

**СЕКЦИЯ «БИОИНЖЕНЕРИЯ И БИОИНФОРМАТИКА»****ПОДСЕКЦИЯ «ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ»**

**ДНК-метилтрансфераза SsoII как фактор транскрипции: особенности структуры белка и стехиометрии его комплексов с ДНК1**

**Абросимова Л.А.<sup>1,2</sup>, Молочков Н.В.<sup>3</sup>, Рязанова А.Ю.<sup>1,2</sup>**

*Студент, научный сотрудник, аспирант*

<sup>1</sup>*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия*

<sup>2</sup>*НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Москва, Россия*

<sup>3</sup>*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцино, Россия*

*E-mail: abrludmila@rambler.ru, molotchkov@rambler.ru, venel@yandex.ru*

C5-цитозиновая ДНК-метилтрансфераза (МТаза) SsoII (M.SsoII) из штамма *Shigella sonnei* 47 узнает в двутиповой ДНК последовательность 5'-CC $\underline{N}$ GG-3'/3'-GGN $\underline{C}$ C-5' (N = A, C, G, T) и метилирует внутренний остаток dC в ней. В структуре M.SsoII первому консервативному мотиву, характерному для всех МТаз, предшествует N-концевая область длиной в 70 аминокислотных остатков, которая определяет функционирование M.SsoII как фактора транскрипции. Проведенный ранее анализ аминокислотной последовательности позволил выдвинуть гипотезу об отсутствии в N-концевой области M.SsoII  $\beta$ -тяжей и наличии там пяти  $\alpha$ -спиралей, в том числе структурного модуля "спираль-поворот-спираль", который играет ключевую роль в связывании ДНК у многих регуляторов транскрипции (например, C-белков C.AhdI и C.BclI).

Для проверки этой гипотезы методом кругового дихроизма была изучена вторичная структура полноразмерной M.SsoII, ее делеционного мутанта N-SsoII, представляющего собой N-концевую область белка, и МТазы NlaX (M.NlaX), гомологичной области M.SsoII, ответственной за метилирование. Было показано, что M.SsoII и M.NlaX содержат одинаковый процент соответствующих элементов вторичной структуры, а в состав N-SsoII входят 32 %  $\alpha$ -спиралей и 20 %  $\beta$ -тяжей. Это свидетельствует о большем сходстве M.SsoII с репрессором Cro фага лямбда, чем с  $\alpha$ -спиральными C-белками из бактериальных систем рестрикции-модификации. На основе ранее созданных моделей предполагалось, что при функционировании в качестве фактора транскрипции M.SsoII представляет собой димер. Для изучения стехиометрии ДНК-белковых комплексов использовали метод «торможения» в геле с нативными белками – маркерами молекулярной массы. Метод позволяет оценить молекулярную массу белка или ДНК-белкового комплекса за счет изменения его подвижности в нативных гелях, содержащих 7 %, 8 %, 9 % и 10 % полиакриламида. Оценка молекулярной массы комплекса M.SsoII с 15-звенным ДНК-дуплексом, содержащим участок метилирования, свидетельствует о том, что в состав комплекса входит одна молекула белка. Это согласуется с результатами, полученными ранее независимыми методами. Комплексы M.SsoII с 31-звенным ДНК-дуплексом, содержащим «регуляторный» участок, имеют различную стехиометрию: комплекс с наименьшей массой содержит одну молекулу белка, а следующий за ним по массе комплекс – две молекулы белка. Эксперименты с добавлением гепарина в реакционную смесь показали, что первый комплекс является специфическим, а второй – неспецифическим. Это также отличает M.SsoII от C-белков, специфический комплекс которых представляет собой преимущественно димер белка с ДНК, содержащей участок узнавания.

---

1 Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных при поддержке РФФИ (грант № 07-04-00545-а).

## Анализ структуры и биологических свойств ДНК-дуплексов, содержащих остаток тимидингликоля\*

Андреева М.А.<sup>1</sup>, Ян Ф.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Студент, <sup>2</sup> аспирант

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

E-mail: <sup>1</sup> a\_maria@inbox.ru, <sup>2</sup> straysquirrel@gmail.com

Одним из самых распространенных окислительных повреждений ДНК является превращение тимидина в тимидингликоль (T<sup>gl</sup>). Имеются сведения о том, что тимидингликоль оказывает влияние на функционирование эндонуклеаз рестрикции II-го типа, полимераз и ферментов репарации. Однако данные о структуре ДНК с такой модификацией и влиянии T<sup>gl</sup> на функционирование факторов транскрипции, пока еще малочисленны.

Целью данной работы являлся синтез ДНК-дуплексов, содержащих тимидингликоль, анализ их структуры и взаимодействия с фактором транскрипции NF-κB.

Природные и модифицированные олигодезоксирибонуклеотиды, входящих в состав 19-звенных дуплексов, были получены в соответствии со стандартным регламентом амидофосфитного метода синтеза. Остаток T<sup>gl</sup> вводили в одну из вырожденных позиций участка узнавания фактора транскрипции NF-κB. Известно, что данный белок вовлечен в процесс активации экспрессии многих провоспалительных и антиапоптозных генов и может специфично связываться с участком ДНК из десяти пар оснований: 5'-GGRRNNYCCC-3' (где R - dA или dG, Y - T или dC, N - dA, dG, T или dC). Введение модифицированного звена в заранее заданное положение олигонуклеотидной цепи дает возможность выявить роль модифицируемой группы атомов нуклеотида при взаимодействии ДНК с белком.

Для изучения термической устойчивости полученных ДНК-дуплексов использовали метод УФ-спектроскопии. Показано, что введение одного остатка тимидингликоля в состав дуплекса приводит к его существенной дестабилизации. Влияние T<sup>gl</sup> на структуру олигонуклеотидных дуплексов исследовали с помощью спектроскопии кругового дихроизма. Выявлено, что замена тимидина на тимидингликоль вызывает локальные нарушения двойной спирали. Характер изменения вида спектра кругового дихроизма зависит от природы нуклеотидных пар, фланкирующих пару T<sup>gl</sup>/A.

Для изучения влияния T<sup>gl</sup> на структуру ДНК-дуплексов использовали метод молекулярной динамики. Получена электронная поверхность четырех возможных изомеров тимидингликоля с помощью программы RED. Для расчета структуры дуплекса выбрано силовое поле Amber, в котором отдельно указаны все полученные характеристики модифицированного основания.

Исследовано равновесное связывание p50 субъединицы фактора транскрипции NF-κB с модифицированными ДНК-лигандами и их немодифицированными аналогами. Установлено, что эффективность образования ДНК-белкового комплекса зависит от положения T<sup>gl</sup> и его нуклеотидного окружения в κB-участке. Полученные результаты согласуются со схемой контактов гомодимера p50 субъединицы NF-κB с гетероциклическими основаниями участка узнавания и с данными кругового дихроизма о локальных изменениях в структуре модифицированных дуплексов.

---

\* Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 09-04-01315).

**Кинетика пероксидазной реакции фермента простагландин-Н-синтазы.****Бархатов В.И., Филимонов И.С.***Студент, сотрудник.**Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова**факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия**E-mail: vovan\_chemick@belozersky.msu.ru, fis82@yandex.ru*

Фермент простагландин Н синтаза (PGHS, К.Ф.1.14.99.1) катализирует превращение молекулы арахидоновой кислоты в простагландин  $H_2$  ( $PGH_2$ ). Синтез  $PGH_2$  из арахидоновой кислоты осуществляется в два этапа:

- превращение арахидоновой кислоты в органическую перекись – простагландин  $G_2$  в результате проявления циклооксигеназной активности фермента PGHS;
- восстановление простагландина  $G_2$  до простагландина  $H_2$  в результате катализируемой PGHS пероксидазной реакции.

Далее простагландин  $H_2$  под действием специфических конвертаз превращается в физиологически активные соединения, такие как простагландины  $E_2$ ,  $I_2$ ,  $D_2$ ,  $F_{2\alpha}$ , тромбоксан  $A_2$ . Эти вещества обладают чрезвычайно высокой физиологической активностью: они принимают участие в свертывании крови, развитии воспалительных процессов и иммунного ответа. Дисбаланс в их синтезе приводит к развитию различных заболеваний.

Целью данной работы являлось исследование кинетических закономерностей действия фермента PGHS, как пероксидазы. При проведении пероксидазной реакции в качестве донора электронов использовали N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамин (TMPD), в качестве перекиси – перекись водорода ( $H_2O_2$ ). За протеканием реакции следили спектрофотометрически, по накоплению окисленной формы TMPD.

Зависимость скорости пероксидазной реакции от концентрации TMPD при различных концентрациях перекиси в двойных обратных координатах представляет собой серию параллельных прямых. Аналогичные результаты получены и для перекиси, то есть зависимость скорости пероксидазной реакции от концентрации перекиси при различных концентрациях TMPD в двойных обратных координатах также представляет параллельные прямые. Это свидетельствует о наличии необратимых элементарных стадий между пунктами донирования субстратов.

Детальный анализ полученных результатов и теоретические расчеты показали, что в кинетическом механизме пероксидазной реакции либо совсем отсутствуют мономолекулярные стадии, либо константы скоростей этих стадий чрезвычайно велики.

Фермент подвергается быстрой необратимой инактивации как в ходе пероксидазной, так и циклооксигеназной реакции. Механизмы инактивации при протекании пероксидазной и циклооксигеназной реакциях различны. Инактивация носит необратимый характер и имеет первый порядок по концентрации фермента. Молекулярный механизм инактивации фермента PGHS до сих пор не известен.

Для определения механизма необходимо получить зависимость параметров инактивации от концентрации субстратов реакции. При протекании реакции концентрация активного фермента в растворе снижается по экспоненциальному закону  $E_{\text{акт}}(t) = E_0 \cdot e^{-\Lambda t}$ , где  $E_0$  – начальная концентрация фермента,  $\Lambda$  – наблюдаемая константа инактивации.

В рамках данной работы нами определены значения параметров инактивации для всего исследуемого диапазона концентраций перекиси и TMPD. Показано, что при увеличении концентрации перекиси в реакционной среде  $\Lambda$  возрастает. Для донора электронов наблюдается обратная картина, при возрастании концентрации TMPD значение  $\Lambda$  уменьшается.

**Потенциал ионизации и энергия верхних заполненных молекулярных орбиталей  
полизамещенных бензолов**

**Дубинец А.В.**

*студент*

**Пивоваров Д.В.**

*аспирант*

*Таганрогский государственный педагогический институт, физико-математический  
факультет, Таганрог, Россия  
E-mail: Dubines\_87@mail.ru*

Выполнен сравнительный QSAR-анализ средне-летальных доз хлорпроизводных бензола ( $LD_{50}$ ) при пероральном введении для белых крыс, предельных и непредельных хлорсодержащих соединений. Установлена зависимость биологической активности ( $I_{GA}$ ) производных хлорбензола от числа, вида и положения заместителей в бензольном кольце, в частности от потенциала ионизации (ПИ).

В данной работе рассмотрены методики определения ПИ на примере полизамещенных бензолов. Произведена осознанная выборка из класса соединений, ПИ для которых был определен экспериментально. Для этих веществ был найден ПИ в соответствии с теоремой Купманса, связывающая ПИ  $k$ -го электрона с энергией  $\epsilon_k$  хартри-фоковской орбитали исходной молекулы, с замкнутой оболочкой:  $I_k = -\epsilon_k$ .

Для нахождения  $\epsilon_0(BZMO)$ , значение энергии верхней заполненной молекулярной орбитали и соответственно  $I_1$ , использовались метод квантовой химии Extended Hückel MO и AM1. Данные методы реализованы в рамках пакета Chem3D Ultra 10.0. Extended Hückel MO дал весьма противоречивые результаты. Детальное исследование показало, что найденные ПИ для узкого класса соединений метилзамещенных бензолов и их изомеров коррелируют с экспериментальными значениями. Однако даже в этом случае ПИ получается завышенным и без подбора соответствующего инкремента не может быть использован в универсальном методе.

Уравнение зависимости по Extended Hückel MO  $I \sim \epsilon_0(BZMO)$  метил замещенных бензолов, полученное методом наименьших квадратов:

$$I = 0.9647 * \epsilon_0(BZMO) - 5.5413 \quad (1)$$

Статистические параметры в этом случае примут вид: коэффициент корреляции  $r = 0.91$ ; коэффициент детерминации  $r^2 = 0.8282$ ; критерий Фишера  $F = 77.1117$ ; объясненная дисперсия  $\nu = 0.8174$ , при объеме выборки  $n = 18$ .

При нахождении  $\epsilon_0(BZMO)$  полуэмпирическим методом AM1 было аналогичным образом получено уравнение для интерпретации значений  $I$ .

$$I = 1.023 * \epsilon_0(BZMO) - 0.7723 \quad (2)$$

Статистические параметры в этом случае примут вид: среднее квадратичное отклонение  $s = 0.0449$ ; коэффициент корреляции  $r = 0.9054$ ; коэффициент детерминации  $r^2 = 0.8197$ ; критерий Фишера  $F = 372.9$ ; объясненная дисперсия  $\nu = 0.8175$ . Объем выборки  $n = 84$ , что существенно увеличивает значимость полученного уравнения.

Для большинства соединений расчеты в этом приближении дают удовлетворительное согласие с экспериментальными вертикальными ПИ и поэтому широко используются для интерпретации данных фотоэлектронной спектроскопии и QSAR-анализа.

### Литература

1. Бацанов С. С. (2000). Структурная химия. Факты и зависимости. – М.: Изд-во Диалог-МГУ, – 292с.
2. Радченко Е.В., Палюлин В.А., Н. С.Зефирова (2006) Локальные молекулярные характеристики в анализе количественной связи «структура—активность» // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева) -, т. L, № 2.

## Межмолекулярные взаимодействия в ряду бициклических соединений (гидрофобные взаимодействия и поляризуемость молекул)

Коноваленко С.П.

Студентка

Пивоваров Д.В.

аспирант

Таганрогский государственный педагогический институт, физико-математический факультет, Таганрог, Россия  
E-mail: svetlana\_s12@mail.ru

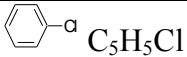
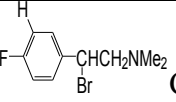
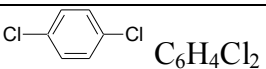
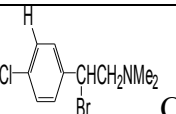
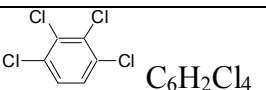
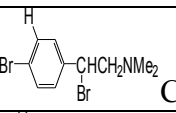
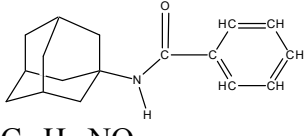
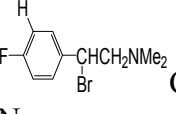
В данном исследовании разработан алгоритм и протестирована методика исследования коэффициента распределения физиологически активных веществ в системе октанол/вода по методу Манхольда-Реккера. В данном методе гидрофобность вещества  $C_xH_y$  определяется по следующей формуле:

$$\log P = x * f(C) + y * f(H) + n * C_m,$$

где  $f(C), f(H)$  – фрагментальные константы действия фрагмента в молекуле;  $C_m$  – корректирующий фактор и он равен 0,219;  $n$  – частота повторения  $C_m$ .

По данной методике были просчитаны значения  $\log P$  для соединений трёх классов: замещённых хлорбензолов (12 соединений), адамантанов (38 соединений) и замещённых бромфенэтиламинов (22 соединения). Для некоторых веществ отмечен результат, не совпадающий с экспериментальным значением  $\log P$ , что говорит о другом механизме гидрофобных взаимодействий в исследуемых рядах. В таблице приведены значения для некоторых соединений из исследуемых классов. Относительная ошибка для приведённых соединений составляет не более 10%.

Таблица 1

Соединение	$\log P_{\text{экс}}$ п.	$\log P$	Соединение	$\log P_{\text{экс}}$	$\log P$
 $C_5H_5Cl$	2,59	2,62	 $C_{10}H_{13}BrF$	2,55	2,61
 $C_6H_4Cl_2$	3,15	2,90	 $C_{10}H_{13}BrCl$	3,03	3,09
 $C_6H_2Cl_4$	4,27	3,49	 $C_{10}H_{13}Br_2N$	3,30	3,29
 $C_{17}H_{21}NO$	3,00	3,01	 $C_{10}H_{13}BrF$	2,55	2,61

Полученные результаты являются хорошей моделью экспериментального распределения  $\log P$  и по точности превышают возможности расчётных методик, заложенных в пакет молекулярного моделирования ChemOffice. Реализованный алгоритм расчёта позволяет получить более точные уравнения КССА для прогнозирования новых высокоэффективных препаратов.

### Литература

1. Mannhold Raimund, Roelof F. Rekker (2000) «The hydrophobic fragmental constant approach for calculating  $\log P$  in octanol/water and alifatic hydrocarbon/water systems» // Perspectives in drug discovery and design. : Kluwer Academic Publisher.

**Сперматозоидная глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа человека: выделение, очистка и исследование влияния на ее активность различных факторов<sup>1</sup>  
Куравский М.Л.<sup>1</sup>, Элькина Ю.Л.<sup>1,2</sup>, Эльдаров М.А.<sup>2</sup>**

*студент, аспирантка, ведущий научный сотрудник, к.б.н.*

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

<sup>2</sup>Центр «Биоинженерия» Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>1</sup>E-mail: mkuravsky@yandex.com, feigele@gmail.com

<sup>2</sup>E-mail: eldarov1@yandex.ru

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД, ЕС 1.2.1.12) катализирует одну из реакций гликолиза. В организме млекопитающих ГАФД представлена соматическим и сперматозоидным (ГАФД-с) изоферментами. Экспрессия обоих изоферментов тканеспецифична: показано, что соматическая ГАФД присутствует в соматических клетках, тогда как ГАФД-с экспрессируется только в сперматиде и участвует в энергообеспечении жгутика сперматозоида. В отличие от соматического изофермента, растворенного в цитоплазме, ГАФД-с прикреплена к цитоскелету жгутика сперматозоида. Прикрепление осуществляется за счет дополнительного N-концевого домена, значительную долю аминокислотных остатков которого составляют остатки пролина. Тканеспецифичность экспрессии изоферментов ГАФД делает ГАФД-с удобной мишенью для воздействия контрацептических средств, а также позволяет сделать предположение о существовании связи между нарушениями функционирования ГАФД-с и некоторыми типами мужского бесплодия. Целью исследования является разработка методики получения ГАФД-с в достаточных количествах, изучение ее свойств и сравнение их со свойствами соматического изофермента.

ГАФД-с не может быть выделена из сперматозоидов в большом количестве в виду низкого содержания в них. Поэтому для получения фермента использовался штамм *E.coli*, трансформированный плазмидой pET21d со вставкой рекомбинантного гена ГАФД-с, N-концевой домен которой заменен на хитин-связывающий домен хитиназы A1 *Bacillus circulans*. Удаление N-концевого домена проведено в связи с его склонностью к агрегации в водном растворе, препятствующей изучению фермента. Было показано, что трансформированные бактерии являются суперпродуцентами ГАФД-с. Для выделения и очистки рекомбинантного фермента была использована методика, основанная на сульфатно-аммонийном фракционировании лизата бактериальных клеток и последующей аффинной хроматографии на хитиновом носителе при 4°C. Гомогенность полученного препарата подтверждена с использованием методов динамического светорассеяния, дифференциальной сканирующей калориметрии и Ds-Na-электрофореза. Исследовано влияние агрессивных условий на активность ГАФД-с. Показано, что она менее подвержена окислению пероксидом водорода, воздействию денатурирующего агента (гуанидинхлорид), а также колебаниям pH и температуры, чем соматический изофермент. Эволюция ГАФД-с в направлении увеличения стабильности может быть связана с необходимостью функционировать на протяжении всего периода жизни сперматозоида, в то время как соматический изофермент может постоянно обновляться за счет синтеза новых молекул.

На основе известных трехмерных структур была построена модель структуры ГАФД-с человека. С использованием метода молекулярной динамики проведено исследование воздействия окисления на устойчивость четвертичной структуры, а также продемонстрирована роль одного из остатков цистеина, отсутствующего в составе соматического изофермента, в обеспечении стабильности белка.

1 Тезисы доклада основаны на материалах исследования, проведенного в рамках гранта Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 09-04-01122-а).

2 Авторы выражают признательность профессору, д.б.н. Муронцу В.И. и ст.н.с., к.б.н. Шмальгаузен Е.В. за помощь в подготовке тезисов.

**Взаимодействие фактора транскрипции NF-κB с синтетическими ДНК-дуплексами\***Лукьянов М.М.<sup>1\*\*</sup>, Казанова Е.В.<sup>2</sup><sup>1</sup>студент, <sup>2</sup>инженер<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, РоссияE-mail: <sup>1</sup>mikhail.loukianov@gmail.com, <sup>2</sup>evkazanova@mail.ru

Метод ковалентного связывания белка с синтетическим ДНК-дуплексом позволяет идентифицировать домен белка, и даже отдельные аминокислоты, взаимодействующие с заданным фрагментом ДНК в белково-нуклеиновом комплексе. Этот подход можно использовать для обнаружения белков в клеточных экстрактах, а также для разработки необратимых ингибиторов ДНК-связывающих белков.

Для ковалентного связывания остатков лизина с модифицированными олигонуклеотидными дуплексами было предложено новое соединение – 2'-O-(2,5-диоксо-3-азапентил)уридин, содержащее в составе углеводного фрагмента альдегидную группу [1]. В нашей работе были получены ДНК-дуплексы, несущие в своей структуре участок узнавания фактора транскрипции NF-κB и содержащие это альдегидное производное уридина. На 3'-конец олигонуклеотидов был введён амиолинкер, защищающий их от действия клеточных экзонуклеаз. Исходными соединениями для синтеза альдегидных производных ДНК послужили олигонуклеотиды, несущие диольную группировку, которые также использовались для изучения комплексообразования с NF-κB.

Анализ методами ВЭЖХ и электрофореза в полиакриламидном геле показал гомогенность синтезированных олигонуклеотидов. Анализ продукта реакции с бис-гидразидом янтарной кислоты подтвердил наличие диольной группировки в олигонуклеотидах, содержащих модифицированный нуклеозид. Определение температуры плавления ДНК-дуплексов показало, что вводимые модификации существенно не сказываются на термической стабильности двойной спирали. Установлено, что введение 3'-концевого амиолинкера повышает устойчивость дуплексов к действию фосфодиэстеразы змеиного яда.

Исследование комплексообразования 2'-диолсодержащих ДНК-дуплексов с гомодимером субъединицы p50 фактора транскрипции NF-κB продемонстрировало их эффективное связывание, однако аффинная модификация белка 2'-альдегидсодержащими лигандами протекала с низким выходом. Структура модифицированных дуплексов и их комплексов с NF-κB была исследована методом молекулярной динамики.

Обнаружено, что фактор транскрипции NF-κB связывается с ДНК-дуплексами, содержащими палиндромные участки, с тем же сродством, что и с сайтами специфического связывания этого фактора, и с большим сродством, чем с дуплексами с произвольной нуклеотидной последовательностью.

## Литература

1. E.M. Zubin, D.A. Stetsenko, T.S. Zatsepin, M.J. Gait and T.S. Oretskaya (2005) Oligonucleotides containing 2'-O-[2-(2,3-dihydroxypropyl)amino-2-oxoethyl] uridine as suitable precursors of 2'-aldehyde oligonucleotides for chemoselective ligation // *Bioorganic & Medical Chemistry*, V. 13, P. 4912–4920.

\* Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 08-04-91974 ННИОМ\_a)

\*\* Авторы выражают признательность в.н.с., д.х.н. Кубаревой Е.А. за помощь в подготовке тезисов

**Особый механизм генерации потенциала в фотосистеме 2 в кислых условиях****Петрова И.О.***студент**Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет  
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия**E-mail: etrangere2005@yandex.ru*

Первой стадией процессов, происходящих в фотосистеме 2 (ФС 2), является светозависимое разделение зарядов между фотосинтетическим реакционным центром P680 и первичным хинонным акцептором Q<sub>A</sub>. Эта реакция сопряжена с окислением воды с выделением кислорода в водоокисляющем центре, а также трансмембранным переносом протонов (точнее, поглощением на стромальной стороне и выделением на люменальной), поэтому очевидно, что она должна зависеть от pH. Однако до сих пор не был исследован электрогенез в условиях низких pH. В данном исследовании был проведен эксперимент на сердцевинных комплексах ФС 2, лишенных марганца (неспособных окислять воду), с использованием прямого электрометрического метода при pH=5. Было показано заметное снижение скорости спада потенциала, вызываемого рекомбинацией заряда. Этот факт говорит о наличии особого, не связанного с окислением воды, механизма восстановления окисленного P680 в кислых условиях. Можно предположить, что это свидетельствует о наличии защитного механизма, препятствующего дальнейшему закислению люмена тилакоидов. Представляется интересным также рассмотреть гипотезу о наличии на донорной стороне ФС 2 ранее неизвестного донора электронов, активного при низких значениях pH.

**Литература.**

1. Hong Jin Hwang, Aparna Nagarajan, Aaron McLain, and Robert L. Burnap. (2008): Assembly and Disassembly of the Photosystem II Manganese Cluster Reversibly Alters the Coupling of the Reaction Center with the Light-Harvesting Phycobilisome. // *Biochemistry*, 47, 9747–9755
2. Doug Bruce, Guy Samson, and Christene Carpenter (1997): The Origins of Nonphotochemical Quenching of Chlorophyll Fluorescence in Photosynthesis. Direct Quenching by P680<sup>+</sup> in Photosystem II Enriched Membranes at Low pH // *Biochemistry*, 36, 749-755



**Теоретическое исследование эффективных дескрипторов соотношений «структура-активность» замещенных адамантанов****Пивоваров Д.В.**

аспирант

Таганрогский государственный педагогический институт, физико-математический факультет, Таганрог, Россия  
E-mail: DIM\_PIV@mail.ru

По мере исследования различных количественных соотношений (КССА - QSAR), связывающих вариации в структуре соединений с биологическим действием большой интерес вызывает создание физической теории, описывающей корреляцию проявления определенного вида активности и конкретные физические характеристики соединения: объем молекулы, геометрические параметры, распределение электронной плотности и т.д.

Нашему детальному изучению подвергся ряд аминокислотных адамантанов, которые ранее уже были синтезированы и изучены на некоторых биологических моделях, таких как триптазиновая модель каталепсии на параллельных пластинках для мышей. В результате проведенных исследований были установлены и опубликованы материалы, содержащие данные по биологической активности (lgA) и токсичности препаратов данной группы. Было высказано предположение, что для понимания наблюдаемого биологического действия лигандов достаточно информации о форме и электростатическом поле их молекул, а также об их характеристиках, сопутствующих транспортировке к мишени, повсеместно используемых в QSAR. Таким образом, было решено остановить свой выбор на двух дескрипторах: коэффициенте распределения lg(p) вещества в системе октанол-вода и  $\epsilon^0$ (НСМО), значении энергии нижней свободной молекулярной орбитали. Уравнение для интерпретации, полученное методом наименьших квадратов, физиологической активности замещенных адамантанов принимает вид:

$$\lg A = -0,054(\pm 0,021) * \lg(p) + 0,0199(\pm 0,0069) * \epsilon^0 + 1,3189(\pm 0,1433) \quad (1)$$

Дальнейший математический расчет показал наличие таких параметров, как среднее квадратичное отклонение  $s=0,0186$ ; коэффициент корреляции  $r=0,937$ ; коэффициент детерминации  $r^2=0,878$ ; критерий Фишера  $F=43,175$ ; объясненная дисперсия  $v=0,9898$ , при объеме выборки  $n=15$ . Распределение lg(p) (J.Chem. Inf. Comput. Sci., 27, 21 (1987)) вещества в системе октанол-вода и  $\epsilon^0$ (НСМО) (привлечен метод квантовой химии Extended Hückel MO, что обеспечивает довольно точное воспроизведение относительного порядка и строения MO молекул), рассчитывались в рамках пакета Chem3D Ultra 10.0. Само уравнение обладает предсказательной способностью, так как представляет собой подобие фильтра, позволяющего уже на ранних стадиях исследования химические соединения отсеять те, вероятность которых стать лекарством сравнительно невелика.

Исходный набор данных охватывает достаточное число соединений во избежание корреляций, которые носят нестатистический характер. Статистическая значимость модели определяется набором исходных данных, содержащим пять-шесть соединений на одну степень свободы в уравнении регрессии. Каждый из физико-химических параметров (полученных простыми, но достаточно точными способами вычисления), включенных в уравнение регрессии, изменяется в достаточно широком интервале значений. Каждая введенная в модель переменная проверена на статистическую значимость.

**Литература**

1. Морозов И.С., Петров В.И., Сергеева С.А. (2001) Фармакология адамантанов. - Волгоград: Волгоградская мед академия. - 320 с.
2. Кубиньи Г. (2006) В поисках новых соединений-лидеров для создания лекарств // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева), т. L, № 2.

**Выделение шаперонина TRiC и поиск его новых белковых субстратов<sup>1</sup>****Попова К.М.<sup>2</sup>***Студентка**Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова, Факультет  
Биоинженерии и Биоинформатики, Москва, Россия**E-mail: kristina.fbb@gmail.com*

Шаперонин TRiC (TCP-1 Ring Complex) осуществляет сворачивание ряда белков в цитоплазме эукариотических клеток. Хотя изначально предполагалось, что данный шаперонин осуществляет лишь фолдинг белков цитоскелета, таких как актин и тубулин, количество других известных субстратов TRiC постоянно увеличивается. На настоящий момент известно, что TRiC взаимодействует примерно с 10% всех синтезируемых в цитоплазме белков. На первом этапе работы были проанализированы представленные в литературе данные относительно источников, в которых количество изучаемого шаперонина было наибольшее. Оказалось, что одним из них являются семенники. Ранее в нашей лаборатории было показано, что субстратами для шаперонина Tric, кроме уже известных актина и тубулина, также является, по крайней мере, один из ферментов гликолиза – лактатдегидрогеназа. Кроме этого, было продемонстрировано связывание денатурированной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД), выделенной из скелетных мышц кролика, с TRiC. Продолжая ранее проведенные исследования, виделось целесообразным определить субстраты для данного шаперонина, которые могут присутствовать в цитоплазме клеток семенников. Поэтому, следующим объектом изучения стала сперматозоидная глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД-С). Для получения фермента мы использовали клетки E.coli, трансформированные плазмидой, содержащей ген, кодирующий ГАФД-С, у которого на месте N-концевого домена, при помощи которого он крепится к фиброному слою, был «пришит» гидрофобный хитин-связывающий домен. Таким образом, полученный фермент являлся аналогом сперматозоидного. В первую очередь, мы инкубировали нативную ГАФД-С с TRiC, для того чтобы определить возможность взаимодействия шаперонина с гидрофобным хвостом. Было показано, что в процессе инкубации изменения активности не происходило, что, вероятно, говорит об отсутствии связывания. Для исследования возможности взаимодействия денатурированной ГАФД-С с шаперонином и ее фолдинга, мы денатурировали фермент в присутствии 4 М GdHCl. В процессе инкубации отбирали аликвоты для измерения ферментативной активности ГАФД-С. Было показано, что в течение 5-6 часов белок полностью терял свою активность. Для инициации рефолдинга денатурированный фермент разводили в 100 раз буфером для реактивации и следили за восстановлением активности. Нами было показано, во-первых, что денатурированная ГАФД-С взаимодействует с Tric, а, во-вторых, уровень реактивации ГАФД-С в присутствии шаперонина превышает уровень спонтанной в 3 раза. Мы предполагаем, что представленные результаты, а также проведенные нами ранее опыты по реактивации ГАФД, выделенной из мышц кролика, могут служить одним из доказательств гипотезы относительно вовлечения данного шаперонина в формирование фиброного слоя хвостов сперматозоидов и «прикрепления» ГАФД-С к нему. Наши эксперименты могут также объяснить высокую концентрацию TRiC именно в семенниках, хотя такого рода предположения, конечно, требуют дальнейших экспериментальных исследований и доказательств.

---

1 Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках грантов РФФИ (№ 08-04-00231, 08-08-00540, 09-04-01122), Госконтракт № 02.512.11.2249 и NATO (PDD(CP)-(CBP.NR.RIG 982779)

2 Автор выражает признательность к.б.н. Налетовой И.Н. за неоценимую помощь в подготовке материалов по теме доклада.

**Изучение связывания катионов с аптамером к тромбину 15-ТВА****Рассохина О.И.**

Студентка

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия**E-mail: orassokhina@gmail.com*

Аптамеры – это искусственно найденные с помощью метода SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) олигонуклеотиды, обладающие высоким сродством к белковым мишеням. Одним из наиболее перспективных аптамеров для разработки современных лекарственных препаратов является 15-звенный ДНК-аптамер 15-ТВА, эффективно ингибирующий тромбин – сериновую протеазу, играющую ключевую роль в регуляции системы гемостаза.

15-ТВА имеет следующую последовательность: d(GGTTGGTGTGGTTGG), и образует квадруплексную структуру. Два G-квартета в его структуре соединены одной T-G-T и двумя T-T петлями. Известно, что различные катионы, в том числе  $K^+$ , стабилизируют квадруплексную структуру аптамера. Исходя из организации в пространстве нуклеотидной цепи, возможна реализация нескольких наиболее вероятных положений катионов внутри структуры 15-ТВА. Однако современные экспериментальные методы не позволяют напрямую установить местонахождение катиона в комплексе с 15-ТВА.

Общей задачей настоящей работы является установление геометрии и устойчивости комплексов аптамера с катионами с использованием экспериментальных и вычислительных методов.

Методами молекулярной динамики была изучена стабильность квадруплексной структуры 15-ТВА в отсутствие координирующих катионов. Были взяты полученные методом РСА и ЯМР структуры аптамера, различающиеся ориентацией нуклеотидной цепи. В результате было показано, что ЯМР-ориентация цепи в структуре аптамера при 0°С стабильна, что соответствует литературным данным.

В качестве основного экспериментального метода была выбрана изотермическая титрометрическая калориметрия (ИТС), позволяющая установить стехиометрию и термодинамические эффекты связывания катиона с 15-ТВА. С ее помощью было проведено последовательное титрование 15-ТВА ионами  $K^+$  и  $Ba^{2+}$ . Оказалось, что связывание аптамера с  $Ba^{2+}$  более устойчивое, и последующее связывание иона  $K^+$  невозможно, тогда как образующийся комплекс 15-ТВА с  $K^+$  связывает дополнительный ион  $Ba^{2+}$  с положительным энтропийным эффектом и высокой константой связывания.

Таким образом, в структуре 15-ТВА возможно наличие различных сайтов связывания ионов, и для их дальнейшего изучения выбраны мутанты исследуемого аптамера по одной из нижних и по верхней петле. Мутант по верхней петле (15-ТСТ) связывается с  $Ba^{2+}$ , но с  $K^+$  не происходит связывания как чистого 15-ТСТ, так и комплекса 15-ТСТ с  $Ba^{2+}$ .

Сравнительное изучение 15-ТВА и 15-ТСТ методом кругового дихроизма (КД) в 5 мМ растворе KCl показало, что температура плавления 15-ТСТ (23°С) ниже 15-ТВА (35°С). При этом анализ интенсивности пиков спектров КД показал, что пик в структуре 15-ТСТ выше. Экспериментальные данные позволяют предположить роль гуанина в TGT петле как запирающего калий элемента в квадруплексе. Это предположение также подтвердилось при изучении методом молекулярной динамики.

Дальнейшее изучение комплексов 15-ТВА с катионами важно для детального представления о структуре объекта и поможет в определении оптимальных условий связывания аптамера с тромбином.

Работа поддержана грантами РФФИ №08-04-01244а и Миннаука «Государственный контракт №02.512.11.2242»

**Аффинная модификация белка MutS ДНК-дуплексами, содержащими  
2'-йодацетамидную группировку<sup>1</sup>  
Секерина С.А.<sup>1</sup>, Хайнце Р.<sup>2</sup>**

*аспиранты*

<sup>1</sup>*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет  
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия*

<sup>2</sup>*Институт биохимии, Гиссен, Германия*

*E-mail: sveta-0685@rambler.ru*

Белок MutS является ключевым звеном в системе репарации неканонических пар ДНК (мисматчей). Имеются предположения, что MutS сканирует ДНК до тех пор, пока не обнаружит мисматч, затем он меняет свою конформацию и инициирует ряд взаимодействий между компонентами системы репарации. Остается открытым вопрос о механизмах связывания MutS с ДНК и с другими белками системы репарации. Образующиеся межмолекулярные комплексы часто характеризуются низким сродством компонентов или коротким временем жизни. Плодотворным путем преодоления трудностей изучения подобных систем является необратимая фиксация биомолекул.

Задачей данной работы являлось получение ковалентных комплексов белка MutS с ДНК-дуплексами, как содержащими, так и не содержащими некомплементарную GT-пару. В качестве реакционноспособных ДНК-лигандов нами предложено использовать дуплексы, содержащие в своем составе единичную 2'-йодацетамидную функцию. Такие соединения способны избирательно реагировать с остатком цистеина белка, сближенным с активной группировкой в составе ДНК-белкового комплекса [1].

Для выбора места модификации в цепи ДНК, а также тех аминокислотных остатков MutS, которые нужно подвергнуть замене на цистеин, нами была проанализирована структура комплекса MutS с ДНК, содержащей неканоническую пару оснований (PDB-код 1E3M). Для получения ковалентно связанных ДНК-белковых комплексов наиболее перспективными являются две мутантные формы MutS - N497C и N468C. Эти белки были сконструированы на основе мутантного белка cf MutS, не содержащего остатков цистеина. Нами оптимизированы условия экспрессии и выделения белка MutS и его мутантных форм.

Исходными соединениями для получения 2'-йодацетамидных производных ДНК служат олигонуклеотиды, содержащие 2'-аминогруппу в заданном положении олигонуклеотидной цепи. Нами синтезированы семь 2'-аминосодержащих олигонуклеотидов, отличающихся первичной структурой и положением модифицированного звена, предположительно сближенного с позицией 497 или 468 MutS. Подобраны оптимальные условия постсинтетической обработки 2'-аминосодержащих интермедиатов ангидридом йодуксусной кислоты, продемонстрирована реакционная способность целевых соединений.

Белок cf MutS(N468C) эффективно взаимодействовал с 2'-йодацетамидными производными ДНК-дуплексов, содержащими и не содержащими мисматч. Белок cf MutS(N497C) образовывал конъюгат только в случае дуплекса с неканонической парой оснований, что, возможно, связано с отсутствием контакта этой аминокислоты с ДНК при неспецифическом связывании.

1. Борисова О.А., Романенков А.С., Метелев В.Г., Кубарева Е.А., Зубин Е.М., Тимченко М.А., Орецкая Т.С. (2003) ДНК-дуплексы, содержащие 2'-дезоксид-2'-йодацетамидоурин, как реагенты для аффинной модификации белков // Молекулярная биология, том 37, №2, с. 1-9.

---

1 Работа выполнена при поддержке программы РФФИ-ННИО «Международные исследовательские группы с участием молодых ученых» (гранты 08-04-91973 ННИОМ\_а и IRTG GRK 1384).

## Термодинамика взаимодействия амфифильных диметилсилоксан-содержащих сополимеров с липидными мембранами

**Семенюк П.И.**

Студент

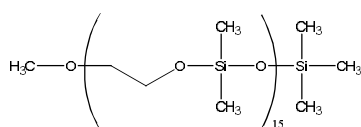
*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия*

*E-mail: psemenyuk@belozersky.msu.ru*

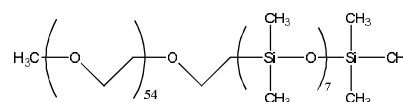
Известно, что амфифильные полимеры, в частности сополимеры этилен- и пропиленоксида, способны понижать лекарственную устойчивость раковых клеток [1]. Показано, что этот эффект связан с возмущением жидкокристаллической структуры фосфолипидного бислоя в результате встраивания в него полимера [2]. В данной работе исследовано взаимодействие с мембраной сополимеров иного типа, содержащих в качестве гидрофобного блока полидиметилсилоксан. Недавно было показано, что такие сополимеры также влияют на резистентность раковых клеток к химиотерапии. В настоящей работе изучено влияние сополимеров на основе силоксана на липидный бислой.

С использованием калориметрии изотермического титрования (ИТС) показано, что чередующийся и блочный сополимеры диметилсилоксана и этиленоксида связываются с бислоем. Определены коэффициенты распределения полимеров между буферным раствором и липидной мембраной. При этом оказалось, что коэффициент распределения блочного сополимера между водной и липидной фазами равен 22, что на 2-3 порядка меньше коэффициентов распределения классических детергентов. В то же время чередующийся сополимер характеризовался в 20 раз более высоким коэффициентом распределения. Методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (DSC) изучены термодинамические перестройки в мембране, происходящие вследствие связывания сополимера. Обнаружено, в частности, что встраивание в мембрану блочного сополимера приводит к значительному понижению кооперативности плавления бислоя.

В ближайшее время планируется исследовать механизм связывания сополимеров с фосфолипидным бислоем с использованием метода симуляции молекулярной динамики.



Чередующийся сополимер



Блочный сополимер

### Литература

1. Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VY. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, vol. 54(5), pp. 759 – 779.
2. Krylova OO, Melik-Nubarov NS, Badun GA, Ksenofontov AL, Menger FM, Yaroslavov AA. *Chem. Eur. J.*, 2003. vol. 9(16), pp. 3930 – 3936.
3. Павлов ДН, Дородных ТЮ, Заборова ОВ, Мелик-Нубаров НС. *Высокомолекулярные Соединения*, 2009, том 51(3), сс. 428 – 435.

**Протонофорное действие грамицидина А, модифицированного заряженными аминокислотами по N-концу**

**Сорочкина А.И.**

*Студентка*

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет  
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия*

*E-mail: alex.sorochkina@gmail.com*

Грамицидин А представляет собой линейный пептид из 15 гидрофобных аминокислот. При взаимодействии с бислойными липидными мембранами он образует канал, обладающий селективной проницаемостью для протонов и других одновалентных катионов. Механизм образования канала – димеризация грамицидина способом голова-к-голове путем взаимодействия N-концов. Данное свойство грамицидина позволяет использовать его в качестве антибиотика, вызывающего индукцию ионной проводимости при встраивании в цитоплазматическую мембрану бактерий и следующую за этим деполяризацию мембраны.

Считается, что введение заряженной группы на N-конец грамицидина приводит к подавлению его каналоформерных свойств благодаря ограничениям в образовании димера. Ранее было показано, однако, что дес-формил-грамицидин обладает значительным протонофорным действием как на митохондриях, так и на искусственной мембране. В настоящей работе изучалось протонофорное действие производных грамицидина А: [Lys1]gA, [Lys3]gA, [Glu1]gA, [Glu3]gA на искусственных мембранах (плоская бислойная мембрана и липосомы), а также на митохондриях.

Все производные обладали способностью образовывать протонные каналы на БЛМ при измерении тока в условиях концентрации протонов 100 мМ. Свойства каналов были сходны с таковыми для немодифицированного грамицидина, причем эффективные концентрации катионных производных примерно на два порядка превышали таковые анионных производных. Протонную проводимость на липосомах также вызывали все пептиды.

Катионные производные также обладали способностью вызывать неспецифическую утечку флуоресцентного красителя из липосом, предположительно, путем образования больших неселективных пор-агрегатов. Была показана утечка нескольких красителей: пиранина, сульфородамина В, а также доксорубицина. Способность катионных производных вызывать утечку рН-зависимого красителя пиранина, использовавшегося для изучения протонофорной активности пептидов на липосомах, затруднила изучение их способности к образованию собственно протонных каналов на липосомах.

Данные об утечке красителя из липосом, а также об ионофорном действии пептидов на митохондрии были получены как измерением флуоресценции от всего объема суспензии, так и с использованием флуоресцентной корреляционной спектроскопии. Для анализа связывания флуоресцентного красителя с митохондриями использовался метод анализа интенсивности пиков.

При добавлении к суспензии выделенных митохондрий три производных проявили ионофорную активность примерно с той же эффективностью, что и немодифицированный грамицидин А. Исключением стал [Glu1]gA, чье действие было выражено значительно сильнее. Планируется продолжить изучение протонофорного действия [Glu1]gA с целью выявления его повышенного разобщающего действия.

1. Bezrukov, S.M., A.I. Irkhin, and E. Melnik. Desformylgramicidin a proton selective channel. *Biol. Membrany*. (1984) 1:659-665.

2. Perevoshchikova, I.V, Zorov, D.B, and Antonenko Y.N. Peak intensity analysis as a method for estimation of fluorescent probe binding to artificial and natural nanoparticles: tetramethylrhodamine uptake by isolated mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. (2008) 1778(10):2182-90.

**Применение капиллярного гель-электрофореза в микрочипе для изучения ДНК/РНК-белковых комплексов<sup>1</sup>****Турчанинов Т.Р.***Студент*

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия  
E-mail: tturchaninov@yandex.ru*

Капиллярный гель-электрофорез – мощный, активно развивающийся метод, одна из областей применения которого - изучение ДНК, РНК, белков, а также их комплексов. Благодаря развитию микрофлюидных технологий стало возможным перевести процесс электрофоретического разделения в формат микрочипа. Это позволяет автоматизировать процесс, сократить время анализа, повысить воспроизводимость и чувствительность метода. Малая длина капилляра при оптимальной скорости прохождения образца уменьшает побочные эффекты, связанные с влиянием приложенного электрического поля, что особенно важно при анализе комплексов биополимеров.

Нами были оптимизированы условия при исследовании стабильности комплексов аптамерных ДНК с тромбином на ДНК-микрочипе с использованием прибора автоматизированного электрофореза Exregion компании Bio-Rad. При использовании буфера 10 мМ Трис-НСI, 1 мМ ЭДТА (рН 7,5) происходило разделение комплекса и свободной ДНК, что позволило построить изотермы связывания для ряда аптамеров. Линеаризацией в координатах Скэтчарда были получены кажущиеся константы связывания.

Другой объект изучения – РНК-белковые комплексы, которые образуются при связывании бактериального рибосомного белка S7 с фрагментами рРНК и мРНК. С применением РНК-микрочипа впервые было показано влияние различных условий отжига РНК и концентрации ионов  $Mg^{2+}$  на изменение конформационного ландшафта РНК, а также унификации структуры РНК при взаимодействии с белком S7.

---

<sup>1</sup> Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках грантов РФФИ-а 07-04-01034, 08-04-01244, Роснаука 02.512.11.2242

## Гидролиз сложных эфиров 1,4-бенздиазепин-2-она карбоксиэстеразами печени свиньи

*Шестеренко Е.А., Демиденко А.В., Семенюшина Е.А.*

*аспирантка, студентка, сотрудница*

*Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины, Одесса, Украина*

*E-mail: ashesterenko@gmail.com*

Карбоксилэстеразы (КФ 3.1.1.1) млекопитающих – сериновые гидролазы широкого спектра действия, катализирующие гидролиз эфирной и амидной связей в молекулах структурно отличных соединений, в том числе лекарственных препаратов, обладают широкой субстратной специфичностью и высокой стереоселективностью, благодаря чему являются перспективными катализаторами стереоселективного гидролиза и синтеза.

Цель данной работы – исследование гидролиза сложных эфиров 1,4-бенздиазепин-2-она выделенным частично очищенным препаратом карбоксилэстераз печени свиньи (КЭПС).

Микросомальную фракцию (МФ) выделяли методом низкоскоростной седиментации (10000 g) в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ; замена солюбилизации МФ дезоксихолатом Na на экстракцию 0,1 моль/дм<sup>3</sup> раствором пирофосфата Na с последующим фракционированием  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (45-70 % насыщения) позволила повысить выход по белку и эстеразную активность препарата КЭПС в 10,9 и 3,9 раз, соответственно, в сравнении известными методами Kato R.; Nilsson O. and Dallner G. Показано, что экстракция осадка (фракция 0-45 % -ного насыщения) привела к увеличению суммарной эстеразной активности препарата на 26 %, составившую 148,7 мкмоль  $\alpha$ -нафтола/мг белка·мин.

Изучение фракционного состава методом SDS-электрофореза в 10 %-ном ПААГ показало наличие 26 белковых фракций, которые можно объединить в 4 зоны. 1 и 2-я зоны ( $R_f$  0,92-0,51; М.м. 14,4 $\pm$ 3,0 - 41,7 $\pm$ 4,5 кДа) представлены балластными белками и продуктами деградации, белки наиболее выраженной 3-й зоны ( $R_f$  0,45-0,23) с М.м. 52,5  $\pm$  5,8 – 69,3  $\pm$  7,6 кДа (43,1 %) могут соответствовать субъединицам  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  молекулы карбоксилэстеразы. 4-я зона ( $R_f$  0,22-0,10; М.м. 82,2 $\pm$ 10,0 – 300,0 $\pm$ 36,0) представлена продуктами агрегации молекул КЭПС и балластных белков.

Методом нативного электрофореза в ПААГ показано, что 11 белковых фракций (73 % общего белка) ферментного препарата обладают выраженной эстеразной активностью.

Доказательством природы выделенного фермента является выявленное полное ингибирование эстеразной активности (0,25 ед) селективным ингибитором КЭПС ди-(*n*-нитрофенил)фосфатом (180,2 мкмоль/дм<sup>3</sup>).

Выделенный препарат КЭПС в разработанных условиях (рН 8,0, t 37 °С,  $\tau$  2,5 час) катализировал гидролиз сложных эфиров: 3-метил- (I), 3-этил- (II), 3-пентил- (III), 3-гексил- (IV), 3-гептилкарбонилокси-7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она (V), с образованием в качестве конечного продукта 7-бром-3-гидрокси-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она, структура которого подтверждена комплексом физико-химических методов: ТСХ, УФ-спектроскопии, масс-спектрометрии.

Гидролитическая активность КЭПС в отношении сложных эфиров 1,4-бенздиазепин-2-она отличается; так, степень трансформации соединений III, IV, V составила 53, 2 %, 48,1 % и 46,1 %, соответственно, в то время как I и II гидролизуются в этих же условиях на 38,3 % и 44,0 %, что свидетельствует о большей специфичности карбоксилэстеразы микросомальной фракции печени свиньи к исследованным субстратам с длиной углеродной цепи ( $\text{C}_5$ - $\text{C}_7$ ) ацильного фрагмента.



**Способ разделения фенольных соединений с помощью иммобилизованной тирозиназы*****Agaricus bisporus***  
**Шестеренко Ю.А.**

аспирантка

Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины, Одесса, Украина

E-mail: shesterenko@mail.ru

Разработан новый способ разделения фенольных соединений, основанный на способности тирозиназы (ТИР), фермента класса оксидоредуктаз, катализировать селективное окисление производных фенола и 1,2-диоксибензола, не подвергая биоконверсии производные 1,3- и 1,4-диоксибензола, а также нитрофенолы.

Однако применение ТИР ограничено высокой стоимостью коммерческих препаратов, нестабильностью, однократностью применения, поэтому целесообразно получение частично очищенных иммобилизованных ферментных препаратов.

Из грибов *Agaricus bisporus* была выделена ТИР с выходом белка 0,67 мг/г грибов, содержанием ионов меди 0,19 % и удельной активностью 500 ед/(мг белка·мин).

Препарат ТИР был иммобилизован в поли-N-винилкапролактаме (концентрация ПВК 7 %, t 40 °С). В качестве гранулообразователя использовали производные 1,3- и 1,4-диоксибензола и нитрофенолы, не трансформирующиеся в присутствии фермента, при этом образуют водородные связи с карбонильными группами ПВК (ИК-спектроскопия), что приводит к созданию прочных, стабильных гранул.

О наличии взаимодействия ТИР с носителем свидетельствует изменение характеристической вязкости. Иммобилизация фермента осуществляется как за счет образования водородных связей между карбонильными группами ПВК и гидроксильными группами аминокислотных остатков, так и благодаря механическому включению фермента в сетку полимера, стабилизированного добавлением не окисляемого производного фенола.

Известно, что фенолы, не являющиеся субстратами ТИР, оказывают на фермент ингибирующее действие, что приводит к значительному увеличению количества фермента, необходимого для окисления субстратов тирозиназы.

Установлено, что иммобилизация фермента в ПВК частично защищает его от ингибирующего влияния производных 1,3- и 1,4-диоксибензола и нитрофенолов, что способствует увеличению активности в 2-3 раза по сравнению со свободным ферментом.

Следствием иммобилизации также явилось повышение устойчивости препарата ТИР к неблагоприятному воздействию высоких температур, о чем свидетельствует уменьшение константы термоинактивации:  $k_{ин}$ : для свободной и иммобилизованной формы составляют  $1,87 \cdot 10^{-2}$  и  $0,58 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$ , соответственно.

Показано, что полученный биокатализатор осуществлял селективное окисление производных фенола и 1,2-диоксибензола (0,5-10 ммоль/дм<sup>3</sup>) с количественной степенью биоконверсии в присутствии производных 1,3- и 1,4-диоксибензола, а также нитрофенолов (35-56 ммоль/дм<sup>3</sup>) на протяжении 4-х циклов в реакторе периодического действия.

В процессе окисления фенолов, катализируемого ТИР, образуются растворимые темно-окрашенные олигомеры (М.м. 300-600 Да), для их удаления используют дорогостоящие полимеры природного и синтетического происхождения, однако их применение в ряде случаев не позволяет полностью удалить продукты реакции.

Нами был разработан эффективный способ элиминации продуктов биоконверсии с применением неорганических коагулянтов: алюмокалиевых, алюмоаммонийных и железоаммонийных квасцов, причем концентрации коагулянтов, необходимые для удаления продуктов трансформации фенола с использованием иммобилизованного фермента, снижаются по сравнению с таковыми для свободной ТИР, что, по-видимому, связано с частичным накоплением продуктов окисления фенола в гранулах биокатализатора.

**Изучение структуры двухмодульного аптамера к тромбину методом кругового дихроизма.**

**Юминова А.В.<sup>1</sup>**

*студент*

*Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Факультет  
Биоинженерии и Биоинформатики; Москва, Россия*

*E-mail: yumalina@yandex.ru*

Среди аптамерных ингибиторов тромбина найден 31-звенный ДНК-аптамер с высоким протромбиновым временем. Из его первичной структуры следует, что он может иметь двух модульную структуру: формировать структуру типа G-квадруплекса, а его концы могут образовывать дуплекс. G-квадруплекс имеет характерный спектр кругового дихроизма.

Исследована температурная зависимость стабильности G-квадруплексных структур аптамеров к тромбину, а также изменение структуры 31ТВА в присутствии комплементарного олигонуклеотида.

Показано, что 31ТВА имеет структуру G-квадруплекса в присутствии ионов  $K^+$ .

Введенные мутации нуклеотидов в петли не мешают сборке G-квадруплекса.

Работа поддержана грантами РФФИ №08-04-01244-а и Миннауки №02-512-11-2242

---

<sup>1</sup> Автор выражает благодарность научному руководителю Спиридоновой В.А.