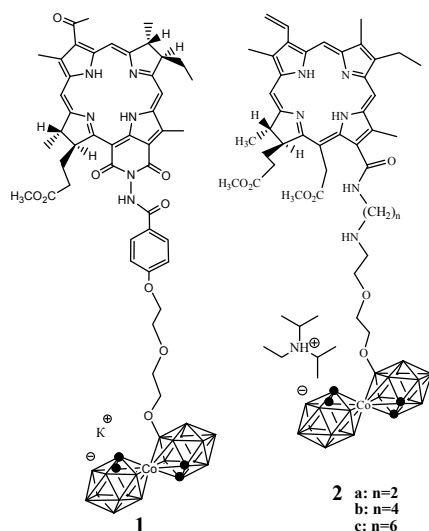
E-mail: brittal-d@mail.ru

Уникальной особенностью тетрапиррольных соединений является их способность селективно накапливаться в раковых клетках. Это свойство используется для направленной доставки борсодержащих соединений в раковую опухоль с целью проведения бор-нейтронозахватной терапии (БНЗТ). Этот метод заключается в облучении нерадиоактивного изотопа ^{10}B тепловыми или эпитепловыми нейтронами с последующим распадом образующегося изотопа ^{11}B на высокоэнергетические продукты, разрушающие опухоль.

Ранее нами сообщалось о синтезе конъюгата циклоимида бактериохлорина *p* с клозо-додекаборатным анионом [1]. Другим борным кластером, представляющим интерес для БНЗТ, является бис(дикарболлид)кобальта, очевидными преимуществами которого являются меньший заряд и большее содержание атомов бора. Последний использован в настоящей работе для синтеза конъюгатов на основе циклоимида бактериохлорина *p* и хлорина *eb*.

Синтез соединения **1** основан на ацилировании аминогруппы в *N*-аминоциклоимиде бактериохлорина *p* [2] карбоксильным производным бис(дикарболлид)кобальта. Другой подход состоял в нуклеофильном раскрытии 1,4-диоксониевого кольца в борном кластере производными хлорина *eb*, содержащими аминоалкильный спейсер, с получением соответствующих конъюгатов **2 a,b,c**.

В экспериментах *in vitro* вышеназванные конъюгаты показали высокое накопление в клетках аденокарциномы легкого человека A549 и, как следствие, высокую фотоситотоксичность.



Литература

- 1 M.A. Grin, A.A. Semioshkin, R.A. Titeev, E.A. Nizhnik, J.N. Grebenyuk, A.F. Mironov, V.I. Bregadze. *Mendeleev Commun.*, 2007, 17, 14-15.
- 2 Grin M.A., Mironov A.F., Tsiprovsii A.G., Kachala V.V., Karmakova T.A., Plyutinskaya A.D., Yakubovskaya R.I.. *J.Porphyrins Phthalocyanines*, 2003, 7, 725-730.

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №06-03-32459)

Разработка амперометрического сенсора на основе алкогольоксидазы для определения этилового спирта***Быконя Александра Николаевна, Дубачева Галина Витальевна****Кафедра Химической энзимологии, Химический факультет,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Количественное определение спирта важно для клинических и судебных целей, а также для сельскохозяйственных и экологических нужд, в биохимических исследованиях, в пищевой промышленности для контроля процесса брожения и качества продуктов. В данной работе исследуется возможность создания сенсорной матрицы для анализа эстераз крови, в которую планируется включить амперометрический датчик на основе алкогольоксидазы для определения этилового спирта. С помощью такого датчика будет определяться этиловый спирт, образующийся в ходе ферментативной реакции под действием эстераз крови. На сегодняшний день в литературе известны различные типы датчиков для определения спирта, однако, у них есть ряд недостатков. Одни датчики обладают неудовлетворительными аналитическими характеристиками: низкой чувствительностью, низкой операционной стабильностью, нестабильностью при хранении, другие - изготавливаются по методикам, не позволяющим включать их в состав сенсорных матриц.

В данной работе проводилась разработка методики создания амперометрического сенсора на основе алкогольоксидазы (АО) для определения этилового спирта с использованием метода послойного нанесения полиэлектrolитов. В ходе работы были определены кинетические характеристики фермента, иммобилизованного по данной технологии. Структура пленок, образующихся на поверхности сенсора, была изучена при помощи атомно-силовой микроскопии. Также в рамках представленной работы были изучены зависимость активности сенсора от концентрации АО в рабочем растворе, операционная и долговременная стабильности сенсора, а также были определены его аналитические характеристики.

Использование полученного сенсора для определения этилового спирта совместно с сенсорами на холин и на фенол, которые также изготовлены по методу послойного нанесения полиэлектrolитов, позволит создать сенсорную матрицу с несколькими чувствительными элементами для одновременного определения смеси эстераз крови.

One SmpB molecule accompanies tmRNA during its passage through the stalled ribosomes**Bugaeva Elizaveta Yu.¹, Shpanchenko Olga V.², Dontsova Olga A.²**¹ Department of Bioinformatics and Bioengineering, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119992, Moscow, Russia.² Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119992, Moscow, Russia.
beu@rambler.ru

Trans-translation is an important protein synthesis quality control mechanism in bacteria (reviewed by Moore and Sauer, 2007). It recycles ribosomes arrested during the translation of non-stop mRNAs and directs the problematic mRNA and corresponding protein product for degradation. Along with the common participants of the translation two additional players, namely tmRNA (transfer-messenger RNA, or 10Sa RNA, or SsrA RNA) and SmpB (small protein B), are required for *trans*-translation. It has been shown that two SmpB molecules bind the ribosome during the initiation of *trans*-translation (Hallier et al., 2006; Kaur et al., 2006). However, an alternative study suggests that only one molecule of SmpB, in complex with tmRNA, interacts with the ribosome (Sundermeier et al., 2007).

Earlier we have developed a system to block tmRNA-ribosome complexes *in vivo* during different stages of *trans*-translation (Shpanchenko et al., 2005). The stalled complexes were isolated using affinity chromatography and the ratio of tmRNA, SmpB and ribosomes has been determined using PAGE and blotting techniques.

To address the stoichiometry of SmpB during the process of *trans*-translation, we have used this system to prepare a number of tmRNA-ribosomal complexes: blocked after the first translocation step of messenger RNA-like domain (MLD) of tmRNA (stop codon at the 2nd position, leading to a two aminoacid-tag), two complexes stopped at the middle part of MLD (4th and 5th codons, leading to a 4 and 5 aminoacid-tag, respectively) and one at the very end of MLD (11th codon). Using these complexes, we could more precisely determinate the stoichiometry of SmpB within the stalled tmRNA-ribosome complexes, with the help of Western blot analysis using antibodies raised against SmpB and the ribosomal protein S3, as internal control.

The results suggest that only one molecule of SmpB remains bound to tmRNA and accompanies it on its passage through the ribosome during the process of *trans*-translation.

References:

- 1 Hallier M., Desreac J., Felden B. 2006. Small protein B interacts with the large and the small subunits of a stalled ribosome during trans-translation. NAR, 34: 1935-1943.
- 2 Kaur S., Gillet R., Li W., Gursky R., Frank J. 2006. Cryo-EM visualization of transfer messenger RNA with two SmpB in the stalled ribosome. PNAS, 103: 16484-16489.
- 3 Moore, S. D., and Sauer, R. T. (2007). The tmRNA System for Translational Surveillance and Ribosome Rescue. Annu Rev Biochem. 76:101-24.
- 4 Shpanchenko O. V., Zvereva M. I., Ivanov P. V., Bugaeva E. Yu., Rozov A. S., Bogdanov A. A., Kalkum M., Isaksson L., Nierhaus K. H., Dontsova O. A. 2005. Stepping tmRNA through the ribosome. J.Biol.Chem., 280: 18368-18374.
- 5 Sundermeier T.R., Karzai A.W. 2007. Functional SmpB-ribosome interaction requires tmRNA. JBC, 282: 34779-34786.

Клонирование, экспрессия в клетках *E.coli* и свойства рекомбинантной формиатдегидрогеназы из *Staphylococcus aureus***Войнова Наталья Сергеевна, Тишков Владимир Иванович**

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: vojnovanatalya@gmail.com

Анализ данных по секвенированию геномов патогенных микроорганизмов показал, что во многих патогенах, в том числе *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Legionella* содержатся гены, которые кодируют белки, гомологичные NAD⁺-зависимой формиатдегидрогеназе. Особый интерес представляет формиатдегидрогеназа из *Staphylococcus aureus* (SauFDH). Оказалось, что аминокислотная последовательность SauFDH имеет самую низкую гомологию с формиатдегидрогеназами из других источников и эволюционно отдалена от них. Таким образом, изучение механизма действия ФДГ из *Staphylococcus aureus* может прояснить каталитические особенности формиатдегидрогеназ из других источников. С другой стороны, недавно было показано, что формиатдегидрогеназа играет ключевую роль при росте *Staphylococcus aureus* в виде биопленок. В этих условиях количество мРНК SauFDH находится на третьем месте по сравнению со другими мРНК. Уровень экспрессии данного фермента в стафилококковых биопленках в 20 раз выше, чем при росте клеток в виде бульона. Известно, что биопленки *S.aureus* обладают повышенной резистентностью к антибиотикам и борьба с ними в условиях клиник является трудоемкой и дорогой задачей. Можно полагать, что поиск сильных специфических ингибиторов формиатдегидрогеназы из *S.aureus* поможет создать новые высокоэффективные лекарственные препараты для борьбы с биопленками этих патогенных бактерий.

В данной работе ген формиатдегидрогеназы из *Staphylococcus aureus* был клонирован из геномной ДНК с помощью ПЦР. Фермент был экспрессирован в клетках *E.coli* в активной и растворимой форме. Затем рекомбинантная ФДГ из *S.aureus* была получена в виде гомогенного препарата и были изучены ее кинетические свойства и термостабильность.

Было показано, что по сравнению с формиатдегидрогеназами из других источников ФДГ из *Staphylococcus aureus* имеет более высокие значения K_M по формиату и NAD⁺. Методом стационарной кинетики по начальным скоростям реакции найдено, что ферментативная реакция в случае этого фермента включает образование тройного фермент-субстратного комплекса. Также было изучено действие ряда ингибиторов ФДГ – азида, роданида и нитрита. Показано, что во всех случаях реализуется случай полного конкурентного ингибирования по отношению к субстрату – формиат-иону. Азид-ион оказался самым сильным ингибитором SauFDH. Его константа ингибирования K_i составила $8 \cdot 10^{-7}$ М, что в 8 раз больше, чем для формиатдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas sp.101*.

Для изучения термостабильности был использован подход, основанный на изучении кинетики термоинактивации при различных температурах. Показано, что процесс термоинактивации протекает в соответствии с кинетикой реакций первого порядка. Оказалось, что ФДГ из *S.aureus* обладает высокой термостабильностью, сравнимой с ФДГ из *Pseudomonas sp.101* и превышающей стабильность ФДГ из растений *A.thaliana*.

В настоящее время проводятся эксперименты по кристаллизации рекомбинантной ФДГ из *S.aureus* для определения трехмерной структуры с помощью рентгеноструктурного анализа.

Работа выполнена в рамках проекта РФФИ 08-04-01589.

Изучение механизма транслокации на бактериальной рибосоме.***Головина А.Я., Сергиев П.В.****Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия**E-mail: malanka@yandex.ru*

Бактериальная рибосома – сложный рибонуклеопротеиновый комплекс. Этап транслокации в ходе трансляции на рибосоме до конца не изучен и в настоящее время активно исследуется.

Цель данной работы - доказать гипотезу об участии «головы» 30S субчастицы рибосомы в перемещении транспортных РНК из А- и Р- в Р- и Е- сайты методами тоупринта и футпринтинга. Для проверки данной гипотезы в рамках текущей работы методами геной инженерии были сконструированы 16S рибосомные РНК со встроенным стрептавидиновым аптамером в спираль 33 и с пятью различными точечными мутациями в «шее» 30S субчастицы: вставка С в положении 1390 («i1390»), делеция G в положении 926 («d926»), вставка G - С пары в положении 930 («2xi»), делеция G - С пары в положении 930 («2xd»), замена двух оснований G на два основания С в положении 1387 («1387CC»). Данные мутации предположительно увеличивали или затрудняли подвижность «головы». Также был введен стрептавидиновый аптамер в 16S рибосомную РНК дикого типа. Гены 16S рРНК были введены в плазмиды, и вышеописанные 30S субчастицы были впервые выделены методом аффинной хроматографии на стрептавидиновой сефарозе со средней концентрацией около 4 пмоль/мкл. Метод выделения субчастиц был оптимизирован и отработан. Индивидуальность полученных 30S субчастиц была доказана методом удлинения праймера (primer extention). 50S – субчастицы были выделены из E.coli с использованием сахарозного градиента.

Методом тоупринта предполагается выявить различия в транслокации для полученных мутантных РНК. Нами ожидается, что для одних рибосом транслокация будет происходить спонтанно, без введения в реакцию элонгационного фактора G, а для других - транслокация будет менее выражена по сравнению с диким типом в присутствии данного фактора.

Роль N-концевого домена родопсинкиназы в механизме ее функционирования

**Григорьев Илья Игоревич, Ковалева Надежда Анатольевна,
Комолов Константин Евгеньевич, Чурюмова Валерия Александровна,
Тихомирова Наталья Константиновна, Сенин Иван Иванович**

*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,
Химический факультет, Москва, Россия
E-mail: grigoriev.ii@gmail.com*

Родопсинкиназа (РК) – это один из ключевых ферментов, участвующих в процессе передачи светового сигнала в фоторецепторных клетках (палочках) позвоночных животных. Под действием РК осуществляется множественное фосфорилирование фотовозбужденного рецептора родопсина, приводящее к десенситизации последнего. РК является представителем семейства протеинкиназ рецепторов, сопряженных с G-белками. Фермент представляет собой одну полипептидную цепь, состоящую из 558 аминокислотных остатков, С-конец которой модифицирован фарнезильной группой. Как и у других представителей семейства, на основании первичной структуры и гомологии в молекуле РК выделяют три функциональных домена: центральный киназный домен и регуляторные N- и С-концевые домены.

В настоящее время установлена функциональная роль РК, однако нет четкого представления о том, каким образом осуществляется регуляция каталитической активности фермента. Известно, что в фоторецепторных клетках присутствует Ca^{2+} -связывающий белок реCOVERин, который ингибирует РК. Кроме того, известно, что фосфорилирование РК протеинкиназой А или аутофосфорилирование по Ser²¹ вызывают снижение ферментативной активности. Тем не менее, регуляторная роль N- и С-концевых доменов РК остается неясной.

Для изучения роли регуляторных доменов РК в механизме ее функционирования были получены рекомбинантные фрагменты, соответствующие N-, С-концевым и киназному доменам РК. Показано, что за взаимодействие с реCOVERином отвечает только N-концевой домен, при этом киназный и С-концевой домены участия во взаимодействии с реCOVERином не принимают. При этом продемонстрировано, что в составе N-концевого домена только первые 25 аминокислотных остатков ответственны за Ca^{2+} -зависимое связывание реCOVERина. Также установлено, что N-концевой домен способен взаимодействовать с фотоактивированным родопсином. Для детализации участка связывания родопсина был сконструирован ряд делеционных мутантов N-концевого домена РК и исследована их способность взаимодействовать с родопсином. В частности, был получен фрагмент N-концевого домена, соответствующий первым 25 аминокислотным остаткам, который отвечает за Ca^{2+} -зависимое связывание с реCOVERином. Обнаружено, что данный фрагмент также обладает способностью взаимодействовать с родопсином, что может иметь важное значение в регуляции активности РК реCOVERином. При этом удаление участка N-концевого домена РК с 1 по 25 аминокислотные остатки не приводит к утрате способности взаимодействовать с родопсином, что позволяет предположить существование тройного комплекса – родопсин-родопсинкиназа-реCOVERин.

Для изучения влияния фосфорилирования по серину в 21 положении были получены мутанты N-концевого домена РК с заменой Ser²¹ на Ala и Asp. Нами было изучено влияние данной мутации на способность N-концевого домена РК Ca^{2+} -зависимым образом взаимодействовать с реCOVERином, а также ее влияние на взаимодействие N-концевого домена с фотоактивированным родопсином.

**Синтез новых поликатионных амфифилов, предназначенных для
нанокapsулирования нуклеиновых кислот¹****Гришаева А.О., Маслов М.А., Морозова Н.Г.**

*Московская государственная академия тонкой химической технологии имени
М.В. Ломоносова, факультет биотехнологии и органического синтеза, Москва, Россия
E-mail: grifly@mail.ru*

Новые технологии лечения наследственных и приобретенных заболеваний с использованием олиго- и полинуклеотидов в значительной степени зависят от разработки системы доставки, способной эффективно транспортировать нуклеиновую кислоту в клетку-мишень. В связи с потенциальной опасностью вирусных систем доставки разрабатываются альтернативные векторы на основе катионных липидов. Катионные липиды обладают рядом достоинств: защищают ДНК от разрушительного воздействия ферментов, могут переносить нуклеиновые кислоты практически неограниченного размера, кроме того, неиммуногенны и биоразлагаемы. Использование в качестве конденсирующего модуля модифицированных полиаминов (спермин, спермидин) позволяет увеличить эффективность трансфекции и минимизировать нежелательные побочные эффекты. Кроме того, наличие в составе липидов углеводных остатков способствует повышению коллоидной стабильности липоплексов и понижению цитотоксичности молекулы, а также может интенсифицировать процесс проникновения липоплексов в клетку по механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза. Целью данной работы была разработка и оптимизация метода получения поликатионных гликолипидов с потенциальной трансфицирующей активностью.

Структура целевых амфифилов отвечает требованиям, предъявляемым к катионным липидам, используемым в трансфекции: гидрофобный домен представлен остатком 1,2-ди-*O*-тетрадецил-*rac*-глицерина, а полярной поликатионной «головкой» является остаток молекулы спермина, легко протонирующейся в физиологических условиях. В роли связующего звена между этими двумя доменами выступает остаток *N*-(6-гидроксигексил)амида 4-нитробензолсульфокислоты, который с одной стороны является узловым модулем связывания с защищённым полиамином через сукцинильный спейсер (за счёт превращения *p*-нитрогруппы в аминогруппу), а с другой позволяет вводить в молекулу различные углеводные заместители по гидроксильной группе.

Получение катионных липидов включало несколько этапов. На первом проводили алкилирование *N*-(6-гидроксигексил)амида 4-нитробензолсульфокислоты действием 1,2-ди-*O*-тетрадецил-3-бром-*rac*-глицерина в присутствии карбоната цезия. Введение углеводных остатков (галактоза и лактоза) осуществляли в условиях модифицированного метода Кенигса–Кнорра в аппарате Сокслета, получая преимущественно β-аномеры с выходами 65% и 58%. Дальнейшее каталитическое восстановление нитрогруппы ароматического кольца до аминогруппы и ацилирование последней янтарным ангидридом давало ключевой синтон, по карбоксильной группе которого затем осуществляли реакцию конденсации с избирательно защищенной молекулой спермина. На завершающих этапах синтеза проводили деблокирование аминогрупп спермина и удаление ацетильных защит углеводов остатков.

В результате работы были получены поликатионные амфифилы с галактозильными и лактозильными адресными маркерами. Структура полученных соединений подтверждена с помощью ¹H и ¹³C-ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии и элементного анализа.

¹ Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (07-03-00632-а).

Изучение комплексов белка р-50-NF-кВ с модифицированными олигонуклеотидами**Евлаков Константин Иванович***Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия**E-mail: Konstantin-123@yandex.ru*

Эукариотический фактор транскрипции NF-кВ является одним из ключевых регуляторов генной экспрессии. При активации этого белка в клетке он транслоцируется в ядро, где связывается с десятизвенным участком хромосомной ДНК (кВ-сайтом) и участвует в транскрипции генов различных белков, в том числе сигнальных белков и белков иммунного ответа, вследствие чего этот фактор транскрипции рассматривается как важнейший элемент в защитной реакции организма. Нарушение регуляции активности NF-кВ в клетке может приводить к перерождению нормальных клеток в опухолевые, их пролиферации и формированию множественной лекарственной устойчивости. Поэтому детальное изучение этого белка и его комплексообразования с ДНК является необходимым этапом в разработке противоопухолевой терапии, основанной на создании ДНК-ловушек.

Целью настоящей работы явилось получение синтетических ДНК-дуплексов, содержащих в своей структуре кВ-сайт, и способных образовывать специфический комплекс с NF-кВ.

Для создания реагента, обладающего способностью максимально эффективно связываться с NF-кВ в работе изучены ДНК-дуплексы различной первичной структуры. Для получения ДНК-дуплексов, содержащих 1, 2, 3 и более кВ-сайтов, использован метод химического лигирования 23-звенных олигонуклеотидных блоков, образующих при самоассоциации ДНК-подобные структуры конкатемерного типа. Комплексообразование между белком и ДНК-дуплексами детектировали методом «торможения» в 6%-ном нативном ПААГ. Показано образование специфического комплекса с NF-кВ для всех синтезированных ДНК-дуплексов. Впервые изучено взаимодействие конкатемерного ДНК-дуплекса с разрывами в обеих цепях ДНК с NF-кВ и показано, что эффективность его комплексообразования с белком сравнима с эффективностью комплексообразования дуплексов, не содержащих разрыва в цепи. Это позволило конструировать ДНК-лиганды для эффективного связывания NF-кВ на основе коротких олигонуклеотидов, что не только упростило синтез этих лигандов, но и позволило вводить в разрыв цепи химически активные группировки. Наличие химически активной группировки обеспечивает возможность необратимого ковалентного связывания между белком и ДНК-лигандом. Нами получены два типа производных: ДНК – дуплексы, содержащие химически активную НОВt (N-оксобензотриазольную группу) в дуплексах с разрывом цепи; и тризамещенную пирофосфатную группу (ТЗПГ) в дуплексах без разрыва цепи. Установлено, что ковалентное связывание активированных ДНК-дуплексов с р50-NF-кВ протекает с различной эффективностью в зависимости от метода активации, и в настоящее время изучаются факторы, влияющие на эффективность ковалентного связывания, и подбираются оптимальные условия образования ковалентных комплексов.

Повышение фототоксичности фотодитазина под действием плуроников¹***Жиентаев Тимур Махмедович****Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия**E-mail: zhiyentayev@mail.ru*

Фотодинамическая терапия (ФДТ) широко используется для лечения поверхностных форм рака, гнойных ранений и в косметологии. Механизм лечения методом ФДТ заключается в использовании порфириновых фотосенсибилизаторов (ПФ). Эти вещества способны избирательно локализоваться в поражённой ткани и генерировать в ней синглетный кислород под действием света. Окислительные процессы с участием синглетного кислорода приводят к гибели поражённой ткани. Основным достоинством этого метода является избирательность и, как следствие, выживаемость здоровых тканей. Однако в ряде случаев возникают побочные эффекты, например, чувствительность кожи пациентов к солнечному свету, которая вызвана использованием высоких доз ПФ. Целью этой работы является повышение фототоксичности ПФ в процессе лечения методом ФДТ, что в свою очередь, позволит снизить используемые в терапии дозы ПФ и сохранить лечебный (фототоксический) эффект на прежнем уровне. В ходе исследований было показано, что решение поставленной задачи заключается в использовании амфифильных полимеров, триблоксополимеров этиленоксида и пропиленоксида (ПЭО-ППО-ПЭО), также известных как плуроники. Эти полимеры обладают одновременно двумя важными свойствами: низкой токсичностью и высокой физиологической активностью. Обнаружено, что использование ПФ совместно с плурониками, взятыми в заведомо нетоксических концентрациях, приводит к повышению фототоксичности ПФ по отношению к малигнизированным клеткам в культуре.

Выяснение механизма обнаруженного эффекта, вероятно, сможет помочь в поиске «оптимальных» полимера, ПФ и условий проведения лечения методом ФДТ. Для выяснения природы механизма была изучена кинетика накопления фотодитазина (ПФ) в фибробластах мышцы в культуре в отсутствие и присутствии плуроника F127. Оказывается, что полимер не влияет на скорость накопления фотодитазина в клетках. Таким образом, действие полимера не связано с изменением количества фотодитазина в клетках. На следующем этапе было обнаружено, что в присутствии плуроника F127 доля клеток погибших по механизму некроза в ходе ФДТ резко возрастает, что свидетельствует о том, что полимер значительно изменяет природу механизма фототоксичности фотодитазина. Недавно обнаружено, что плуроник способен снижать количество АТФ в клетке. Таким образом, увеличение доли погибших клеток по механизму некроза может быть связано с подавлением репарационной и антиоксидантной функции клетки. Также было изучено влияние природы полимера на величину обнаруженного эффекта. Обнаружено, что плуроники с небольшим ППО блоком (напр., L61) не оказывают заметного эффекта в отличие от плуроников с большим ППО (напр., F127) блоком. При этом известно, что плуроник встраивается в мембрану ППО блоком и нами показано, что плуроник F127 обладает большей способностью образовывать дефекты в мембране липосом, чем плуроник L61. Из результатов работы мы сделали предположение, что амфифильные полимеры, встраиваясь в липидную мембрану клетки и снижая количество АТФ в ней, подавляют репарационные и антиоксидантные процессы, повышая, таким образом, фототоксичность фотодитазина в процессе ФДТ раковых клеток в культуре.

¹ Тезисы доклады основаны на материалах исследований, выполненных при финансовой поддержке ОХНМ РАН (госконтракт 10002-251 (07/125-121/200704-032)), а также Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 07-02-00066-а) и гранта поддержки ведущих научных школ НШ5899.2006.3.

Аптамерные ДНК к интерлейкину-6 человека

¹Завьялова Елена Геннадиевна, ²Цыганова Марина Олеговна, ³Спиридонова Вера Алексеевна

¹Химический факультет, ²Факультет Биоинженерии и Биоинформатики, ³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
zlenka2006@rambler.ru

Новый мощный метод селектирования олигонуклеотидов, связывающих белковую мишень (SELEX), позволяет выделить так называемые ДНК-аптамеры – небольшие фрагменты ДНК, которые образуют стабильные и специфичные комплексы. По специфичности и аффинности аптамеры являются аналогами моноклональных антител, но их несомненное преимущество состоит в том, что аптамеры могут быть масштабированы химическим автоматическим синтезом.

Интерлейкин-6 человека (hIL-6) участвует в регуляции пролиферации и дифференцировки гемопозитических клеток. Избыточная концентрация hIL-6 в крови индуцирует злокачественное перерождение клеток, поэтому поиск ингибиторов его биологической активности актуален.

Цель работы – получение аптамерных ДНК, обладающих сродством к hIL-6.

Для селекции с помощью аффинной хроматографии hIL-6 был иммобилизован на BtCN-активированной сефарозе, при этом hIL-6 сохранил нативную конформацию участка связывания с клеточным рецептором, что показано проточной цитофлуориметрией. Было проведено 12 циклов селекции, и выделена обогащенная фракция аптамерных ДНК, специфически связывающая hIL-6. Константа диссоциации комплекса обогащенной фракции с hIL-6 составляет 300 ± 30 нМ. После клонирования будут выбраны наиболее эффективные варианты аптамеров, которые будут тестированы как ингибиторы биологической активности hIL-6 (его взаимодействия с рецептором hIL-6R). Получение аптамеров к hIL-6 позволит более эффективно изучать механизмы взаимодействия hIL-6 с рецепторами и его системы передачи сигнала.

Работа поддержана грантом РФФИ 08-04-01244.

Антимикробная активность модифицированного синтетического волокна хитозаном¹**Захаржевская Мария²***Национальный Университет Узбекистана, Ташкент, Узбекистан**E-mail:girl_m84@mail.ru*

При постановке задачи исследований по получению перевязочных материалов с использованием хитина и его производных в качестве антимикробных средств и их применению в особо сложных ситуациях, связанных с некрозом тканей и наличием гнойных инфекций, вызванных рядом паталогий, и в том числе тяжелыми формами сахарного диабета, мы опирались на имеющиеся обширные сведения по эффективному действию этих аминополисахаридов в восстановлении поврежденных тканей и подавлении различных видов микроорганизмов [1,2].

В Республиканском Центре гнойной хирургии Министерства Здравоохранения Республики Узбекистан изучена антимикробная активность хитозана различной степени деацетилирования при воздействии на такие микроорганизмы как кишечная палочка, синегнойная палочка, гемолитический стафилококк, грибы рода кандиды, золотистый стафилококк, и протей.

При изучении действия хитозана на рост микроорганизмов выявлена наиболее высокая антимикробная активность по отношению к кишечной палочке, гемолитическому стафилококку, золотистому стафилококку и протей (*Escherichia coli*, *Haemolytic staphylococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus*). При определении антимикробной активности диаметр дисков составил от 5 до 10 мм в зависимости от степени деацетилирования хитозана. Нечувствительными оказались синегнойная палочка и грибы.

Наиболее активными оказались образцы хитозана со степенью деацетилирования СДА=84,2% и СДА=88,1%. Они проявили активность по отношению к кишечной палочке, золотистому стафилококку и протей. Образец хитозана со СДА=96,8% в бактерицидном отношении оказался менее активным, чем образец со СДА=84,2% (только кишечная палочка была умеренно чувствительна). Высокомолекулярный хитозан, используемый в качестве контроля, не проявил антибактериальной активности во всех исследуемых пробах. Все перечисленные микроорганизмы оказались устойчивыми по отношению к контрольному образцу.

Таким образом, изучена антимикробная активность хитозана различной степени деацетилирования по отношению к наиболее часто встречаемым штаммам возбудителей различных гнойно-некротических заболеваний, который в дальнейшем использован для модификации различных видов полиакрилонитрильных (ПАН) волокон.

1 Скрыбин К.Г., Вихорева Г.А., Варламов В.П. (2002). Хитин и хитозан. М.: Наука, 365 с.

2 Рашидова С.Ш., Мусаев У.Н., Воропаева Н.Л., Мухамедиев М., Тешаев О.Р., Икрамова М.Э. (2006) Разработка комбинированных бактерицидных перевязочных материалов для лечения гнойно-некротических заболеваний мягких тканей // В сб. Мониторинг распространения и предотвращения особо опасных болезней животных и птиц: Самарканд, с..22.

¹ Тезисы доклады основаны на материалах исследований, проведенных в рамках ГНТП РУз А-10-031 «Разработка комбинированных бактерицидных перевязочных материалов для лечения гнойно-некротических заболеваний мягких тканей».

² Автор выражает признательность д.х.н. Махамедиеву М.Г., д.х.н. Воропаевой Н.Л. и д.м.н. Тешаеву О.Р. за помощь в подготовке тезисов.

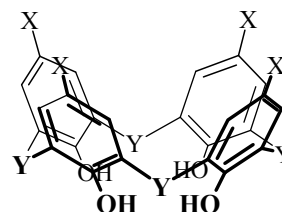
Комплексы Gd(III) и Mn(II) на основе дифильных каликс[4]аренов для магнитной резонансной томографии¹

Зиятдинова А.Б., Бурилова Е.А., Кононова А.В.²

Химический институт им. А.М.Бутлерова Казанского госуниверситета, Казань, Россия
E-mail: annette_zb@mail.ru

Магнитно-резонансная томография (МРТ) стала важным методом диагностики многих видов патологий. С ее помощью можно получить послойные ЯМР изображения объекта, и, таким образом, неинвазивно исследовать внутреннюю структуру органов. Однако часто необходимо дополнительное усиление контрастности томографических изображений. Для этого используют контрастные агенты (КА), подавляющее большинство которых представляет собой комплексные соединения металлов. Одним из главных недостатков коммерческих КА является низкая релаксационная эффективность, вынуждающая вводить в организм высокие дозы агента. Их релаксационность не превышает $3-5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, в то время как теоретически возможные значения могут достигать $100 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. В связи с этим актуальна проблема разработки новых типов лигандов, комплексы которых с парамагнитными зондами, наряду с необходимой устойчивостью, обладали бы также высокой релаксационной эффективностью.

В этом плане интерес представляют дифильные производные каликсаренов, способные координировать ионы металлов. Лёгкость функционалирования каликсаренов позволяет создать гидрофильно-липофильный баланс, достаточный для проникновения металлокомплексов через биомембраны. Кроме того, возможность включения фрагментов белков в ароматическую полость каликсаренов (по типу «гость-хозяин») может обеспечить определенную селективность действия комплекса в качестве КА в организме.



Основным методом исследования был выбран метод ядерной магнитной релаксации, который позволяет одновременно выявить устойчивость комплекса и его релаксационность и таким образом - оценить эффективность металлокомплекса в качестве КА. В качестве парамагнитного зонда использовались ионы Mn(II) и Gd(III), обеспечивающие значительно укорочение времен релаксации при низком содержании ионов металлов.

В настоящей работе представлены результаты исследования состояния и комплексообразующей способности тетрадецильного производного тетрасульфатокаликс[4]арена и тетраацетатного тетра-*n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена в конформации конус. Для перевода тетраацетатного тетра-*n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена в водорастворимое состояние использовали мицеллообразующие растворы неионных поверхностно-активных веществ (НПАВ). Было обнаружено, что сочетание ионных (сульфонатных или карбоксильных) групп и гидрофобных алкильных (додецильных или трет-бутильных) заместителей в молекулах каликсаренов позволяет формировать им как собственные (в воде), так и смешанные агрегаты с молекулами НПАВ (в мицеллярной среде). Этот процесс сопровождается

¹ Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта РФФИ 06-03-32063 и программы Минобразования и науки РФ "Развитие научного потенциала высшей школы на 2006-2008 г.г." (РНП 2.1.1.4794).

² Авторы благодарят доц. Амирова Р.Р. и доц. Сапрыкову З.А. за помощь в подготовке тезисов, доц. Соловьеву С.Е., доц. Стойкова И.И. и проф. Антипина И.С. за предоставление образцов каликс[4]аренов.

резким (в 4-8 раз по сравнению с аква-ионом) ростом релаксивности в системах ион металл - каликсарен. Скорости протонной спин-решёточной релаксации изученных комплексов ($60 \text{ мМ}^{-1}\text{с}^{-1}$ в случае Gd(III) и $74 \text{ мМ}^{-1}\text{с}^{-1}$ в случае Mn(II)) намного превышали значения релаксивности коммерческих КА.

Полученные результаты могут быть полезны для определения стратегических путей разработки новых функциональных контрастных МРТ-агентов.

Гидрооксалаты γ -аминопропилсилановКоваленко Виктор Викторович¹

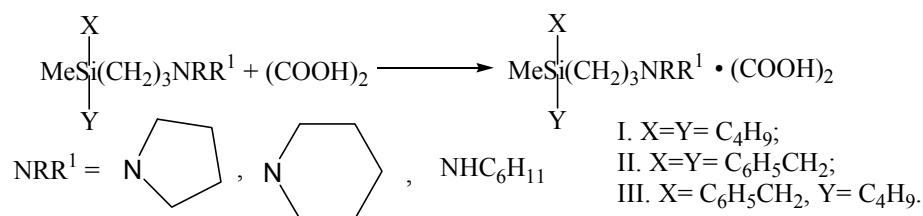
Брестский государственный университет им. А.С. Пушкина, Брест, Беларусь

E-mail: shupenik@brsu.brest.by

Одним из наиболее приоритетных направлений современной химической науки является поиск биологически активных соединений. Наиболее перспективны в этом плане новые типы химических соединений.

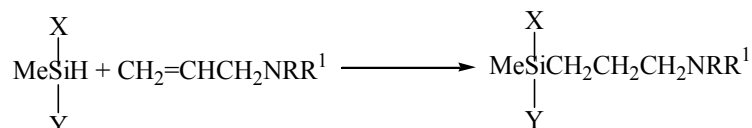
Кремнийорганические соединения представляют значительный интерес как потенциальные регуляторы роста растений. На основе пятикоординированных соединений кремния, силатранов, уже созданы регуляторы роста. Однако соединения этого класса имеют некоторые недостатки.

С целью получения экологически безопасных регуляторов роста растений нового поколения нами были синтезированы новые растворимые в воде кремнийорганические соединения — гидрооксалаты γ -аминопропилсиланов. Названные соединения были получены из соответствующих аминопропилсиланов в результате их взаимодействия с эквимольным количеством щавелевой кислоты в органическом растворителе при комнатной температуре:



Выход продуктов близок к количественному.

Исходные аminosилильные производные были получены реакцией гидросилилирования соответствующих ненасыщенных аминов:



Реакция осуществлялась в условиях нагревания реагентов без растворителя в присутствии каталитического количества 0,1 М раствора H₂PtCl₆·6H₂O в ТГФ.

Исследована рострегулирующая активность синтезированных гидрооксалатов. Определены концентрации их водных растворов, которые оказывали стимулирующий эффект на энергию прорастания, всхожесть семян и общий прирост длины зародышевых корешков [1, 2].

Литература

1. Ламакова В.А., Коваленка В.В., Лук'янчик І.Д., Юўка А., Салішчаў В.Г., Ярчак М.П. (2006) Біялагічная актыўнасць крэмнійарганічных злучэнняў 2*Гідрааксалаты метылдыбутыл- γ -амінапрапілсіланаў // Веснік Брэсцкага ўніверсітэта. Сер. прыродазнаўчых навук, №3 (27). (Бел.)
2. Ламакова В.А., Коваленка В.В., Лук'янчик І.Д., Юўка А., Салішчаў В.Г., Ярчак М.П. (2007) Біялагічная актыўнасць крэмнійарганічных злучэнняў 4. Гідрааксалаты метылдыбутылбензіл- γ -амінапрапілсіланаў // Веснік Брэсцкага ўніверсітэта. Сер. прыродазнаўчых навук, №1 (28). (Бел.)

¹ Автор выражает глубокую признательность и благодарность профессору, д.х.н. Ерчаку Н.П. за совместно проведенные исследования.

Мутантные формы люциферазы светляков с измененными спектрами билюминесценции и повышенной термостабильностью**Кокшаров Михаил Иванович***Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия**E-mail: mkoksharov@enz.chem.msu.ru*

Люцифераза светляков (КФ 1.13.12.7) катализирует реакцию окисления люциферина кислородом воздуха в присутствии АТФ и Mg^{2+} , сопровождающуюся излучением света. Благодаря высокой каталитической активности и специфичности к АТФ, простоте регистрации билюминесцентного сигнала люцифераза светляков широко применяется для определения АТФ и в качестве гена-маркера при изучении различных биохимических процессов.

Для большинства нативных люцифераз светляков характерна сильная рН-зависимость спектра билюминесценции. В частности, у изучаемой нами люциферазы светляков *Luciola mingrelica* при понижении рН из щелочной (рН>7.8) в кислую область (рН<6.0) цвет билюминесценции меняется с желто-зеленого ($\lambda_{max}=566$ нм) на красный ($\lambda_{max}=618$ нм). Несмотря на многочисленные исследования различных люцифераз, причины и механизм этого процесса до сих пор являются предметом обсуждения.

С помощью случайного мутагенеза первых 225 аминокислотных остатков люциферазы светляков *Luciola mingrelica* были получены четыре мутантных фермента с пониженной чувствительностью спектра билюминесценции к рН. Показано, что в результате замены F16L зависимость спектра билюминесценции от рН заметно уменьшилась, а замены Y35N, Y35H и F16L/A40S привели к люциферазам, спектры билюминесценции которых практически не изменяются в интервале рН 7,8-6,0. Предложено структурное объяснение эффекта замен на рН-чувствительность спектра билюминесценции люциферазы.

Одним из недостатков люциферазы светляков, затрудняющим её применение, является низкая стабильность при повышенных температурах. Использование нескольких циклов случайного мутагенеза со скринингом мутантов люциферазы *in vivo* (в клетках *E. coli*) по активности после инкубации при 37-50°C позволило получить ряд мутантов со значительно большей термостабильностью.

Выделение и исследование полисахаридного комплекса липы обыкновенной***Короткова Екатерина Михайловна****Тверской государственной технической университет, г. Тверь, Россия**E-mail: sulman@online.tver.ru*

В последнее время все более актуальной становится задача поиска эффективных средств, оказывающих влияние на иммунные реакции организма. Так как синтетические иммуномодуляторы имеют ряд недостатков (аллергии, побочные эффекты, высокая стоимость и т.д.), то перспективным является поиск иммуномодуляторов природного происхождения. Многие исследователи связывают иммуномодулирующие свойства растений и фитопрепаратов с полисахаридами, при этом установлено, что полианионные структуры с урановыми кислотами являются более сильными иммуностимуляторами, чем нейтральные полисахариды.

Одним из новых и перспективных источников полисахаридов являются цветки липы сердцевидной, которые давно используются в медицине в виде настоя или отвара при простудных заболеваниях, пиелитах, как мочегонное.

Представленная работа посвящена выделению и анализу водорастворимого полисахаридного комплекса липы сердцевидной. В литературе описаны антигипоксическое, психотропное, противовоспалительное, ранозаживляющее, иммуностропное действия экстракта полисахаридов цветков липы сердцевидной.

В результате выполнения работы была определена общая сумма сахаров в цветках липы сердцевидной (около 6%), а также установлено количество восстанавливающих сахаров (примерно 4,45%). Экспериментально доказано, что полисахаридный комплекс цветков липы включает галактозу, глюкозу, рамнозу, арабинозу, ксилозу и галактуроновою кислоту.

Для повышения эффективности процесса экстракции было использовано низкочастотное ультразвуковое воздействие, позволяющее сократить время экстракции, а также повысить выход полисахаридов в раствор. Для подтверждения сохранения структуры гликанов при ультразвуковой экстракции использован метод инфракрасной Фурье-спектроскопии. Анализ ИК спектров позволяет отнести выделенный полисахаридный комплекс к кислым полисахаридам, что в свою очередь позволяет рассматривать их в качестве перспективных компонентов для создания функциональных продуктов питания, повышающих иммунный статус.

Литература

1 Перспективы использования растительных полисахаридов в качестве лечебных и лечебно-профилактических средств / Н.А. Криштанова [и др.] //Вестник ВГУ. Серия: химия, биология, фармация. – 2005. -№1. – С.212 – 221

2 Paulsen B.S. Plant polysaccharides with immunostimulatory activities / B.S. Paulsen //Current Organic Chemistry. – 2001. № 5. – С. 939-950

3 Oligosaccharides engineering from plants and algae applications in biotechnology and therapeutics / C. Delattre etc. // Minerva Biotech- 2005.- №17 – P.107 –117

4 Rodgers S. Value adding with functional meals / S. Rodgers // Food Service Technology/ - 2004. - № 4. – P.149 –158

**Характеристика липосом, содержащих диглицеридные производные
противоопухолевых препаратов мелфалана и метотрексата****Кузнецова Н.Р., Кандыба А.Г., Кадыков В.А., Хуцян С.С. *, Гаенко Г.П., Водовозова
Е.Л., Молотковский Ю.Г.***Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
г. Москва, Россия**Институт биофизики клетки, г. Пуцзино, Россия**E-mail: natalia@lipids.ibch.ru*

Включение противоопухолевых препаратов в состав наноносителей позволяет уменьшить объем распределения лекарства в организме, а значит повысить локальную концентрацию в опухоли. Это, в свою очередь, снижает неспецифическую активность препаратов и позволяет при необходимости вводить более высокие дозы лекарств. Кроме того, повышенная проницаемость капилляров неоплазмы обуславливает пассивный транспорт носителей в опухоли.

В данной работе всесторонне охарактеризованы липосомальные препараты, несущие в липидном бислое конъюгаты мелфалана и метотрексата (MTX) с *rac*-1,2-диолеоилглицерином (Mlph-DG и MTX-DG, соответственно) в концентрациях, пригодных для системного введения животным (4 мМ). Показано, что Mlph-DG/MTX-DG полностью (в количестве 10 мол. %) включаются в состав моноламеллярных липосом на основе природных фосфолипидов среднего диаметра 50–150 нм. Размеры, ламеллярность и степень агрегации липосом контролировали с помощью динамического лазерного светорассеяния и электронной микроскопии (методы замораживания-скалывания и негативного контрастирования); состав – с помощью гель-хроматографии в сочетании с УФ-спектрофотометрией. Дисперсии лекарственных липосом сохраняются без существенной агрегации в течение нескольких дней при +4 °С. Глубокое замораживание (в N₂ жид.) дисперсий позволяет хранить их при –70 °С в течение месяцев. После размораживания кратковременная обработка на УЗ-бане полностью восстанавливает состав и размер частиц.

В опытах *in vitro* показано, что MTX-DG в составе липосом способен преодолевать лекарственную устойчивость опухолевых клеток, связанную с нарушением трансмембранного переноса. Резистентность линии клеток лейкемии человека, характеризующейся дефицитом белка-транспортера восстановленных фолатов, уменьшилась в 114 раз при переходе к липосомальной форме MTX-DG, по сравнению с исходным лекарством.

Исследуется устойчивость конъюгатов в составе липосом к действию эстераз плазмы крови. Инкубация MTX-DG в липосомальной форме в 80% плазме при +37 °С с ВЭЖХ-анализом образцов показала, что деградации конъюгата MTX-DG до исходного MTX в данных условиях не происходит.

Влияние соединений различных классов на лизис клеточных стенок бактерий под воздействием бактериолитических ферментов

Легоцкий С.А., Левашов П.А., Чертков О.В. *, Мирошников К.А. *, Левашов А.В., Клячко Н.Л.

Химический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия
**Институт биоорганической химии имени Шемякина-Овчинникова РАН*
sergey.legotsky@miclab.chem.msu.ru

Применение антибиотиков при лечении бактериальных инфекций имеет ряд недостатков. К таковым, например, можно отнести появление резистентности к антибиотикам у штаммов бактерий, угнетение бактерий, необходимых для нормальной жизнедеятельности. Последнее время в качестве альтернативы антибиотикам рассматриваются бактериолитические ферменты, продуцируемые бактериофагами на различных стадиях заражения бактерий. Сложность использования эндолизиннов, предназначенных для лизиса бактериальных клеток «изнутри», для «работы извне» в случае грам-отрицательных бактерий заключается в том, что клеточная стенка таких бактерий снаружи и внутри существенно отличается. Для решения проблемы могут быть использованы различные подходы, в частности, дополнительное воздействие на клеточную стенку бактерий с целью дестабилизации различных входящих в ее состав компонентов.

Данная работа посвящена изучению влияния соединений различных классов (солей, поверхностно-активных веществ, белков, полипептидов) на ферментативный лизис грам-отрицательных бактерий *Salmonella enteritidis* и *Pseudomonas aeruginosa*. Изучалось влияние добавок на скорость ферментативного лизиса и глубину протекания реакции.

Обнаружено, что лизис клеток *Salmonella enteritidis* ускоряется в присутствии плюронинов различной гидрофобности в диапазоне концентраций 0,01 – 0,1%. В случае лизиса *Pseudomonas aeruginosa* увеличения скорости реакции не наблюдалось, однако присутствие некоторых плюронинов обеспечивало большую глубину лизиса клеток. Эффект ускорения лизиса клеток *Pseudomonas aeruginosa* наблюдался в присутствии гликозидаз различной специфичности. Причины выявленных эффектов обсуждаются.

Данная работа выполнялась в рамках проекта IPP Contract N405911-A-K5 (PNNL)

Отнесение сигналов ЯМР и исследование структуры белка С-домена фактора терминации трансляции eRF1

**Манцызов Алексей Борисович^{†1}, Иванова Елена Владимировна², Бирдсалл Берри³,
Польшаков Владимир Иванович¹, Киселев Лев Львович²**

¹ Центр магнитной томографии и спектроскопии МГУ им. М.В. Ломоносова

² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

³ Национальный институт медицинских исследований, Лондон, Великобритания
mants@inbox.ru

Белок eRF1 является фактором терминации трансляции I класса и играет ключевую роль в процессе остановки биологического синтеза белка. В структуре eRF1 выделяют три домена. N – терминальный домен участвует в узнавании стоп-кодонов (UAA, UAG или UGA). В составе среднего (M) домена располагается строго консервативная аминокислотная последовательность GGQ. При формировании терминационного комплекса эти три остатка попадают в пептидилтрансферазный центр рибосомы и участвуют в катализе реакции гидролиза сложноэфирной связи между синтезированной полипептидной цепью и т-РНК. С-терминальный домен eRF1 взаимодействует с С-доменом фактора терминации трансляции II класса eRF3 и играет регуляторную роль в указанном процессе [1]. Предполагается, что связывание eRF1, eRF3 и GTP с рибосомой происходит кооперативно, что определяет увеличение аффинности eRF1 по отношению к рибосоме при образовании терминационного комплекса [2].

На текущий момент известна структура белка eRF1, полученная методом рентгеновской кристаллографии [3]. Она имеет разрешение 2.8 Å и содержит обширные неразрешенные фрагменты, преимущественно в области С-домена eRF1. Этот факт свидетельствует о наличии высоко подвижных фрагментов в структуре домена. Существует предположение, что связывание eRF1 и eRF3 приводит к существенным конформационным изменениям в структуре как С – домена, так и белка eRF1 в целом. Механизм регуляции терминации трансляции, основанный на взаимодействии eRF1 и eRF3 остается мало изученным. Установление структуры С-терминального домена eRF1 может внести вклад в решение данной проблемы.

В рамках настоящей работы проведено практически полное отнесение сигналов атомов основной и боковых цепей в спектрах ЯМР С-домена eRF1 (89% ¹H, ¹³C и ¹⁵N атомов основной и 75% неароматических атомов боковых цепей). Установлено, что ряд областей полипептидной цепи С-домена существует в виде двух конформеров с почти равной населенностью, медленно (в шкале времени от секунд до часов) обменивающихся друг с другом. Значения химических сдвигов ядер ¹H и ¹³C белковой цепи позволили определить элементы вторичной структуры белка. Полученные данные будут использованы для расчета структуры С-домена eRF1 в растворе.

Литература

1. Kisselev, L.L. and R.H. Buckingham (2000) Translational termination comes of age // Trends Biochem Sci, 25(11): p. 561-6.
2. Alkalaeva, E.Z., et al. (2006) In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3 // Cell, 125(6): p. 1125-36.
3. Song, H., et al. (2000) The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1--mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis // Cell, 100(3): p. 311-21.

Обнаружение остаточных количеств высокотоксичного пестицида тетраметилтиурамдисульфида (ТМТД) в пробах молока**Николаева Татьяна Геннадьевна, Кольцов Владимир Валерьевич**

МОУ «СОШ № 14» г. Чебоксары, ОАО «Чувашский бройлер», г. Чебоксары, Россия

E-mail: nikolaeva_tg@mail.ru, koltsov_v@mail.ru

В настоящее время проблемы нежелательного воздействия пестицидов на окружающую среду и здоровье человека, а также утилизации пестицидов с истекшим сроком годности, не соответствующих техническим нормам и запрещенных к применению, до сих пор остаются неразрешенными. Наиболее распространенным серосодержащим пестицидом среди препаратов с истекшим сроком хранения является тетраметилтиурамдисульфид (ТМТД). В 1992 году ТМТД был исключен из «Перечня разрешенных к применению пестицидов». Между тем, химические свойства этого серосодержащего соединения позволяют рассматривать его как источник синтетических фрагментов, позволяющих организовать его экономически выгодную утилизацию. Известно, что ТМТД является не только биологически активным соединением, но и эффективным ускорителем вулканизации, применение которого позволяет получать резины с повышенной теплостойкостью.

Таким образом, актуальность проведенных исследований определяется необходимостью контроля качества молока, как высокоценного и незаменимого продукта питания для взрослых, в особенности детей, а также важным значением ТМТД при производстве резины в качестве эффективного вулканизатора.

Целью данной работы является исследование различных проб молока на содержание тетраметилтиурамдисульфида и рассмотрение способов утилизации ТМТД.

Материал для работы был взят в сентябре и октябре 2007 г. из хозяйств 8 районов Чувашской Республики, включая г. Чебоксары. Всего было отобрано и проанализировано 39 проб молока. Методика определения ТМТД в молоке заключается в следующем: в пробирку помещают 2-3 мл исследуемого молока и добавляют 5 капель 5%-ного раствора сульфата меди, тщательно перемешивают, жидкость окрашивается в синий цвет. Затем прибавляют 5-7 капель серной кислоты (10%-ный раствор); молоко при этом свертывается, синяя окраска исчезает, но при наличии ТМТД появляется салатное окрашивание, усиливающиеся при нагревании.

Результаты и выводы: 1) Социологический опрос населения г. Чебоксары показал, что основным видом молочной продукции, употребляемой горожанами, является молоко. Всего было опрошено 200 человек в возрасте от 17 до 70 лет. 2) Анализ молочной продукции 4 производителей («Чувашский городской молочный завод», ОАО «Моргаушский молочный завод», ОАО «Ядринмолоко», ОАО «Вурнарский завод СОМ»), представленной на прилавках магазинов «Росинка» и «Магнит» г. Чебоксары, показал отрицательный результат на наличие пестицида. 3) Остаточные количества ТМТД были обнаружены в пробе молока из деревни Ниж. Кибекси Цивильского района Чувашской Республики. 4) Интерес представляет возможность десульфирования ТМТД с получением тетраметилтиураммоносульфида (тиурама-мм), активного ускорителя вулканизации смесей каучуков, но менее токсичного по сравнению с ТМТД. По литературным данным, в качестве десульфлирующего реагента в основном используют синильную кислоту или ее соли, а также трифениларсин. Нами проведен эксперимент по превращению высокотоксичного пестицида ТМТД в менее токсичный вулканизатор резины тиурам-мм путем десульфирования ТМТД цианидом натрия в присутствии концентрированной серной кислоты. 5) Влияние мольного соотношения между исходными реагентами (ТМТД/NaCN) на выход целевого продукта (тиурам-мм) показало, что использование большого избытка цианида натрия по отношению к ТМТД нецелесообразно, поскольку ведет к увеличению объема сточных вод, подлежащих дегазации.

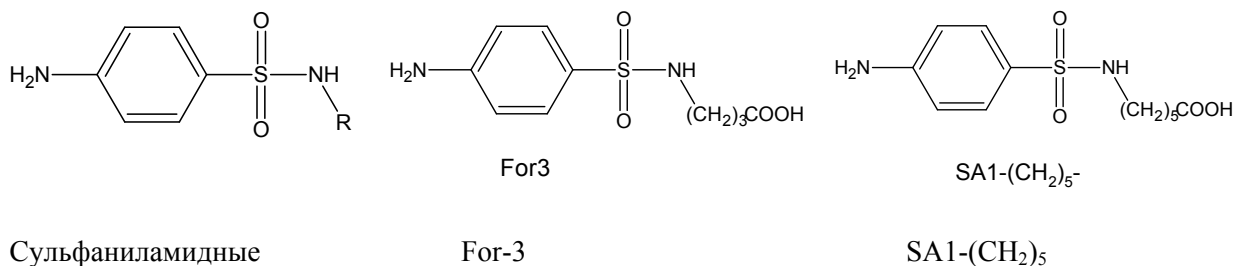
Групп-специфическое определение сульфаниламидных препаратов методом поляризационно-флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА)

Нокель М.А., Нестеренко И.С., Еремин С.А.

*Кафедра химической энзимологии, Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Ленинские горы
тел. (495) 939 41 92, факс (495) 939 27 42, e-mail: nokel@rambler.ru*

Многие препараты группы сульфаниламидов широко используются в ветеринарии для профилактики и лечения бактериальных инфекций, а также являются добавками к животным кормам в качестве генераторов роста. Как следствие, в продуктах питания животного происхождения потенциально могут быть обнаружены остатки этих препаратов в количествах, превышающих уровень безопасный для человека. Поэтому важно контролировать уровень концентраций этих веществ в продуктах питания, оценивать эти величины относительно установленных для них предельно допустимых концентраций (ПДК, 100 нг/мл).

В последнее время возрастающее значение для определения сульфаниламидных препаратов приобретают иммунохимические методы. Среди этих методов следует выделить метод поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА), характеризующийся не только высокой чувствительностью, но и быстротой и простотой проведения анализа. Часто в определяемых образцах содержится не какой-то один препарат группы сульфаниламидов, а сразу несколько близкородственных соединений, с различными радикалами R.



Поэтому целью настоящей работы была разработка групп-специфического метода определения сульфаниламидов методом ПФИА. Для этого были синтезированы сульфамидные соединения, которые содержали карбоксильную группу: нами был проведен синтез и очистка этих соединений, меченных этилендиаминтиокарбомилфлуоресцеином (трейсеров). Антитела к сульфамидным препаратам (SA1-(CH₂)₅) были предоставлены Миланом Франеком, Институт Ветеринарии, Брно, Чехия. Нами были оптимизированы условия ПФИА и построены градуировочные графики для определения сульфамидных препаратов для всех сочетаний из 4-х антител с 2-мя трейсерами. Была разработана методика определения сульфаниламида в воде, а также проверена возможность группового определения нескольких сульфаниламидов. По полученным данным можно сделать вывод о том, что процент перекрёстного реагирования достаточен для группового определения сульфаниламидов.

Разработанная методика ПФИА была использована для определения сульфаниламидов в молоке. Для избавления от матрикс-эффекта молока использовали разведение в 100 раз. Результаты показали, что процент открытия сульфаниламида в молоке достаточно высок и изменяется в пределах от 77 до 105%. С увеличением добавленной концентрации процент открытия несколько возрастает.

Таким образом, в работе были синтезированы трейсеры, оптимизирована методика ПФИА и показана ее применимость для определения сульфамидных препаратов в воде, молоке на уровне ПДК.

Изучение влияния модификации нуклеотида m²G1835 23s рРНК на функционирование рибосомы E. Coli.***Остерман Илья Андреевич, Сергиев Петр Владимирович****Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет Москва, Россия
osterman@yandex.ru*

Основа жизнедеятельности клетки – синтез белков, который осуществляется на рибонуклеопротеидных частицах, называемых рибосомами. Рибосома состоит из двух субчастиц, ее способность диссоциировать на субчастицы играет важную роль в синтезе белка. На процессы ассоциации субчастиц влияют модифицированные нуклеотиды рибосомной РНК, входящей в состав рибосомы. Модификации этих нуклеотидов осуществляются специальными ферментами, и клетка поддерживает целую систему, направленную на внедрение модификаций в рибосомную РНК.

Нашей задачей было изучить роль модификации нуклеотида m²G1835 23s рРНК, метилированного по экзоциклической аминогруппе (N²). Данный нуклеотид находится в небольшом углублении на поверхности большой субчастицы. Не имея прямого контакта с малой субчастицей, m²G1835 находится посередине между межсубъединичными мостиками В2а и В2с, в центре пересечения четырех спиралей 67, 68, 69 и 71. Основываясь на специфическом расположении данного нуклеотида близко к межсубъединичным мостикам, мы сделали предположение о том, что отсутствие метилирования G1835 может повлиять на способность субчастиц к ассоциации.

Были выделены рибосомные субчастицы 50S и 30S из клеток дикого типа E. coli и клеток с делецией гена *ugjO* (кодирующего данную метилтрансферазу). Для этой цели использовали зонально-скоростное ультрацентрифугирование на градиентах сахарозы. Процессы образования комплекса 70S частицы изучали с использованием методов титрационной микрокалориметрии и нефелометрии.

Полученные в ходе нефелометрических экспериментов результаты позволяют с использованием формул, разработанных для описания количественных закономерностей специфических взаимодействий в системах биополимер-лиганд, рассчитать величины для константы равновесия ассоциации субчастиц и величины максимального связывания. Методом титрационной микрокалориметрии были измерены значения энтальпии (ΔH) процесса ассоциации субчастиц. Были получены следующие результаты: отсутствие модификации нуклеотида m²G1835 приводит к снижению величины максимального связывания, снижению устойчивости комплекса 70S рибосомы и снижению выделяемого при ассоциации тепла. Основываясь на этих данных, можно сделать вывод, что данная модификация играет существенную роль при ассоциации субчастиц.

Синтез и изучение свойств липофильных поликатионных агентов трансфекции***Петухов И.А., Маслов М.А., Морозова Н.Г., Серебrenникова Г.А.****Московская государственная академия тонкой химической технологии
им. М.В. Ломоносова, факультет биотехнологии и органического синтеза, Москва,
Россия**e-mail: alex-petuchov@mail.ru*

Актуальной проблемой генной терапии является поиск эффективных и безопасных методов доставки терапевтического гена в адресные клетки. В последние годы повышенный интерес вызывают поликатионные амфифилы, так как введение дополнительных катионных «головок» в молекулу липидного вектора увеличивает несущую способность катионных липосом, что позволяет сократить их рабочую концентрацию. Ранее в нашей лаборатории был осуществлен синтез трансфицирующих систем с несколькими катионными «головками» на основе полиолов различной природы. Среди них стероиды (дезоксихолевая и холевая кислоты), глицерин и глюкоза. При этом формируемый поликатионный домен дискретен и состоит из нескольких изолированных монокатионных фрагментов. В настоящей работе мы использовали альтернативный подход, который базируется на включении в конструируемую молекулу цельного положительно заряженного полифункционального домена, представленного остатком полиамина природного происхождения (спермин). При физиологическом значении рН полиамины становятся поликатионами и выполняют важную роль в функционировании биологических систем. Среди коммерчески доступных препаратов на основе полиаминов известны Липофектамин и Липид 67. Нами получены поликатионные амфифилы на основе холестерина и спермина, отличающиеся размером и способом присоединения спейсеров между полярным и гидрофобным доменами, что влияет на липофильно-гидрофильный баланс молекулы, определяющий агрегационные свойства синтезируемых соединений. Полифункциональность молекулы спермина позволила дополнить структурные ряды амфифилов симметричными представителями, содержащими по два остатка холестерина. Синтез включал три основных этапа: получение избирательно защищенных производных полиамина, получение активных производных холестерина и их конденсация. Для получения избирательно защищенных производных полиамина использовались защитные группы (TFA и Boc), позволяющие проводить региоселективные превращения по различным аминогруппам. Связывание полиаминных компонент с активными производными холестерина (бромиды) осуществляли в условиях реакции Фукаямы, а присоединение по первичным аминогруппам спермина одного или двух остатков холестерина позволили получить симметричные и несимметричные амфифилы. Структура всех соединений была подтверждена данными ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (07-03-00632-а).

Получение и свойства полиэлектролитных микрочастиц, содержащих инсулин и соевый ингибитор протеиназ типа Баумана-Бирк**Печенкин Михаил Александрович***Российский Химико-Технологический Университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия
E-mail: del_monte@mail.ru*

Пероральная доставка инсулина была бы более удобной и более естественной по сравнению с инвазивным способом доставки гормона, требует наиболее простые технологические формы.

Создание лекарственных форм многих биологически активных веществ, таких как ферменты и белки, требует щадящих условий. Получение белок-содержащих микрочастиц методом последовательной адсорбции полиэлектролитов привлекает особое внимание в силу простоты методики и возможности проведения ее в мягких водных условиях [1].

Целью настоящей работы является исследование полиэлектролитных микрочастиц, содержащих инсулин и ингибитор протеиназ, обеспечивающих пролонгированное высвобождение белков и их защиту от протеиназ тонкого кишечника, а также изучение биологического действия микрочастиц *in vivo*.

Для защиты инсулина от деградации протеолитическими ферментами тонкого кишечника – трипсина, α -химотрипсина и эластазы, было предложено одновременное микрокапсулирование гормона с ингибитором протеиназ. В качестве последнего в работе был использован соевый ингибитор типа Баумана-Бирк (ВВІ). Его выбор основывался на способности эффективно ингибировать протеиназы тонкого кишечника.

Методом постадийной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов на микрочастицах комплекса инсулин–полианион были получены инсулин-содержащие микрочастицы с 4 стадиями сорбции полиэлектролитов, содержащие и не содержащие ингибитор.

В качестве полиэлектролитов в работе использовались биосовместимые и биodeградируемые полимеры: декстрансульфат и хитозан, обладающий мукоадгезивными свойствами.

Все полиэлектролитные микрочастицы характеризовались высокой эффективностью включения инсулина и ВВІ. Был изучен состав микрочастиц. Содержание в них инсулина составило более 50%. Средний размер микрочастиц составил 7-8 мкм, воздействием ультразвука их удалось измельчить до размеров 1000 нм и менее. В кислой среде желудка белки из микрочастиц не выделялись. В нейтральной среде тонкого кишечника из микрочастиц высвобождалось 70% белка в течение первого часа. При этом ВВІ и инсулин высвобождались одновременно и в нативном виде.

Была изучена биологическая активность полиэлектролитных микрочастиц с инсулином на здоровых кроликах. Исследовалась гипогликемическая активность инсулина при подкожном введении кроликам в полиэлектролитных микрочастицах, содержащих и не содержащих ВВІ, а также в полиэлектролитных микрочастицах, подвергнутых ультразвуковой обработке. Было показано полное сохранение биологической активности инсулина в процессе получения микрочастиц.

При пероральном введении гипогликемический эффект полиэлектролитных микрочастиц был показан на животных с повышенным (выше 110 мг/дл) исходным содержанием глюкозы.

Литература

1. Балабушевич Н.Г., Ларионова Н.И. Биохимия, 2004, 69, 930-936.

Билюминесцентное определение АТФ: возможности использования ферментов для повышения специфичности определения бактериальных клеток**Плешакова В.А., Легоцкий С.А., Клячко Н.Л.***Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия*

Как известно, билюминесценция – это свойство, которым обладают многие живые организмы, принадлежащие к самым разным систематическим группам, начиная от бактерий, моллюсков и заканчивая позвоночными. Билюминесценция происходит благодаря реакции окисления люциферина кислородом воздуха в присутствии АТФ под действием специфичного фермента – люциферазы. Исследование механизма эффективного превращения энергии биохимической реакции в световую представляет большой научный и практический интерес. Высокая специфичность по отношению к АТФ, прямая пропорциональность между интенсивностью и концентрацией АТФ, высокий квантовый выход позволили создать высокочувствительный и специфичный метод определения АТФ на основе люциферин-люциферазной системы светляков.

Целью данной работы было проверить эффективность высвобождения внутриклеточного АТФ при лизисе клеточной стенки бактерий с помощью ферментов по сравнению с коммерческим препаратом BRA (Bacterial Cell Releasing Agent), высвобождающим внутриклеточный АТФ полностью. Ферменты бактериофагов способны катализировать лизис клеточной стенки соответствующих бактериальных клеток. Интерес к этим ферментам обусловлен перспективностью их применения как в терапии бактериальных инфекций, так и в анализе соответствующих патогенов. Исследование проводилось по отношению к клеткам *Esheria coli*, *Salmonella enteritidis* и *Micrococcus luteus*. Для разрушения бактериальных клеток использовали фермент эндолизин бактериофага SPZ 7.

На первом этапе работы получали зависимость билюминесцентного сигнала от концентрации АТФ. Для этого эксперимента растворы АТФ готовились методом последовательных разведений. Далее строили калибровочные зависимости билюминесцентного сигнала от концентрации клеток *Esheria coli*, *Salmonella enteritidis* и *Micrococcus luteus*. Для построения этих зависимостей готовили серию суспензий клеток с оптической плотностью равной единице при длине волны 600 нм. На примере клеток *Salmonella enteritidis* проверяли эффективность использования эндолизина в качестве экстрагента АТФ. Показано, что количество определяемого АТФ зависит от концентрации фермента (и/или времени инкубирования клеток в присутствии фермента). Повышая концентрацию фермента, можно было определить предельное ее значение, при котором высвобождение АТФ происходило полностью, а его количество равнялось тому, которое можно получить под действием коммерческого препарата BRA.

В ходе работы были получены калибровочные зависимости билюминесцентного сигнала от концентрации клеток и от концентрации АТФ, а также построены зависимости концентрации АТФ от концентрации клеток. Было выяснено, что применение эндолизина в качестве экстрагента АТФ позволяет селективно определить концентрацию тех клеток, по отношению к которым эндолизин проявляет специфичность.

Выделение катеписин-L-подобной пищеварительной цистеиновой протеиназы из личинок *Tenebrio molitor***Поплетаева С. Б.**

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Химический факультет, Москва, Россия
E-mail: unavil@yandex.ru

Цистеиновые протеиназы семейства папаина — широко распространенные в природе ферменты, наиболее изученным и характерным представителем которых является растительный фермент папаин. У млекопитающих к этому семейству относятся лизосомальные цистеиновые катеписины В, Н, К, L и др. Кроме того, известно, что цистеиновые катеписины участвуют в ряде патологических процессов, таких как рост и распространение опухолей, развитие панкреатита, артрита, остеопороза и ряда других заболеваний. У некоторых групп насекомых цистеиновые катеписин-подобные протеиназы являются пищеварительными ферментами. В отличие от сериновых, цистеиновые пищеварительные протеиназы насекомых изучены слабо. В связи с этим большой интерес представляет сравнение свойств пищеварительных цистеиновых протеиназ насекомых и лизосомальных катеписинов млекопитающих.

Целью нашей работы являлась отработка метода выделения катеписин-L-подобной пищеварительной протеиназы из личинок насекомого-вредителя запасов *Tenebrio molitor*, главной пищеварительной протеиназы этого насекомого.

Для выделения цистеиновой протеиназы *T. molitor* использовали синтезированный в нашей лаборатории хромогенный субстрат Glp-Phe-Ala-pNA. Нами показана его селективность для цистеиновых протеиназ (папаин, фицин, бромелаин) в сравнении с сериновыми протеиназами (субтилизин, химотрипсин, трипсин). Это позволило использовать его при очистке цистеиновой протеиназы *T. molitor* от химотрипсино- и трипсиноподобных пищеварительных протеиназ, также содержащихся в кишечнике личинок. Цистеиновую протеиназу выделяли из экстракта передней части средней кишки личинок *T. molitor*.

Предложенная схема выделения включает три стадии очистки: гель-хроматографию на сефадексе G-150, анионообменную хроматографию на MonoQ и аффинную хроматографию на фенилсефарозе в режиме FPLC. Две последних стадии проводились в присутствии 1мМ HgCl₂ для предотвращения автолиза протеиназы. Были подобраны условия концентрирования препарата, позволяющие уменьшить потери его активности. Также были подобраны условия, которые позволяют получить достаточно чистый препарат уже на второй стадии. Степень очистки, определенная по удельной активности, составляет 8.8 раз на второй стадии и 33.0 раз на третьей, по сравнению с исходным экстрактом из кишечника личинок.

Получение наночастиц препарата туберкулостатического действия

Попов Дмитрий Витальевич¹

*Бурятский государственный университет, химический факультет, Улан-Удэ, Россия
E-mail: staply@gmail.com*

Работа посвящена созданию наносомальной формы лекарственного препарата туберкулостатического действия на основе 4-тиоуреидоиминометилпиридиний перхлората, обладающего высокой биодоступностью, активностью и пониженными токсическими эффектами за счет получения наночастиц препарата, стабилизируемых в матрице β -циклодекстрина.

Циклодекстрин и его производные способны к формированию соединений включения со многими молекулами, координируя их (целиком, или частично) во внутреннюю пустоту.

Наночастицы, образованные с β -циклодекстрином - устойчивые системы, подходящие для обеспечения целевой доставки препаратов к пораженным клеткам, усиления их эффективности, а также всасывания плохо растворимых лекарств.

Из ряда методик по приготовлению наночастиц препарата перспективным оказалось совместное истирание в условиях различной влажности. Определение размеров наночастиц осуществляется с помощью атомно-силовой микроскопии, определение скорости высвобождения препарата – с помощью УФ спектрометрии.

¹ Автор выражает признательность д.х.н. Раднаевой Л.Д. за научное руководство и помощь в подготовке тезисов.

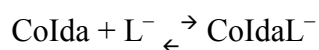
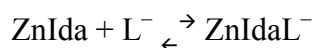
**Смешаннолигандное комплексообразование кобальта(II) и цинка(II) с анионами
иминодиуксусной кислоты и бета-лактамных антибиотиков**

Потифорова Светлана Валерьевна

Тверской государственный университет, Тверь, Россия

E-mail: v260766@mail.ru

Известно, что катионы Zn^{2+} и Co^{2+} обладают хорошими комплексообразующими свойствами и высокой биологической активностью. В живых организмах они существуют в виде устойчивых комплексных соединений (витаминов, ферментов, белков). Ранее было показано, что анионы некоторых бета-лактамных антибиотиков, содержащих аминогруппу, способны выступать в роли лигандов и образовывать с $Zn(II)$ и $Co(II)$ устойчивые комплексы. В данной работе проведено исследование комплексообразования в системах $Zn(II)-Ida-L$ и $Co(II)-Ida-L$, где L – анион антибиотика: ампициллина (Amp^-), амоксициллина (Axn^-) или цефалексина (Cpx^-). Анион иминодиуксусной кислоты (Ida^{2-}) использован как модельный биолиганд. Комплексообразование изучали рН-метрическим методом, титруя щелочью растворы, содержащие эквимольные количества $Zn(NO_3)_2$ (либо $Co(NO_3)_2$), H_2Ida и HL (0.0027 моль/л) на фоне 0.1 моль/л KNO_3 при 20 °С. Полученные рН-метрические кривые анализировали с помощью специализированной программы расчета химических равновесий New DALSFЕК (КСМ Soft, 2000, <http://sinisha.chat.ru>). Найдены значения: $lg\beta(ZnIdaAmp) = 8.63 \pm 0.09$, $lg\beta(ZnIdaAxn) = 8.23 \pm 0.07$, $lg\beta(ZnIdaCpx) = 8.04 \pm 0.08$, $lg\beta(CoIdaAmp) = 9.24 \pm 0.05$, $lg\beta(CoIdaAxn) = 8.53 \pm 0.08$, $lg\beta(CoIdaCpx) = 8.15 \pm 0.08$. Построены диаграммы распределения равновесных концентраций различных форм $Zn(II)$ и $Co(II)$ в исследованных системах. Во всех случаях смешаннолигандные комплексы $MIdaL^-$ образуются в слабощелочной среде и находятся в равновесии с комплексами $MIda$, а концентрация ML^+ исчезающе мала. Таким образом, смешаннолигандные комплексы образуются по механизму присоединения L^- к комплексам $MIda$:



Это позволяет предполагать возможность взаимодействия в живых организмах анионов ампициллина, амоксициллина и цефалексина и других, аналогичных по структуре, антибиотиков с биологически активными металлокомплексами $Zn(II)$ и $Co(II)$ с образованием смешаннолигандных координационных соединений.

Очистка зеатин-связывающих белков и идентификация их генов.

Прокопцева Ольга Сергеевна, Епинетов Михаил Александрович, Кондаков Сергей
Эмильевич

ООО «Иммуновет»,

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Химический
факультет, Москва, Россия

Астраханский государственный университет, г. Астрахань, Российская Федерация
whiteo@mail.ru

Для поиска белков, участвующих в метаболизме гормонов растений и передачи их сигнала была получена фракция цитозольных белков растений, связывающих активную форму гормона цитокинина — *транс*-зеатин, из 3-недельных розеток листьев *Arabidopsis th.* и 4-недельных листьев риса (*Oryza sativa*). Схема очистки включала в себя хроматографию с помощью G-50, фенил-сефарозы и зеатинрибозид-сефарозы. Зеатин-связывающие белки снимались с зеатинрибозид-сефарозы раствором, содержащим 1 мМ *транс*-зеатина, т.е. полученная фракция белков специфически связывает данный гормон *in vitro*.

В результате проведения одномерного денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле зеатин-связывающей фракции белков, были выявлены полосы с молекулярными массами около 150, 80, 45, 42, 32, 28 кДа для *Arabidopsis th.* (рис.1); и с молекулярной массой около 42 кДа для риса (данные не представлены). После проведения трипсинолиза и MALDI масс-спектрометрического анализа белков этих полос, с помощью поисковой системы Mascot, для *Arabidopsis th.* были идентифицированы следующие белки: 1) белки полос 150, 45, 42 кДа были определены как смеси изоформ аденозин-киназ АДК1 (ген At3g09820) и АДК2 (ген At5g03300); 2) белок 28 кДа определен как тиаминидаза (ген At3g16990, *tenA*); белок 32 кДа предположительно определен как серин-треониновая протеин-киназа (ген At1g62400). Белок полос 80 кДа не был идентифицирован. Для риса был определен белок полосы 42 кДа, как аденозин-киназа (ген Os02g0625500).

Для аденозин-киназ ранее было показано, что они связывают цитокинины и фосфорилируют рибозиды цитокининов *in vitro*. Нами показано, что *транс*-зеатин связывают обе изоформы аденозин-киназ *Arabidopsis th.* (АДК1 и АДК2), однако для риса было показано связывание с зеатинрибозид-сефарозой только одной изоформы из двух (ген Os02g0625500). Впервые показано связывание *транс*-зеатина тиаминидазой *in vitro*. Функцией тиаминидазы считается фосфорилирование тиамина, также есть данные о том, что тиаминидаза (*tenA*), стимулирует продукцию экстрацеллюлярных ферментов у *Bacillus subtilis* на транскрипционном уровне. Можно предположить участие тиаминидазы *Arabidopsis th.* в передаче гормонального сигнала. Так же вероятно участие в передаче цитокининового сигнала серин-треониновой протеин-киназы.

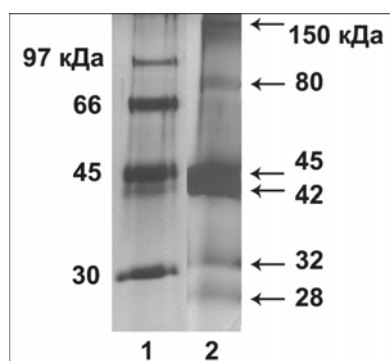


Рисунок 1. Выделение зеатин-связывающих белков из 3-недельных розеток листьев *Arabidopsis th.*, окраска геля серебром: 1 – маркеры; 2 – фракция белков, элюированная с зеатинрибозид-сефарозы 1 мМ *транс*-зеатина.

Изучение функциональной роли метилирования нуклеотидов m²G966 и m⁵C967 в составе 16S рРНК**Прохорова И.В., Сергеев П.В.***МГУ им. М.В.Ломоносова, химический факультет, г.Москва, Россия
Irinka_yra@mail.ru*

Один из важнейших процессов, осуществляемый клеткой, – синтез белков, который производится при связывании с рибосомой матричной РНК и транспортных РНК. Особую роль при этом играют модифицированные нуклеотиды рибосомной РНК, расположенные в наиболее важных функциональных центрах рибосомы. Среди них встречаются изомер уридина – псевдоуридин и многочисленная группа метилированных нуклеотидов. Так модифицированные нуклеотиды N-2-метилгуанин m²G966 и 5-метилцитозин m⁵C967 находятся в петле 31 16S РНК на участке, связывающем антикодон тРНК в Р-сайте. Их влияние на взаимодействие рибосомы с тРНК можно оценить с помощью измерения термодинамических параметров с применением методов изотопного анализа.

Для этого были выделены рибосомы из клеток с делециями генов соответствующих метилтрансфераз: RsmD (yhhF) (отсутствие модификации G966), RsmB (отсутствие модификации C967), и с делецией обеих RsmB, RsmD (3Y) (отсутствие обеих модификаций) и дикого типа *E.coli*. Матричную РНК получали с помощью *in vitro* транскрипции с ПЦР-продукта, амплифицированного с плазмиды pMFKY. Меченую изотопом [³²P] tRNA_f^{Met} получали дефосфорилированием tRNA_f^{Met} с последующим кинированием образца.

В результате проделанного эксперимента были получены зависимости связывания меченой [³²P] tRNA_f^{Met} с 30S субъединицами рибосом и мРНК от количества [³²P] tRNA_f^{Met} и вычислены значения констант диссоциации комплексов «рибосома-тРНК-мРНК».

Полученные значения позволяют сделать вывод, что отсутствие модификаций приводит к незначительному изменению связывания тРНК с Р-участком рибосомы.

Был проведен ряд *in vivo* тестов для выявления роли метилирования m²G966 и m⁵C967 в жизни клетки. Были измерены скорость роста, скорость вытеснения для штаммов дикого и мутантных типов, а также удержание пептидил-тРНК в Р-участке с использованием штаммов с термочувствительной пептидил-тРНК-гидролазой. Во всех случаях наблюдалось незначительное изменение измеряемых параметров.

Эфирные масла растений рода *Thymus* флоры Бурятии и Монголии

Рабжаева Арюна Николаевна¹, Раднаева Лариса Доржиевна^{1,2}, Жигжитжапова Светлана Васильевна²

¹Байкальский институт природопользования СО РАН, Улан-Удэ, Россия

²Бурятский государственный университет, Улан-Удэ, Россия

E-mail: aryuina_ln@mail.ru

Род тимьян (*Thymus* L.) – один из крупных родов семейства Lamiaceae Lindl. Представители рода – низкорослые ароматические кустарнички и полукустарнички используются в медицине как дезинфицирующее, обезболивающее и антисептическое средство, а также как пряные и эфирномасличные растения в парфюмерной и пищевой промышленности. Терапевтическая активность препаратов тимьяна связана с присутствием в них различных классов биологически активных веществ, в частности эфирных масел. Тимол и карвакрол, основные компоненты эфирного масла травы тимьяна, обладают антисептическими и фунгицидными свойствами [1]. В настоящем исследовании приведена сравнительная оценка количественного и качественного состава эфирных масел надземных частей *Thymus baicalensis* Serg. (тимьяна байкальского), произрастающего в Бурятии и Монголии. В Бурятии тимьян байкальский растет по каменистым склонам, на скалах, на степных лугах, по окромкам сухих сосновых боров, на открытых песчаных местах по всей степной и лесостепной части [2,3].

Подготовка сырья (высушивание до воздушно-сухого состояния), отбор проб и получение эфирного масла производили с использованием общепринятых приемов [4]. Эфирное масло исследовали методом хромато-масс-спектрометрии на газовом хроматографе Agilent Packard HP 6890 N с квадрупольным масс-спектрометром (HP MSD 5973) в качестве детектора. Качественный анализ основан на сравнении времен удерживания, полных масс-спектров, библиотеки хромато-масс-спектрометрических данных летучих веществ растительного происхождения [5]. Эфирное масло *Thymus baicalensis* Serg., выделенное из растений, произрастающих в Бурятии, представляет легкоподвижную жидкость желтого цвета с приятным специфическим запахом. Выход масла составил 3,1%. В эфирном масле идентифицировано 36 компонентов. Основная часть исследованного нами эфирного масла тимьяна байкальского представлена терпеноидами. Исследованные нами образцы эфирного масла отличается высокое содержание карвакрола, *n*-цимола, γ -терпинена, борнеола. Для эфирного масла данного вида, произрастающего на территории Монголии, характерно высокое содержание тимола, *n*-цимола, при присутствии карвакрола в небольших количествах [6].

Различия в количественном и качественном составе эфирного масла, вероятно, связаны с влиянием на его состав различных факторов (географическое положение, климат).

Литература

1. Гогина Е.Е. Изменчивость и формообразование в роде Тимьян. М., 1990. 207 с.
2. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР. М., 1983. С. 312.
3. Мункуева М.С. Род *Thymus* L.-Тимьян // Определитель растений Бурятии – Улан-Удэ, 2001.С. 483-485.
4. Государственная Фармакопея СССР. Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье МЗ СССР. 11-е изд. М., 1990. 400 с.
5. Ткачѳв А.В. "Библиотека хромато-масс-спектрометрических данных летучих веществ растительного происхождения". Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН. 2006.
6. Shatar S. Chemical investigation of essential oil from Mongolian flora. Ulaan-baatar, 1998. 166 p.

Взаимодействие ДНК метилтрансферазы Dnmt3a мыши с 2-аминопурин-содержащей ДНК: удаление 6-оксогруппы гуанина не влияет на связывание ДНК-субстрата

Рахимова Алина Рифатовна, Черепанова Наталья Александровна

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: alinarar@mail.ru

Метилирование ДНК, которое осуществляется ДНК-метилтрансферазами (МТазы), является эпигенетической модификацией генома и играет важную роль в регуляции многих клеточных процессов. В эукариотах метилирование происходит по атому углерода С5 остатков цитозина преимущественно в CpG-последовательностях. Метилированные CpG-участки расположены в ДНК определенным образом, формируя профиль (рисунок) метилирования. Установление нового профиля метилирования (метилирование *de novo*) ДНК в эукариотах происходит на стадии раннего эмбриогенеза. Одной из МТаз млекопитающих, осуществляющих метилирование *de novo*, является МТазы Dnmt3a. Эукариотические МТазы являются малоизученными ферментами. Практически ничего не известно о том, как происходит узнавание такой короткой CpG-последовательности этими ферментами.

Целью данной работы явилось изучение роли 6-оксогруппы остатка гуанина на стадии связывания ДНК каталитическим доменом МТазы Dnmt3a мыши (Dnmt3a-CD) с помощью 2-аминопурин-содержащей ДНК.

2-аминопурин (AP) является аналогом гуанина, в котором отсутствует 6-оксогруппа. Были сконструированы флуоресцентно меченные полуметилированные 30-звенные ДНК-дуплексы содержащие AP (AP-ДНК). AP вводили в CpG-участок (в позицию С или G), а также рядом с ним (в позицию с 5'-стороны в метилированную либо неметилированную цепь). Методом поляризации флуоресценции были получены изотермы связывания Dnmt3a-CD с немодифицированной ДНК и AP-ДНК в присутствии аналога кофактора S-аденозил-L-гомоцистеина. Они имели кооперативный характер. Кривые были описаны уравнением Хилла, учитывающим кооперативность связывания. Коэффициент кооперативности для немодифицированного субстрата составил 1.9, а для AP-ДНК изменялся от 1.6 до 2.8. Были определены константы диссоциации (K_d) ДНК-белковых комплексов: в случае немодифицированной ДНК K_d составила 9 нМ, а в случае AP-ДНК получены K_d 11-18 нМ. Следовательно, удаление 6-оксогруппы остатков гуанина в участке узнавания или рядом с ним практически не влияет на эффективность связывания Dnmt3a-CD с ДНК.

Таким образом, взаимодействие Dnmt3a-CD с ДНК является кооперативным процессом, в ходе которого с ДНК связываются 2-3 молекулы фермента. По-видимому, контакты Dnmt3a-CD с Об-атомами остатка гуанина в большой бороздке ДНК не важны на стадии связывания субстрата ферментом, но нельзя исключить участие этих контактов в процессе катализа.

Поддержано грантами РФФИ № 07-04-00583-а и 08-04-01096-а

Разработка метода вычленения вкладов трех эстераз на основе двухэлектродного биосенсора с помощью методов формальной кинетики***Решетняк Антон Сергеевич, Дубачева Галина Витальевна****Кафедра Химической Энзимологии, Химический факультет,
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия*

Эстеразы являются одними из ключевых ферментов крови человека, уровень их активности является исключительно важным показателем в токсикологии, фармакологии и нейробиологии. Изменение активности этих ферментов в крови приводит к развитию целого ряда функциональных нарушений организма. Например, низкий уровень активности ацетилхолинэстеразы может свидетельствовать о дисфункции печени, отравлении пестицидами, нарушении деятельности ЦНС, а ингибирование нейротоксичной эстеразы ксенобиотиками приводит к возникновению отставленной нейротоксичности. Для клинических исследований и ранней диагностики таких нарушений необходимо знать соотношение уровней активности этих ферментов в крови. Таким образом, актуальной задачей на сегодняшний день является создание высокочувствительных и стабильных биосенсоров, позволяющих определять активности этих ферментов в смеси.

Так как каждая из эстераз локализована преимущественно в одном компоненте крови, то обычно при проведении анализа исходный препарат цельной крови подвергают фракционированию, что делает общую схему анализа довольно сложной и требует значительного времени. При этом анализ большого количества образцов представляет собой длительную и трудоемкую процедуру. Создание сенсорных матриц позволяет упростить схему определения эстеразных активностей, а также существенно увеличить скорость проведения анализа за счет одновременного определения уровней активности этих ферментов в образце. Определяя коэффициенты чувствительности эстераз к различным субстратам, и измеряя скорость гидролиза субстратов в присутствии ферментов можно вычислить содержание каждой эстеразы в пробе.

Данный подход был реализован в работе [1] для двухферментной системы на основе двухэлектродного биосенсора. В настоящей работе разработана методика одновременного определения активностей 3 эстераз в смеси, основанного на использовании электрохимического двухэлектродного биосенсора. Для этого были исследованы полные кинетические кривые ферментативных процессов, происходящих в электрохимической ячейке. Из полных кинетических кривых были получены зависимости развития отклика на протекание ферментативных реакций, также были выведены уравнения, описывающие полученные зависимости. С помощью методов формальной кинетики составлен алгоритм вычленения активностей эстераз в смеси.

Литература

1. Порус М.В., Дубачева Г.В. Определение активностей холинэстераз с использованием двухэлектродной сенсорной системы, *Сенсорные системы*, V 22(1), p 88-95, 2008

Синтез бесфосфорных алкильных глицеролипидов с катионными головками гетероциклического ряда¹**Романова Светлана Геннадьевна, Серебренникова Галина Андреевна***Московская государственная академия тонкой химической технологии**им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия**E-mail: romfill@mail.ru*

В последние годы резко возрос интерес к новому типу модифицированных катионных глицеролипидов алкильного типа. Повышенное внимание к этим соединениям обусловлено их высокой биологической активностью и возможностью использования катионных липидов в генной терапии. К тому же, среди этих соединений были обнаружены эффективные антагонисты сильнодействующего липидного биорегулятора – фактора активации тромбоцитов, а также, соединения, обладающие противоопухолевой, антивирусной (ВИЧ-1) и антибактериальной активностью.

Синтез и последующий биологический скрининг различных соединений позволил проследить некоторые закономерности влияния строения вещества на проявляемые ими свойства. Так, например, соединения, содержащие гетероциклические структуры оказались сильными цитотоксическими агентами по отношению к ряду опухолевых линий.

Нами был разработан синтез бесфосфорных глицеролипидов алкильного типа (аналогов Эдельфозина), содержащих при фиксированной длине спейсера различные гетероциклические основания в качестве полярной головки.

Исходным соединением для проведения синтеза служил *rac*-1-*O*-октадецил-2-*O*-метилглицерин. При помощи реакции ацилирования хлорангидридом 5-бромвалериановой кислоты в молекулу липида был введен фиксированный спейсерный участок, содержащий четыре метиленовых звена. Введение в молекулу липида катионной «головки» проводили путём кватернизации метилимидазола, метилморфолина и метилпиперидина полученным бромсодержащим триглицеридом. Реакции проводились в среде метилэтилкетона. Ключевые соединения были получены с выходом порядка 75%, в количествах, достаточных для проведения биологических испытаний. Структура синтезированных соединений подтверждена данными ¹H-ЯМР-спектроскопии и данными элементного анализа.

Далее планируется расширить модификационный ряд соединений, содержащих гетероциклические основания и провести биологические испытания на выявление цитотоксической активности по отношению к опухолевым клеткам человека.

¹ Тезисы доклады основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 07-03-00632-а).

Изучение влияния комплексов метилтрансфераз с рибосомной рНК на структуру рибосом***Сергеева О. В., Сергиев П. В.****МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет, г.Москва, Россия
olga.sergeeva.v@gmail.com*

Основной функцией рибосомы является перевод информации, закодированной в матричной РНК, в самостоятельную единицу метаболизма – белок. Функциональную и структурную основу рибосомы составляют молекулы РНК. Особенностью этой РНК является наличие модификаций, в основном метилирования и псевдоуридинилирования, реакции образования которых происходят на ранних этапах сборки рибосомы. Наибольший интерес представляют модификации, находящиеся в функционально-важных областях: каталитических центрах, лиганд-связывающих областях, поверхности контакта двух субъединиц. Так, например, метилтрансфераза RsmD метилирует G966, расположенный в 31 спирали 16S рРНК, там он образует часть полости, в которой происходит связывание тРНК в Р-сайте. А метилтрансфераза RlmF метилирует A1618, который участвует в образовании пептидного канала.

Целью данной работы является изучение влияния комплексов метилтрансфераз RsmD и RlmF с рРНК на структуру рибосом.

Для этого были выделены метилтрансферазы и рибосомы из клеток *E. Coli*, содержащих делеции генов соответствующих метилтрансфераз: RsmD и RlmF. Существование комплексов было доказано методом гель-фильтрации. Для изучения влияния комплексов на структуру рибосомы использовался метод химической модификации с дальнейшим анализом с помощью реакции с обратной транскриптазой и ПААГ.

В результате данной работы было доказано существование комплексов метилтрансфераз RsmD и RlmF с соответствующими рРНК. А также обнаружены некоторые основания, защищенные комплексами от модификации химическими реагентами, то есть изучено влияние комплексов на структуру рибосомы.

[1] D. Moazed, S. Stern and H.F. Noller. Rapid chemical probing of conformation in 16 S ribosomal RNA and 30 S ribosomal subunits using primer extension. *J Mol Biol*, 1986, V. 187, N. 3, p. 99-416.

[2] C. Weitzmann, S. J.Tumminia, M. Boublik and J Ofengand. A paradigm for local conformational control of function in the ribosome: binding of ribosomal protein S19 to *Escherichia coli* 16S rRNA in the presence of 57 is required for methylation of m²G966 and blocks methylation of m⁵C967 by their respective methyltransferases. *Nucleic Acids Research*, 1991, Vol. 19, N. 25, p. 7089- 7095.

Теломераза как потенциальный маркер для ранней диагностики рака шейки матки.

Скворцов Дмитрий Александрович, Рубцова Мария Петровна, Зверева Мария Эмильевна, Киселев Федор Львович

ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва, Россия

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: skvorratd@mail.ru

Опухолевая клетка отличается от нормальной как генетическими, так и эпигенетическими изменениями. Среди последних особая роль принадлежит процессам метилирования ДНК и активации теломеразы.

Теломераза это рибонуклеопротеин, который удлиняет концы хромосом, укорачивающиеся при репликации ДНК - теломеры. Основными компонентами теломеразы являются обратная транскриптаза и матричная РНК. Теломераза активна в большинстве раков (80-90%). Активация теломеразы это потенциальный маркер для ранней диагностики рака. Некоторые раки используют альтернативные механизмы поддержания длины теломер, основанные на рекомбинации. Для разрешения вопроса об использовании теломеразы в качестве диагностического маркера, активация теломеразы должна быть предварительно изучена в опухолях на разных стадиях развития.

В данной работе для определения теломеразной активности был использован так называемый TRAP-тест [1], основанный на наращивании олигонуклеотида - субстрата теломеразы теломерными повторами с последующей амплификацией продуктов реакции методом ПЦР с помощью специфических праймеров и dNTP, содержащих радиоактивную метку.

Было протестировано 28 образцов рака шейки матки на различных стадиях, определенных в соответствии с международной классификацией. 25 образцов принадлежало к ранним T1 и T2 стадиям. Теломеразная активность была обнаружена во всех протестированных образцах. Эти данные коррелируют с присутствием во всех этих раках вируса папилломы человека 16 типа. Различий между метастазирующими и неметастазирующими опухолями выявлено не было.

Также было протестировано 28 образцов предраковых поражений шейки матки - цервикальных интраэпителиальных неоплазий (ЦИН) различных стадий, определенных в соответствии с международной классификацией. Активность теломеразы детектировалась в 64% образцов ЦИН. В большинстве случаев активность теломеразы слабее чем в раковых образцах.

Теломераза может активироваться еще на стадии предракового заболевания и ее активность может служить маркером отрицательного прогноза.

Литература

1. Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich SL, Shay J.W., Science, 1994. V. 266. № 5193. P. 2011–2015.

Изучение протеолиза гемагглютининавируса гриппа штамма A/Puerto Rico/8/34**Смирнова Ю. А.¹, Кордюкова Л.В.², Серебрякова М.В.³, Баратова Л.А.², Филиппова И.Ю.⁴, Лысозгорская Е.Н.⁴**¹ *Факультет Биоинженерии и Биоинформатики, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия**E-mail: yulya_82@list.ru*² *НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова; Москва, Россия;**E-mail: kord@belozersky.msu.ru*³ *Институт Физико-Химической Медицины, ул. Малая Пироговская, 1а, Москва, Россия;**E-mail: mserebr@mail.ru*⁴ *Химический факультет, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова; Москва, Россия*

Изучен протеолиз вирионов вируса гриппа штамма A/Puerto Rico/8/34 (подтип H1N1) ферментами различных классов с целью разработки подхода для изучения структурной организации и взаимодействия основных белковых компонентов оболочки вириона: трансмембранного гомотримерного гликопротеина гемагглютинина (HA) и матричного белка M1, образующего слой под липидной мембраной. Среди тестированных протеолитических ферментов и ферментных препаратов (термолизин, трипсин, химо tripsин, субтилизин Карлсберг, проназа, папаин, бромелаин) цистеиновые протеиназы бромелаин и папаин, а также ферментный препарат проназа эффективно удаляли эктодомены HA, в то время как химо tripsин, трипсин и субтилизин Карлсберг – лишь частично. Методом MALDI-TOF-МС-анализа были локализованы сайты гидролиза HA различными ферментными препаратами. Бромелаин, папаин, трипсин и проназа расщепляли полипептидную цепь после остатка K177, расположенного перед трансмембранным доменом (HA₂ 185–211). Субтилизин Карлсберг гидролизировал пептидную связь в других соседних точках – после L178 (основной сайт), либо V176. Гидролитическая активность бромелаина, измеренная по высокоспецифичному хромогенному субстрату цистеиновых протеиназ Gfp-Phe-Ala-rNA, в присутствии 5 мМ β-меркаптоэтанола была почти в три раза выше, чем в присутствии 50 мМ. Однако для полного удаления эктодоменов HA высоко- и низкоактивным ферментом требовались одинаковые промежутки времени. В отсутствие восстанавливающего реагента удаление HA бромелаином происходило несколько медленнее и сопровождалось значительной фрагментацией белка M1. Изучен характер ингибирующего воздействия специфического ингибитора цистеиновых протеиназ E-64 и HgCl₂ на гидролиз бромелаином белков HA и M1.

Полученные субвирусные частицы могут быть использованы для выделения С-концевого сегмента HA2-цепи, включающего трансмембранный домен (TMD) и цитоплазматический «хвост», а также для изучения роли и характера взаимодействия цитоплазматического участка гемагглютинина с белком M1 в составе вирионов.

Работа поддержана грантами РФФИ №06-04-48728 и №06-03-33056.

Включение дельта-сон индуцирующего пептида в состав полимерных матриц и наноэмульсий для увеличения времени его действия в организме

Суханова Т.В., Филатова Л.Ю., Ефремов Е.С., Прудченко И.А., Марквичева Е.А., Клячко Н.Л.*

Институт биоорганической химии РАН, Москва

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

E-mail: suhanovatv@rambler.ru

Дельта-сон индуцирующий пептид (ДСИП), основной компонент перспективного отечественного препарата «Дельтаран», обладает выраженной стресс-протективной и адаптогенной активностью. Синтезированные аналоги ДСИП проявляют также значительные противоопухолевое и антиметастатическое действия [1].

Однако ДСИП, являясь водорастворимым пептидом и подвергаясь действию ферментативных систем, требует частого введения в организм, в данном случае интраназально. Для увеличения времени действия единожды введенного в организм пептида можно использовать различные приемы защиты, как, например, включение в состав обратной наноэмульсии (липид – вода – масло) или полимерного носителя (мультислойной полиэлектролитной микрокапсулы), сформированного на сферической CaCO_3 -частице. Известно, что ферменты, включенные в обращенные мицеллы ПАВ и липидов, проявляют новые свойства, такие как суперактивность, повышенная стабильность, способность к регуляции олигомерного состава [2].

Целью данной работы было подобрать систему, которая позволила бы продлить время нахождения пептида в организме.

Пептид был синтезирован твердофазным методом пептидного синтеза [1]. В данной работе использовались коллоидные системы и мультислойные микрокапсулы.

Для исследования кинетики выхода пептида из коллоидных агрегатов проводили диализ полученных образцов пептида против фосфатно-солевого раствора. Полученные микрокапсулы также помещали в фосфатно-солевой раствор и отслеживали скорость выхода пептида. Количество высвобождаемого пептида определяли методом обращено-фазовой хроматографии (ВЭЖХ) в градиенте ацетонитрила. Известно, что введение альбумина в наноконтейнеры обратной эмульсии позволяет пролонгировать выход пептида за счет неспецифического связывания.

Было показано, что биокапсулированные в коллоидные наноагрегаты пептиды приобретают способность к пролонгированному высвобождению в модели *in vitro*. Однако введение пептида в состав полимерной микрокапсулы затрудняется его низким молекулярным весом (пептид в значительной степени вымывается при нанесении 1-го слоя полиэлектролита), что требует поиска подходов для обратимого увеличения молекулярного веса пептида без применения вредных для организма веществ.

Разработанный подход введения ДСИП в состав обратной наноэмульсии может быть использован для создания новых эффективных систем доставки лекарств длительного действия.

Литература

1. Прудченко И.А., Сташевская Л.В., Михалева И.И., Иванов В.Т., Шандра А.А., Годлевский Л.С., Мазарати А.М. (1993) Биоорг. химия, 1. 19, с. 43 – 45.
2. N.L. Klachko, V.A. Shchedrina, A.V. Efimov, S.V. Kazakov, I.G. Gazaryan, B.S. Kristal, A.M. Brown (2005) pH-Dependent substrate preference of pig heart lipoamide dehydrogenase varies with oligomeric state: response to mitochondrial matrix acidification. J. Biol. Chem., v.280, p. 16106 – 16114.

Выделение белков семейства Dnmt3 мыши и изучение их свойств¹

Тамьяр Е.Л., Курсанова О.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Важной формой эпигенетической информации в клетках млекопитающих является метилирование остатков цитозина в CpG-участках. Метилированные CpG-участки расположены в ДНК определенным образом, формируя профиль метилирования. Этот профиль создается *de novo* в процессе эмбриогенеза и передается при репликации в соматических клетках. Изменения профиля метилирования приводят к нарушениям в развитии эмбриона, возникновению и развитию некоторых заболеваний, в том числе к канцерогенезу. Метилирование ДНК осуществляется ДНК-метилтрансферазами (МТазы). Белки семейства Dnmt3 мыши: МТазы Dnmt3a и регуляторный фактор Dnmt3L участвуют в метилировании ДНК *de novo*. Это очень медленный процесс (100-150 метилированных остатков цитозина в день). Dnmt3L стимулирует активность Dnmt3a.

Широко распространенные канцерогены - полициклические ароматические углеводороды, такие как бензо[а]пирен (B[a]P), в процессе метаболизма в живых клетках превращаются в реакционноспособные производные - B[a]P-диолэпоксиды (БПДЭ). БПДЭ могут ковалентно присоединяться к ДНК, в первую очередь к экзоциклическим аминогруппам остатков гуанина, образуя ряд стереоизомерных аддуктов с ДНК, главным образом, (+)-транс-анти-B[a]P-N2-dG (B^{tt}), и, в меньшей степени, (+)-цис-анти-B[a]P-N2-dG (B^{tc}). БПДЭ-поврежденная ДНК может влиять на функционирование ферментов клеточного аппарата, в том числе на МТазы, изменяя профиль метилирования.

Целью настоящей работы явилась экспрессия белков семейства Dnmt3 мыши в клетках *E.coli* и их выделение, изучение ферментативных свойств каталитического домена Dnmt3a (Dnmt3a-CD), а также исследование изменений флуоресцентных свойств пиренильных остатков B^{tt} и B^{tc} аддуктов в CpG-участке или за его пределами при образовании комплексов Dnmt3a-CD с БПДЭ-ДНК.

С помощью металлоаффинной хроматографии на смоле TALON[®] был получен высокоочищенный ферментный препарат Dnmt3a-CD. Определена активная концентрация Dnmt3a-CD. Была охарактеризована плаزمиды pET41b-Dnmt3L, несущая ген *dnmt3L*: проведен рестриктный анализ и отсеквенирован ген *dnmt3L*. Был сконструирован флуоресцентно-меченный немодифицированный 18-звенный ДНК-дуплекс I с одним участком узнавания чувствительной к CpG-метилированию эндонуклеазы рестрикции NhaI (GCGC), центральная часть которого содержит CpG-последовательность. На основе ДНК-дуплекса I создан набор ДНК-дуплексов, содержащих B^{tt} и B^{tc} аддукты в участке узнавания или с 5'-конца от него. С помощью метода количественного определения метилирующей активности CpG-узнающих МТаз путем защиты метилированием от расщепления эндонуклеазой NhaI были получены зависимости эффективности метилирования ДНК-дуплекса I МТазой Dnmt3a-CD от концентрации фермента. Обнаружено, что оптимальное для ферментативной активности соотношение Dnmt3a-CD:ДНК составляет 1:1, избыток фермента по отношению к ДНК не способствовал увеличению выхода реакции.

Были получены спектры флуоресценции БПДЭ-ДНК в отсутствие и в присутствии Dnmt3a-CD. Они имели характеристические максимумы при 384 и 404 нм. В присутствии Dnmt3a-CD наблюдалось увеличение интенсивности флуоресценции ароматического пиренильного остатка. Степень разгорания флуоресценции зависела от стереохимии и локализации B^{tt} и B^{tc} аддуктов в ДНК.

¹Поддержано грантами РФФИ (07-04-00583 и 08-04-01096)

Растения рода *Phlojodicarpus* флоры Бурятии - источники кумаринов

Тараскин Василий Владимирович¹, Раднаева Лариса Доржиевна^{1,2}, Жигжитжапова Светлана Васильевна¹

¹Бурятский государственный университет, Улан-Удэ, Россия

²Байкальский институт природопользования СО РАН, Улан-Удэ, Россия
E-mail: Zhig2@yandex.ru

Кумарины, продуцируемые высшими растениями и грибами могут служить биологически активными соединениями медицинской направленности и поэтому постоянно находятся в сфере внимания исследователей. В терапии кожных заболеваний используют препараты, содержащие фурукумарины и обладающие фотосенсибилирующим и фотозащитным действием, такие как псорален, изопсорален, 8-метоксипсорален, бергаптен и изопимпинеллин. Производные 4-гидроксикумарина применяют в качестве антикоагулянтов. В ряду растительных кумаринов обнаружены весьма перспективные противовирусные (анти-ВИЧ) и противораковые агенты (Шульц и др., 2006).

Флора Сибири богата растениями, представляющими ценность в качестве источников кумаринов. К числу таких растений, безусловно, относятся растения семейства зонтичные (*Umbelliferae*). Интересным видом является вздутоплодник сибирский (*Phlojodicarpus sibiricus* Ficher ex Sprengel), произрастающий на территории Монголии и Бурятии. Вздутоплодник сибирский может быть источником кумаринов, проявляющих биологическую активность одновременно против вируса ВИЧ и микобактерий.

Нами определен качественный состав кумаринов в подземной части растений *Phlojodicarpus sibiricus* Ficher ex Sprengel. Сбор материала проводили в местах естественного произрастания в Селенгинском и Баргузинском районах Бурятии. Образцы для исследований были собраны в августе - сентябре 2007 года. В настоящее время ведутся работы по выделению индивидуальных кумаринов с целью последующей химической модификации.

Таким образом, исследование вздутоплодника сибирского является актуальным, поскольку это позволит определить возможности его практического использования как источника биологически активных соединений.

Литература

1. Ложкин А.В., Саканян Е.И. Природные кумарины: методы выделения и анализа (обзор)//Химико-фармацевтический журнал. Том 40, №6, 2006, с.47-56
2. Семенов А.А. Очерки химии природных соединений – Новосибирск, Наука, 2000. – 664с.
3. Шульц Э.Э. Палладий катализируемые превращения растительных алкалоидов, дитерпенов и кумаринов. Возобновляемое сырье как источник агентов для лечения особо опасных заболеваний. НИОХ СО РАН. Новосибирск.
4. Шульц Э.Э., Петрова Т.Н., Шакиров М.М., Черняк Е.И., Покровский Л.М., Нехорошев С.А., Толстикова Г.А. Кумарины корней горчичника Морисона (*Peucedanum morisonii* Bess.). Новосибирский институт органической химии имени Н. Н. Ворожцова СО РАН//Химия в интересах устойчивого развития, № 4, 2003, с.683-688

Ферментсодержащие пленки на основе хитозана***Татлыбаева Г.^а, Кулиш Е.И.^а, Мударисова Р.Х.^б****^{а)}Башкирский государственный университет,
450074, Уфа, ул. Фрунзе, 32.Телефон (3472) 236 727.**^{б)}Институт органической химии УНЦ Российской академии наук,
450054 Уфа, Проспект Октября, 71. Факс (3472) 356 066.**E-mail: monakov@anrb.ru*

Природный полисахарид хитозан (ХТ) представляет большой интерес для медицинского применения благодаря его низкой токсичности и биологической активности. В последнее время перспективным представляется создание на основе ХТ ферментсодержащих пленочных покрытий для временной защиты и лечения ран и ожогов. Основной предпосылкой для применения протеолитических ферментов при местном лечении ожогов и гнойных ран является их способность осуществлять лизис некротических тканей и ускорять заживление ран.

В настоящей работе изучены некоторые свойства пленок ХТ с протеолитическим ферментом трипсином (ТП). Хитозановые пленки были сформированы из растворов в 1% уксусной кислоте. Концентрация полимера в исходном растворе составляла 2 дл/г. Концентрация ТП в пленке составляла 1, 5, 10, 20 вес % от содержания полимера. Кинетику выхода ТП из пленочных образцов, помещенных в водный раствор изучали спектрофотометрически при $\lambda=277$ нм. Для предотвращения растворения хитозановых пленок в воде их предварительно термообработывали в течение 1 часа при 40°C. Данные о кинетике выделения белка из модифицированных хитозановых пленок свидетельствуют о существенном замедлении диффузии фермента во внешний раствор. Образование более прочного слоя модифицированного хитозана при обработке пленки в течение 1 часа при небольшой температуре позволяет получить материал с пролонгированным выделением трипсина: в течение 15 ч выделяется лишь 35% белка, включенного в пленку, а дальнейшее выделение белка происходит в течение нескольких суток. Столь существенное замедление процесса диффузии ТП через тонкую полимерную мембрану позволяет предположить, что молекула фермента внутри пленки находится в виде полиэлектролитного комплекса. Обнаружено, что термообработка пленок способствует уменьшению растворимости в воде при сохранении их высокой сорбционной способности.

Таким образом, изменяя условия приготовления пленок ХТ, варьируя их состав и проводя их термическую обработку можно регулировать выход фермента из полимерной матрицы.

Экологическое состояние родников калининского района тверской области**Толкачёва Людмила Николаевна***Тверской государственный университет, химический факультет, Тверь, Россия
Varlamova.l@mail.ru*

В настоящее время вода родников активно используется населением для пищевых целей. Многие жители г. Твери предпочитают для приготовления пищи использовать воду родников в отличие от водопроводной. Нами обследованы родники близ д. Савватьево, д. Гришкино и д. Щербинино, которые являются нисходящими (питаются безнапорными подземными водами), приуроченными к долинам рек. Для сравнительной оценки использована питьевая вода санатория «Карачарово». Родники каптированы бетонными кольцами, желобами для стока воды или имеют вид колодцев, оборудованных деревянными срубами. Гидрохимическая характеристика родниковых вод приведена в табл.

Макрокомпонентный состав воды родников (мг/л)

Расположение родников	рН	натрий	калий	натрий/калий	кальций	магний	железо
Савватьево	7,2	1,5	0,8	2,0	36,0	13,4	0,03
Щербинино		1,3	0,7	2,0	52,0	18,2	0,04
Гришкино		3,8	0,6	6,0	74,0	19,4	0,09
сан. Карачарово		5,4	3,0	1,8	63,0	21,0	0
ПДК по СанПиН 2.1.4.1074-01	6,5 – 9,0	-	12,0*		-	-	0,30

* - для стран ЕС [1].

Установлено, что химический состав родниковых вод значительно изменяется. Он обусловлен геологическим строением местности и влиянием имеющихся на водосборной площадке источников загрязнения. При экологической оценке качества воды особое внимание уделяется соотношению натрия/калий. В естественных условиях он приближается к 10, т.е. содержание калия в воде на порядок меньше количества натрия. Это связано с высокой сорбируемостью калия и поглощением его бактериями. В загрязненных водах это соотношение выравнивается. Использование такой воды способствует увеличению риска сердечно-сосудистых заболеваний [2]. Для изученных нами родников установлено, что соотношение натрия/калий изменяется от 2 до 6, следовательно, в родники в результате деятельности человека поступает значительное количество соединений калия, и это увеличивает риск сердечно-сосудистых заболеваний у жителей региона.

Литература

- 1 Шитиков В.К., Розенберг Г.С., Зинченко Т.Д. Количественная гидроэкология: методы, критерии, решения. М.: Наука, 2005. 281с.
- 2 Лукнер Л.Д., Шестаков В.М. Моделирование миграции подземных вод. М.: Недра, 1986. 208с.

Сравнение кинетических параметров ферментов в пленках полиэлектролитов линейной и нелинейной архитектуры.***Торгонская Анна Анатольевна, Дубачева Галина Витальевна****Кафедра хим. энзимологии, химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

В последнее время биосенсорные технологии привлекают все большее внимание как диагностические и биоаналитические системы. Неоспоримыми преимуществами их использования являются низкая стоимость, минимизация числа необходимых для анализа реагентов, простота использования, мобильность и возможность эксплуатации неподготовленным персоналом. Фенольный сенсор на основе тирозиназы и холиновый сенсор на основе холиноксидазы на данный момент являются одними из наиболее перспективных, изучаемых и социально востребованных биоаналитических систем. Данные сенсоры позволяют проводить анализ токсичных производных фенола, измерять активность эстераз, использующих производные фенола и холина в качестве субстратов, а также осуществлять детекцию ингибиторов эстераз, что входит в спектр важнейших задач медицины и охраны окружающей среды.

Одной из тенденций развития, кроме повышения требований к чувствительности и стабильности биосенсоров, является минимизация их размеров. Среди множества современных методов, позволяющих решить поставленные задачи, специалистами особо выделяется технология последовательного нанесения полиэлектролитов (layer-by-layer technology, LBL technology). Данный метод представляет собой простую и эффективную технику создания многослойных ультратонких органических пленок на твердой поверхности, что может быть использовано в том числе и для создания сенсорных матриц. Использование метода послойного нанесения полиэлектролитов в биосенсорных нанотехнологиях представляет интерес как с прикладной, так и с фундаментальной точек зрения. Потому исследование кинетических параметров ферментов и стабильности биосенсоров при использовании различных полиэлектролитов является весьма актуальной задачей.

Таким образом, в рамках данной работы изучены активности и операционные стабильности тирозиназных и холиноксидазных биосенсоров, созданных по методу послойного нанесения полиэлектролитов с использованием поликатионов линейной и нелинейной архитектуры. А также были определены кинетические параметры тирозиназы и холиноксидазы в пленках полиэлектролитов линейной и нелинейной архитектуры (константы Михаэлиса и максимальные скорости ферментативной реакции) по фенолу и холину соответственно. Был проведен анализ полученных результатов и их сравнение с литературными данными для тирозиназы и холиноксидазы, иммобилизованных на поверхности сенсоров различными способами.

Свойства таксан-содержащей наноэмульсии**Угланова С.В., Клячко Н.Л.**

*Кафедра Химической Энзимологии, Химический факультет, Московский
Государственный Университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия
E-mail: suglanova@gmail.com*

Проблема доставки в организм нерастворимых в воде веществ, к которым относятся и многие из обладающих противораковой активностью, общеизвестна. Универсальной лекарственной формы для множества потенциальных препаратов не существует. Среди наиболее эффективных по способности воздействия на раковые клетки, но обладающих исключительно низкой растворимостью в воде, следует упомянуть таксаны (доцетаксел и паклитаксел). В последние годы было предложено множество способов повышения растворимости препаратов на основе таксанов, включающие как различные варианты химической модификации соединений, так и использование таких средств доставки, как например, липосомы, эмульсии, суспензии и т.д. В данной работе стабилизированные эмульсии типа масло в воде (м/в) с размерами в нанодиапазоне были использованы в качестве контейнеров для включения паклитаксела и доцетаксела. Однако, с точки зрения повышения стабильности системы, простоты хранения, легкости реконструкции и приведения к стандартным, используемым в большинстве клиник инфузионным растворам, представляются привлекательными, так называемые, лиофилизированные эмульсии. Такие системы, содержащие таксаны, были нами приготовлены и охарактеризованы.

В работе показано, что реконструированные после высушивания жидкие препараты оставались стабильными эмульсиями с размерами частиц в нанодиапазоне и узким распределением по размерам, что подтверждается данными исследований динамического светорассеяния. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии было подтверждено сохранение количества включенных в эмульсию действующих веществ, таксанов, после высушивания и последующей реконструкции эмульсии, а также при ее разведении в 5, 10 и 20 раз инфузионными растворами декстрозы. Стабильность системы контролировалась как в экспериментах ускоренного состаривания при 37⁰С, так и при разведении растворами, моделирующими плазму крови. Моделирующий циркуляцию лекарства в организме диализ через полупроницаемую мембрану показал существенное замедление скорости выхода вещества из эмульсии по сравнению с наблюдаемым для водно-спиртовых растворов. По результатам доклинических испытаний, общей токсичностью системы не обладали.

В заключение можно сказать о перспективности использования в клинической практике эмульсий, содержащих таксаны.

Литература

1. Hennenfent K. L., Govindan R. (2006) Novel formulations of taxanes: a review. Old wine in a new bottle? // *Annals of Oncology*, V. 17, 5, p. 735–749.
2. Weers J. G., Arlauskas R. A. (2004) Particle size analysis of perfluorocarbon emulsions in a complex whole blood matrix by sedimentation field-flow fractionation // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 33, p. 265–269.
3. Taha E. I., Al-Saidan S., Samy A. M., Khana M. A. (2004) Preparation and in vitro characterization of self-nanoemulsified drug delivery system (SNEDDS) of all-trans-retinol acetate // *International Journal of Pharmaceutics*, 285, p.109–119.

**Генотипирование β -лактамаз СТХ-М типа
методом гибридизационного анализа на ДНК-микрочипе**

Уляшова Мария Морисовна, Рубцова Майя Юрьевна, Егоров Алексей Михайлович

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: mmulyashova@gmail.com

Механизмы устойчивости микроорганизмов к современным цефалоспорином чрезвычайно разнообразны, однако, наибольшее значение имеет резистентность, связанная с продукцией плазмидных β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС). В последнее время во многих странах мира, в том числе и в России, отмечается стремительное распространение среди возбудителей инфекционных заболеваний человека БЛРС СТХ-М типа, эффективно гидролизующих многие оксиимино- β -лактамы. В настоящий момент насчитывается около 70 ферментов данного типа. Выраженная устойчивость микроорганизма к цефотаксиму вследствие продукции СТХ-М β -лактамаз может быть обнаружена с помощью стандартных фенотипических тестов, однако, точная диагностика и эпидемиологические исследования СТХ-М β -лактамаз может быть осуществлена только с помощью молекулярно-генетических методов.

Целью данной работы являлась разработка метода генотипирования СТХ-М β -лактамаз на основе определения точечных мутаций в кодирующих их генах. Для этого было предложено использовать метод гибридизационного анализа на ДНК-микрочипах с колориметрической детекцией. В его основе лежит амплификация гена СТХ-М β -лактамазы, предварительно выделенного из клинического материала, с одновременным введением биотина в качестве метки, и последующая гибридизация со специфическими олигонуклеотидами, иммобилизованными на поверхности микрочипа. Результат гибридизации выявляется конъюгатом стрептавидин-пероксидаза хрена с последующей колориметрической пероксидазы.

В ходе данной работы на основе анализа кодирующих последовательностей, доступных из Международных банков данных, были определены положения точечных мутаций в генах описанных СТХ-М β -лактамаз и осуществлен выбор последовательностей олигонуклеотидов для определения наличия данных мутаций в генах. Далее была проведена оптимизация условий проведения ПЦР и гибридизации меченной биотином ДНК с иммобилизованными на поверхности чипа олигонуклеотидами.

Возможность успешного использования разработанного метода гибридизационного анализа на ДНК-микрочипе для генотипирования β -лактамаз была показана при тестировании 70 клинических образцов, содержащих ферменты данного типа. Для каждого образца определен генотип СТХ-М β -лактамазы был подтвержден ДНК секвенированием.

Стабилизация фермента, лизирующего клетки стрептококков группы А, для использования в фармакологических препаратах

Филатова Л.Ю., Леваинов А.В., Клячко Н.Л.

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет, Москва, Россия
E-mail: lubfil@rambler.ru*

В последнее время довольно остро стоит проблема лечения заболеваний, вызываемых стрептококками (ангина, фарингит и т. д.). Современные методы лечения таких заболеваний с использованием антибиотиков теряют свою эффективность по причине появления штаммов бактерий резистентных к антибиотикам.

В середине 70-х годов сотрудниками Рокфеллеровского Университета Нью-Йорка (США) был обнаружен фермент, лизирующий клетки стрептококков групп А и С. Данный фермент является фаг-ассоциированным и продуцируется после заражения бактериальной клетки бактериофагом С1. Данный фермент гидролизует амидную связь между L-аланином и N-ацетилмурамовой кислотой, входящей в состав клеточной стенки грам-положительных бактерий. В литературе он чаще всего встречается под именем Лизин, P1yC Лизин, но иногда можно встретить описание данного фермента под именем N-ацетилмурамоил-L-аланин амидаза.

Фаг-ассоциированный фермент может быть альтернативой антибиотикам в лечении и профилактике стрептококковых инфекций полости рта, но он очень быстро денатурирует при повышенной температуре (37°C). Поэтому целью работы являлась разработка основных приемов его стабилизации в различных препаратах медицинского назначения.

Для увеличения стабильности фермента использовались методы химической (наложение «сшивок» на молекулу) и физической (добавление ПАВ и полиэлектролитов) иммобилизации. При этом учитывалось, что модифицирующие реагенты должны быть растворимыми в воде соответствовать требованиям фармакологии (нетоксичность, биоразлагаемость).

Основанием для использования сшивающих агентов было то, что P1yC Лизин содержит в своем составе несколько субъединиц, часть из которых, возможна, важна для поддержания нативной структуры белка. Действительно, положительные эффекты были достигнуты при использовании BS³ и глутарового альдегида, при этом результат модификации зависел от pH и количества добавляемого сшивающего агента. В ходе экспериментов обнаружено повышение стабильности препарата сшитого белка по сравнению с исходным (несшитым) ферментом.

Для физической иммобилизации использовались различные ПАВ и полиэлектролиты. Были обнаружены эффекты стабилизации, которые зависели от соотношения модифицирующий агент/фермент.

Аптамерные вставки в теломеразной РНК для выделения и изучения теломеразы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.**Щербакова Д.М. (докладчик), Соколов К.А., Зверева М.Э., Донцова О.А.**

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: scherbakova@genebee.msu.ru

Теломераза – сложный рибонуклеопротеид (РНП), достраивающий теломерные концы хромосом, укорачивающиеся из-за недорепликации ДНК [1]. Ее активность детектируется в большинстве раковых клеток млекопитающих и иммортализованных клеточных линиях, а также в клетках низших эукариот. Данная работа посвящена изучению теломеразы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Основные компоненты теломеразы - это белковая каталитическая субъединица (Est2p) и теломеразная РНК (TLC1 РНК), небольшой фиксированный участок которой служит матрицей для синтеза теломерных повторов. В комплекс входят также вспомогательные белки (Est1p, Est3p и др.).

Введение аптамерных вставок в молекулу РНК для их выделения с помощью аффинной хроматографии и изучения является интересной альтернативой введению аффинных эпитопов в белки, входящие в состав РНП. В данной работе использованы вставки в TLC1 РНК, являющиеся аптамерами к белку стрептавидину [2]. Эти вставки успешно применяются для выделения различных РНП с использованием коммерчески доступной смолы стрептавидин-сефарозы.

Сложность в разработке методики выделения РНП с использованием аптамерной вставки состоит в выборе места ее введения так, чтобы она была экспонирована для связывания с аффинной смолой и не нарушала структуру и функциональность РНК в составе РНП. Для теломеразной РНК дрожжей на сегодняшний момент нет данных о ее третичной структуре, которые облегчили бы задачу.

В нашей лаборатории были выбраны места в структуре TLC1 РНК и введены несколько аптамерных вставок, по одной в каждом случае. Задачей данной работы является тестирование функциональности РНК со вставками, а также разработка методики выделения активной теломеразы. Нами получен штамм дрожжей на основе DBY-746, в котором экспрессируется TLC1 РНК со вставкой. Этот штамм дал нам возможность, проанализировав фенотип клеток, исключить то, что введение данной вставки нарушает функциональность теломеразы. Ген TLC1 РНК введен на низкокопийной центромерной плазмиде под эндогенным промотером и терминатором, то есть количество РНК близко к природному. Такая плазида с геном дикого типа была любезно предоставлена нам нашими коллегами из Америки [3]. В нашей системе, основанной на методе замены плазмид в дрожжах, можно проверить на функциональность TLC1 РНК с любыми мутациями.

Мы также проверили и показали, что с помощью аффинной хроматографии за аптамерную вставку выделяется активный фермент. Полученная активность принадлежит теломеразе и по характеру совпадает с активностью фермента, выделенного классическим способом с использованием ионообменной хроматографии.

Литература

1. Greider C.W., Blackburn E. H. (1987) The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity // *Cell*, v. 51(6), p. 887-898
2. Srisawat C., Engelke D.R. (2001) Streptavidin aptamers: affinity tags for the study of RNAs and ribonucleoproteins // *RNA*, v. 7(4), p. 632-641
3. Singer M.S., Gottschling D.E. (1994) TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase // *Science*, v. 266(5184), p. 404-409

Оптимизация условий ферментативного получения линолевой кислоты из масла сафлора

Майдина, А.Б. Белова, Н.Л.Клячко

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
E-mail: maidina27@hotmail.com*

Основным компонентом жиров являются триглицериды—сложные эфиры глицерина и жирных кислот. Они широко распространены в природе, отличаются большим разнообразием и имеют практическое значение во многих областях деятельности человека. Особенно большое значение для жизнедеятельности человеческого организма имеют ацилглицериды жиров, содержащие несинтезируемую в организме человека линолевою, линоленовую и арахидоновую жирные кислоты. Эти кислоты называют эссенциальными кислотами, т.е. имеющими исключительное значение для жизнедеятельности организмов животных. В последнее время линолевая кислота (цис,цис-9-12-овая кислота) широко используется как лекарственное средство в терапии и профилактике многих серьёзных заболеваний (атеросклероз, ишемическая болезнь и другие).

Реакция ферментативного гидролиза жиров - это расщепление жира под действием воды в присутствии катализатора до свободных жирных кислот и моно-, ди-глицеридов или глицерина. Гидролиз природных жиров является важным путём получения свободных жирных кислот, глицерина и ди- или моноглицеридов в промышленности.

Химический гидролиз ненасыщенных триглицеридов даёт небольшой выход свободных ненасыщенных жирных кислот и требует их очистки от побочных продуктов, образованных в результате термической дегградации триглицеридов, сопровождающей технологический процесс, окисления ненасыщенных жирных кислот и образования их транс-изомеров. Поэтому на сегодняшний день одним из наиболее перспективных способов получения свободных жирных кислот из триглицеридов может считаться ферментативный гидролиз под действием липаз, не приводящий к окислению двойных связей ненасыщенных жирных кислот и не загрязняющий окружающую среду.

Липаза (гидролаза триглицеридов, К.Ф.3.1.1.3) представляет собой фермент, катализирующий гидролиз триглицеридов до глицерина, моно- и диглицеридов и жирных кислот. В случае термонеустойчивого масла, содержащего ненасыщенные жирные кислоты наиболее подходящим методом получения жирных кислот является ферментативный гидролиз. Субстраты липазы, триглицериды, как правило, нерастворимы, а фермент растворяется в воде, с чем связано свойство активации липаз на поверхности раздела фаз масло/вода. Поэтому, чтобы улучшить каталитические характеристики липазы, для ферментативного гидролиза масла сафлора была выбрана эмульсия масло-ПАВ-вода.

Методом рН-статирования были определены параметры реакции ферментативного гидролиза масла сафлора красильного (*carthamus tinctori*), содержащего большое количество линолевой и олеиновой кислоты-92%, под действием липаз из разных источников, как свободных, так и иммобилизованных, в эмульсии (масло сафлора – дезоксихолат натрия-вода). Проведена оптимизация условий - рН и температуры, а также содержания и концентрации солей. В оптимальных условиях была проведена реакция гидролиза масла сафлора под действием липаз. Проведен анализ продуктов реакции методом ТСХ. Обнаружено, что основным продуктом реакции является свободная жирная кислота. Проведена отработка метода отделения целевого продукта - линолевой кислоты реакции от остальных компонентов смеси.