

Подсекция «Биофизика, нанобиотехнологии и биоинженерия»

Биоинженерия

Устные доклады

Изучение структуры и динамики липидных рафтов методом молекулярного моделирования

Боздаганян Маринэ Евгеньевна

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия
marine@bozdaganyan.com*

Мембрана клетки состоит из различных типов липидов, образующих бислои. Такая многокомпонентная смесь отличается сложным поведением. В клеточных мембранах были зарегистрированы протяженные липид-белковые «острова» (рафты) размером порядка 200 нм. Большой интерес к исследованию рафтов связан с тем, что они играют важную роль в протекании многих процессов клетки, например, в передаче сигналов.

Экспериментальные методы изучения мембран не позволяют наблюдать рафты *in vivo*. Однако на искусственных мембранах было выявлено, что при физиологическом содержании холестерина в мембране (10–30%), формируется макроскопические домены насыщенных и ненасыщенных липидов, состоящие из двух фаз – жидко-упорядоченной и жидко-неупорядоченной. Рафт содержит, как правило, холестерин и насыщенные липиды, «нерафтовая» фаза – ненасыщенные липиды и меньшую концентрацию холестерина.

Цель работы – изучить микроструктуру рафта и его поведение при помощи метода молекулярной динамики. Для этого была собрана и параметризована в силовом поле GROMOS система следующего состава: POPC (липид с одной ненасыщенной связью), сфингомиелин, холестерин в соотношении 3:2:2 соответственно. Рафт из холестерина и сфингомиелина был сформирован в центре мембраны, степень гидратации липида – 30, количество липидов в системе – 2048, диаметр рафта – 10 нм. Изучены основные характеристики мембраны: распределение плотностей атомов, параметры порядка, площади липидных головок. Особое внимание уделено исследованию структуре рафта: взаимодействию двух монослоев между собой, а также межмолекулярным взаимодействиям между сфингомиелинами и холестерином.

Исследование комплексов антибиотиков актиномицинового типа с ДНК методом молекулярной динамики

Волох Олеся Игоревна

*МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биоинженерии, Москва, Россия
olesyavolokh@gmail.com*

Применение антибиотиков актиномицинового ряда для лечения инфекционных и опухолевых заболеваний основано на способности актиномицинов формировать специфический устойчивый комплекс с ядерной ДНК (молекула-интеркалятор) и ингибировать этим РНК-полимеразную реакцию, в результате чего подавляется синтез белка и клеточное деление. Основным ограничением применения актиномицинов, как и всех химиотерапевтических средств, является их высокая токсичность и неизбирательность проникновения в клетки, поэтому существенное значение приобретает направленная модификация актиномицинов с целью повышения их эффективности и снижения токсичности. В данной работе проводилось сравнительное изучение эффективности связывания с ДНК актиномицина и двух его аналогов: 7-аминоактиномицина и 7-гидроксиактиномицина. В качестве критерия оценки эффективности связывания выступала свободная энергия связывания антибиотика с фрагментом ДНК.

Для исследования комплексов применялся метод молекулярной динамики. С помощью программного пакета Gromacs 4.5.3 double precision методом термодинамического интегрирования рассчитывались свободные энергии комплексов актиномицина и двух его

аналогов с ДНК. Комплексы аналогов актиномицина с ДНК получены путем модификации исходной структуры. Поведение комплексов было проверено на адекватность предварительно путем расчета модуля Юнга для ДНК: рассчитанные значения модуля Юнга для ДНК по порядку величины коррелируют с экспериментальными данными по порядку величины $\sim 10^9$ Па. В результате произведенных вычислений было установлено, что по убыванию свободной энергии связывания можно расположить актиномицины в следующем порядке: немодифицированный актиномицин, 7-гидроксиактиномицин, 7-аминоактиномицин. В работе было показано, что свободная энергия связывания 7-аминоактиномицина с ДНК существенно ниже, чем у гидрокси – замещенного аналога и немодифицированной молекулы АМ. Вероятно, больший вклад аминогруппы по сравнению с гидроксилем обусловлен большими значениями энергий и количеством образуемых дополнительных водородных связей. На основании полученных данных можно утверждать, что для достижения одного и того же терапевтического эффекта можно взять существенно меньшее количество 7-аминоактиномицина, чем его гидрокси-замещенного аналога или немодифицированного антибиотика, что позволяет снизить токсический эффект препарата и ослабить его побочные эффекты. Соответствующий подход оценки эффективности вводимых заместителей в молекулу-мишень до проведения эксперимента *in vitro* позволяет исследователям экономить время и ресурсы.

Подбор условий для экспрессии и очистки рекомбинантного сNBD домена потенциал-зависимого ионного канала Kv10.2

Глухов Григорий Сергеевич, Карлова Мария Георгиевна

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет,
Москва, Россия
gluhovg@gmail.com*

Потенциалзависимые K⁺ - каналы играют важную роль в самых разных проявлениях электрической активности клеток. Активация этих каналов определяет фазу реполяризации потенциала действия и развитие гиперполяризации: они обеспечивают ритмоводящую функцию ряда возбудимых клеток. Разнообразные потенциалзависимые K⁺ - каналы различаются зависимостью от потенциала, способностью инактивироваться, кинетикой активации и инактивации, фармакологическими особенностями. В состав каналов входят различные внеембранные домены, участвующие в регуляции активности каналов.

В данной работе выделяли сАМФ связывающий домен потенциал-зависимого канала Kv10.2 и очищали методами аффинной хроматографии.

Для подбора условий для очистки сNBD домена были опробованы различные способы выделения и очистки, различные условия и буферы, в которых проводились реакции. Очистку гибридной конструкции проводили на Ni-колонки. Для максимально эффективной очистки подбирались оптимальные концентрации имидазола для промывки и элюции гибридной конструкции. Для получения свободного домена сNBD использовали протеазу. Для максимального протеолиза подбирали температуру, состав буфера и время действия. Очистку свободного домена сNBD от аффинных тагов производили на амилозной колонке.

В ходе работы экспрессирована гибридная конструкция, содержащая сNBD и аффинные таги, гибридная конструкция очищена на Ni-колонке. Подобраны оптимальные условия для отщепления аффинных тагов протеазой. Получен свободный домен сNBD.

Изучение механических свойств нормальных и раковых клеток с помощью АСМ

Ефремов Ю.М., Докрунова А.А.

*МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет
119991, Москва, Ленинские горы д.1, стр. 73
yu.efremov@gmail.com*

Механические свойства клеток играют ключевую роль в процессах, затрагивающих клеточные движения. Для многих раковых клеток показано, что они более деформируемы, чем нормальные, и примерно на 70% мягче. Предположительно, особые механические свойства

раковых клеток играют важную роль в метастатических процессах и могут быть использованы как маркер метастатического потенциала.

В работе для измерения модуля Юнга применен метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) с использованием кантилеверов, модифицированных микросферами. Это позволяло лучше контролировать геометрию контакта зонда с образцом и получать значения модуля Юнга, усредненные по относительно большой (~30 мкм²) контактной площадке. Сопоставлены значения модуля Юнга нормальных и раковых клеток, а также исследованы эффект инактивации одного из факторов нуклеации актина – формина – на модуль Юнга нормальных и раковых клеток и их жизнеспособность. В экспериментах были использованы эпителиальные клетки рака простаты DU-145, PC3, PC3-MM2 и LNCap, а также клетки Vero из эпителия почки африканской зеленой мартышки.

Измеренный нами модуль Юнга клеток Vero составляет ~2 кПа, что хорошо соответствует данным предыдущих исследований нераковых клеток. У раковых клеток модуль Юнга значительно меньше (на ~50%). После инкубации клеток Vero с 2 мкМ раствором ингибитора формина SMIFH2 в течение 14 часов, их модуль Юнга уменьшился на ~50%. С помощью конфокальной микроскопии было выявлено, что в клетках, подвергшихся воздействию SMIFH2, число актиновых филаментов уменьшилось и они, в основном, были сосредоточены у основания клетки. У этих клеток также наблюдалось увеличение числа мелких филоподий. На раковые клетки значительного влияния SMIFH2 обнаружено не было.

Ранее было показано, что экспрессия формина в тканях рака простаты повышена по сравнению с нормальными клетками. Принимая во внимание тот факт, что уменьшение количества фибриллярного актина часто наблюдается в раковых клетках, мы предполагаем, что формин в клетках рака простаты может быть инактивирован. Инактивация нуклеаторов актина, по-видимому, ведет к изменению эластических свойств раковых клеток.

Изучение модуляции потенциал-зависимого калиевого канала Kv1.2 липидным окружением

Касимова М.А., Делемотт Л., Тарек М., Шайтан А.К., Шайтан К.В.

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия
marina.kasimova@molsim.org*

Потенциал-зависимые ионные каналы (ПИК) – это трансмембранные белки, основной функцией которых является передача электрического сигнала в возбудимых клетках. В течение рабочего цикла ПИК переключаются между закрытым и открытым состояниями. Данный процесс, называемый гейтингом, регулируется величиной трансмембранного потенциала, и запускается движением особых спиралей (S4) сенсора напряжения относительно плоскости мембраны.

Процесс гейтинга ПИК регулируется липидным окружением. Одним из модуляторов работы ПИК является отрицательно-заряженный фосфолипид фосфатидилинозитол-(4,5)-бисфосфат (ФИФ2). Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что ФИФ2 стабилизирует открытое состояние некоторых ПИК. Так, при добавлении ФИФ2 к внутреннему слою мембраны в патч-кламп эксперименте, ток через ПИК увеличивается. И напротив, в отсутствие ФИФ2 потенциал-зависимый ионный ток практически не регистрируется. Совсем недавно было показано, что ФИФ2 может оказывать влияние на сенсор напряжения ПИК: при добавлении ФИФ2 замедляется процесс активации канала.

Несмотря на очевидную важность наблюдаемых эффектов, молекулярные механизмы, лежащие в их основе, остаются неизвестными. В настоящем исследовании мы попытались пролить свет на данный вопрос, применив метод молекулярного моделирования. В качестве объекта исследования был выбран потенциал-зависимый калиевый канал Kv1.2. Для двух состояний канала (открытого и закрытого) были построены системы, в которых белок был окружен кольцом из молекул ФИФ2 во внутреннем слое мембраны.

Было обнаружено, что в зависимости от состояния канала ФИФ2 взаимодействует с двумя различными сайтами. Первый сайт построен основными остатками сенсора напряжения; второй

сайт находится на конце трансмембранных спиралей, окружающих пору канала и образующих его ворота. В закрытом состоянии ФИФ2 связывается с первым сайтом и, таким образом, стабилизирует закрытое состояние канала. В открытом состоянии, спирали, окружающие пору канала, подходят ближе к мембране. Благодаря этому второй сайт становится доступен для взаимодействия с ФИФ2. Это, в свою очередь, приводит к стабилизации открытого состояния.

Механизмы селективного действия токсинов скорпионов на натриевые каналы: анализ методом молекулярной динамики

Коромылова А.Д.¹, Василевский А.А.², Полянский А.А.², Чугунов А.О.²

¹Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, биологический ф-т, каф. биоинженерии, Москва, ²Институт биоорганической химии им. академиков

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

anna.koromyslova@gmail.com

Одной из главных мишеней животных ядов являются потенциал-чувствительные Na⁺-каналы (ПЧНК) — интегральные белки мембраны клеток, селективно пропускающие ионы натрия и участвующие в проведении нервного импульса. При взаимодействии с каналом токсины скорпионов изменяют его проницаемость для ионов и, следовательно, потенциал на мембране. α -Токсины скорпионов действуют на т.н. третий рецепторный сайт на поверхности канала (S3–S4 петля домена IV α -субъединицы ПЧНК) и замедляют быструю инактивацию ПЧНК. α -Токсины из яда скорпионов разделяют на три группы по селективности действия: первые эффективны против млекопитающих («млекотоксины»), другие действуют на каналы насекомых («инсектотоксины»), третьи — сразу на обе группы животных (« α -подобные токсины»). Выяснение механизма этой селективности важно как для фундаментальных нейробиологических исследований, так и разработки новых инсектицидов на основе инсектотоксинов ядов скорпионов.

α -Токсины образованы двумя «доменами»: консервативной «сердцевинной», включающей $\beta\alpha\beta$ -мотив, и подвижным RC-доменом, состоящим из петли в области N-конца и C-концевого участка токсина. Анализ нормальных мод и внутренних движений показывает динамическую целостность RC-домена, особенно хорошо заметную у млекотоксинов, и сравнительную независимость его движений относительно консервативного ядра молекулы. Картирование свойств молекулярной поверхности выявило область, гидрофильную в группе млекотоксинов и гидрофобную в двух других группах. Эта область совпала с RC-доменом токсинов; в то же время, «сердцевинный» домен оказался неизменным с точки зрения гидрофобных свойств. Предположительно, гидрофобные и динамические свойства токсинов скорпионов отражают особенности организации сайтов связывания на рецепторной поверхности и определяют селективность действия этих пептидов. Основанный на аминокислотной последовательности анализ гидрофобных свойств внеклеточных петель ПЧНК насекомых и млекопитающих показывает консервативную организацию петель потенциал-чувствительного модуля D-IV, связывающих α -токсины всех типов. Гидрофобность петли P-S6 порового модуля D-I отличается между каналами млекопитающих и насекомых, что согласуется с различиями в гидрофобных свойствах RC-домена. Найденные закономерности подтверждают возможность того, что молекула токсина взаимодействует сразу с двумя доменами ПЧНК, консервативной частью связываясь с потенциал-чувствительным модулем D-IV, а варибельным RC-доменом — с петлей P-S6 порового модуля D-I. Направленный мутагенез цитохрома *c* лошади на основе данных моделирования АНИС-методом.

Островеерхова Т.В., Черткова Р.В., Некрасов А.Н.

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

tato-tato@list.ru

Цитохром *c* осуществляет перенос электрона от комплекса III к комплексу IV дыхательной цепи животных клеток. Согласно данным АНИС-метода (метода анализа

информационной структуры) цитохром *c* имеет единственный участок пониженной плотности ЭЛИС (элементов информационной структуры) первого ранга – ADD- сайт, имеющий, по нашему мнению, существенное значение для функционирования цитохрома *c* в дыхательной цепи.

На основе данных моделирования информационной структуры цитохрома *c* предложены мутации, локализованные на его ADD- сайте и направленные на снижение дыхательной активности белка. При использовании блока методов белковой инженерии были получены сконструированные рекомбинантные белки.

Ранее нами были получены мутантные варианты цитохрома *c* T78S/K79P, обладающий сниженной способностью к взаимодействию с комплексом III, и вариант I81Y/A83Y/G84N, обладающий сниженной способностью к взаимодействию с комплексом IV. Дополнительные расчёты АНИС-методом позволили сконструировать новые гены с заменами K79V/I81L/F82R и T78A/K79A/I81A/F82T. Мутантные гены были успешно экспрессированы в бактериальной системе и выделены в препаративных количествах. По результатам тестирования мутантных вариантов на митопластах печени крысы было обнаружено значительное снижение (более, чем на 91% по сравнению с цитохромом *c* дикого типа) способности обоих вариантов к взаимодействию с комплексом III. В присутствии варианта T78A/K79A/I81A/F82T также было обнаружено значительное снижение (на 86%) способности к взаимодействию с комплексом IV.

Таким образом, был исследован ряд мутантных вариантов цитохрома *c*. Вариант T78A/K79A/I81A/F82T обладает существенно сниженной способностью к взаимодействию одновременно с комплексами III и IV. По нашему мнению, повышение плотности ЭЛИС на ADD- сайте приводит к затруднению конформационных перестроек в белке. Торможение конформационной лабильности варианта T78A/K79A/I81A/F82T обуславливает снижение его электрон-транспортной активности, что и было продемонстрировано в экспериментах с его участием.

Сравнительный структурный анализ катион проводящих лиганд-зависимых ионных каналов

Попинако Анна Владимировна

Биологический факультет Московского Государственного Университета имени

М.В.Ломоносова, Россия, Москва

popinako@rambler.ru

Для каждого конкретного белка его структура - это основа понимания механизма его функционирования и взаимодействия с другими молекулами. Таким образом, сравнительное изучение пространственной структуры и динамики ионных каналов (ИК) прокариот и эукариот представляет общебиологический интерес, так как способствует пониманию общих механизмов работы каналов на молекулярном уровне. В работе приводится сравнительный структурный и динамический анализ пентамерных катион проводящих лиганд-зависимых ионных каналов прокариот (на примере структуры бактериального канала *Gloeobacter violaceus* с PDB ID 3EAM и его мутантных форм) и эукариот (на примере модели серотонинового 5-HT₃ рецептора *Homo sapiens* и структуры никотинового ацетилхолинового рецептора *Torpedo marmorata* с PDB ID 2BG9). Также выделяются общие структурно-функциональные особенности калиевых ионных каналов. Структурные данные сопоставляются с анализом молекулярной динамики и роли отдельных аминокислотных остатков на стабилизацию комплексов белок-лиганд и влияние на ионную селективность каналов.

Структурное выравнивание показало ряд сходств и отличий конформаций ЛЗИК прокариот и эукариот. Сравнение профилей эффективного радиуса поры для тех же структур выделило наиболее узкие регионы пор и аминокислотные остатки, соответствующие им. Как выявило множественное выравнивание аминокислотных последовательностей TM2 спиралей прокариот и эукариот данные аминокислотные остатки являются консервативными.

Проведенное моделирование методом молекулярной динамики эукариотического канала, прокариотического канала и его мутантной формы (с заменой консервативного треонина на лизин T268K) подтверждает важную роль консервативного треонина в катионном транспорте

для ЛЗИК. Анализ молекулярной динамики надмембранной части модели 5-HT₃ рецептора подтверждает высокую вероятность движения С-петли в присутствии лиганда, а также выявляет участие в комплексообразовании некоторых консервативных для рецепторов прокариот и эукариот аминокислотных остатков.

Теоретические расчёты проведены с помощью суперкомпьютерного кластерного комплекса МГУ «Ломоносов».

Исследование взаимодействия I-BAR доменов белков MIM и IRSp53 с отрицательно заряженной липидной мембраной методом молекулярной динамики

Станишневa-Коновалова Татьяна Борисовна, Левцова Ольга Владимировна

Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия
stanishneva@mail.ru

Эукариотические клетки обладают цитоскелетом, который позволяет им поддерживать или изменять свою форму, передвигаться, делиться, поглощать и выделять вещества и т. д. Все эти процессы осуществляются с помощью белков, регулирующих его динамику. Недавно открытые мультидоменные белки MIM (MTSS1) и IRSp53 обеспечивают взаимодействие между цитоскелетом и цитоплазматической мембраной, приводящее к формированию филоподий. Известно, что связывание с мембраной происходит с помощью I-BAR домена, однако точный механизм пока неизвестен. В этой работе взаимодействие I-BAR домена с мембраной изучалось методом крупнозернистой молекулярной динамики. Исследовались системы с различной ориентацией I-BAR домена к мембране и разным количеством доменов (от одного до шести димеров). Общее время динамики для каждой системы составляло около 500 нс.

Было показано, что в течение первых 30 нс динамики I-BAR домены связываются с отрицательно заряженной мембраной, тогда как с нейтральной мембраной связывания не происходит. В процессе динамики димер, изначально ориентированный С-концами к мембране, изменяет своё положение и поворачиваются к мембране N-концами. Сайты связывания липидов располагаются на дистальных участках димера, что согласуется с экспериментальными данными. Связывание димера с мембраной приводит к формированию локального изгиба, однако он остаётся нестабильным, что, предположительно, означает необходимость олигомеризации димеров для формирования стабильного изгиба. Мы не наблюдали проникновение N-концевого пептида в мембрану, что предполагалось ранее. Это может говорить о том, что для проникновения N-конца в мембрану необходимо локальное изменение липидной плотности.

Проведённое исследование говорит о том, в основе взаимодействия I-BAR домена с мембраной лежат электростатические взаимодействия отрицательно заряженных липидов с положительно заряженными аминокислотами; эти взаимодействия приводят к формированию локального отрицательного изгиба мембраны, однако для его стабилизации необходима олигомеризация димеров.

Разработка тест-системы для определения инвазивности клеток на основе биodeградируемых матриксов из фиброина и спидроина

Уласова Наталья Юрьевна

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Россия, Москва,
ulasova_n@mail.ru

Подвижность клеток является основной чертой нормальных и патологических процессов, определяя протекание эмбрионального развития, регенерации тканей, метастазирования при раке. Изучение подвижности разных клеточных линий на подложках из биосовместимых материалов, которые имитируют структуру здоровой ткани, необходимо для понимания характеристик, определяющих привлекательность таких имплантов для депонирования клеток, а также для сравнения инвазивности различных линий раковых клеток. Скорость инвазивности зависит от свойств подложки, по которой происходит перемещение клеток. В работах по

созданию биоискусственных органов в качестве подложки используют биополимеры и их производные (коллаген, желатин, хитозан и др.), которые образуют трехмерные каркасы (матрицы).

В нашей работе мы разработали простую тест-систему для определения подвижности клеток с использованием двух биополимерных матриц: на основе фиброина шелка и рекомбинантного белка паутины – спидроина.

Для изучения подвижности была сконструирована камера, в которой среда без сыворотки (верхняя) и с сывороткой (нижняя) разделялись матриксом толщиной 1,5-2 мм. Клетки после 14 часов без сыворотки наносили в верхнюю камеру и фиксировали скорость миграции через матрикс, определяя концентрацию клеток в нижней камере, через 14 и 24 часа. В экспериментах сравнивали подвижность двух линий клеток: эпителиальных клеток почки – линия Vero и линии раковых клеток простаты - Du145.

Сравнение подвижности двух исследованных линий клеток показало, что миграция сквозь фиброиновый матрикс происходит медленнее, чем через матрикс из спидроина, что, вероятно, определяется лучшими адгезивными свойствами матрикса из шелка. При этом раковые клетки мигрируют быстрее, чем контрольные, что объясняется их высокой инвазивностью.

Разработанная тест-система может использоваться для изучения инвазивности раковых клеток в экспериментах с белками - молекулярными маркерами рака.

Биофизика

Влияние ионного состава цитоплазмы на работу хлоропластов в перфузируемых клетках *Chara corallina*

Алова А.В.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносов, биологический факультет, кафедра биофизики, 119234, Москва, Воробьевы горы, д.1, aval945@mail.ru

На свету клетки харовых водорослей демонстрируют латеральную гетерогенность за счет неоднородной работы проводящих систем плазмалеммы. Это проявляется по сдвигам рН в апопласте между разными участками клетки, которые достигают 3.5 единиц. Также в этих клетках наблюдается пространственная неоднородность активности фотосинтеза по длине клетки. Профили флуоресценции хлоропластов четко скоординированы с работой транспортных систем плазмалеммы. В координации этих взаимодействий могут участвовать изменения ионного состава цитоплазмы, в частности изменения активности ионов H^+ и Ca^{2+} . Прямым и наиболее удобным способом изучения влияния различных ионов на работу хлоропластов является метод внутриклеточной перфузии в сочетании с импульсно-модулированной микрофлуориметрией. Перфузия клетки растворами с добавлением хелаторов (ЭГТА) способствует разрушению тонопласта и открывает непосредственный доступ перфузионного раствора к периферическому слою хлоропластов, которые сохраняют свое нативное расположение. Преимущество данного подхода заключается в возможности задавать и контролировать в ходе опыта ионный состав экспериментальной среды. При этом модельная система "перфузируемая клетка" позволяет сохранить высокую функциональную активность хлоропластов с потенциальным квантовым выходом переноса электрона в ФС II (КВ ФС II) до 0.7.

В данной работе изучено влияние рН и концентрации свободного Ca^{2+} в перфузионном растворе на КВ ФСII в условиях затенения, а также в условиях стационарного освещения. На свету наиболее высокие значения КВ ФСII и скорости переноса электронов отмечены при щелочных значениях рН; при уменьшении рН происходит снижение скорости нециклического транспорта электронов. Сделан вывод о более эффективном протекании фотосинтеза при щелочных рН цитоплазмы. Сравнение результатов опытов на интактных и перфузируемых клетках говорит о том, что участки, формирующие щелочные зоны в апопласте, характеризуются более низким рН цитоплазмы, а зонам наружного подкисления соответствуют участки с относительно высоким рН цитоплазмы. Также показано, что в темноте КВ ФСII не

зависит от концентрации Ca^{2+} , а на свету при увеличении $[\text{Ca}^{2+}]$ происходит снижение скорости нециклического транспорта электронов. Ca^{2+} -зависимое тушение флуоресценции подавлялось в присутствии валиномицина. Действие валиномицина предположительно связано с его способностью ингибировать светозависимое поступление Ca^{2+} в строму хлоропластов. Полученные результаты указывают на регуляторную роль цитоплазматических концентраций H^+ и Ca^{2+} в фотосинтезе растительной клетки.

Повреждающее воздействие света на светособирающие комплексы фотосистемы 2

Клементьев К.Е.

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет,
кафедра биофизики, Москва, Россия,
E-mail: mcklem@yandex.ru*

Светособирающий комплекс фотосистемы II (ЛНСII, ССК2) составляет около 30% от общего белка в хлоропластах мембран, поэтому он является самым распространенным мембранным белком на Земле.

Комплекс выполняет четыре отдельных, но взаимосвязанных функций в фотосинтезе: собирает энергию возбуждения и передает её реакционным центрам фотосистемы (ФС) II и I, распределяет энергию возбуждения между ФСII и I, играет значительную роль в организации системы упаковки гран тилакоидов в мембранах хлоропластов, предотвращает повреждение ФСII с помощью несколько различных защитных механизмов при высоких интенсивностях солнечной радиации.

Объектом исследований был выбран препарат ССК2 пурпурных бактерий *Rhodobacter* sp. Целью данной работы было исследование повреждающего действия света на ССК2, а так же защитной роли каротиноидов. Первичные процессы фотосинтеза могут быть исследованы с помощью флуориметрии высоко временного разрешения. Импульсный флуориметр для исследования быстропротекающих процессов представляет собой установку, в которой в качестве источника возбуждающего света использовался пикосекундный лазер. Для измерения и облучения образца использовали одну экспериментальную установку, которая работала в двух режимах: с частотами 1 и 10 Гц соответственно. Длина волны возбуждающего света изменяли путем нелинейного преобразования частоты во 2-ю, 3-ю или 4-ю гармонику основного излучения с длиной волны 532 нм (видимый свет), 355 нм (UVA) и 266 нм (UVC) соответственно. UVC оказывает наибольшее влияние на ССК2, затем идет UVA и самое слабое воздействие оказывает видимый свет. Используемые в эксперименте каротиноиды оказались неспособны предотвратить повреждающее воздействие излучения с длиной волны 266 нм, что подтверждает нашу гипотезу о том, что растение наиболее уязвимо к излучению, которое не встречается в природе. Фотопротекторные свойства каротиноидов для излучения с длиной волны 355 нм, вероятно связаны, в первую очередь, с дезактивацией активных форм кислорода. При облучении видимым светом и добавлении каротиноидов, произошло увеличение времен жизни, что связано с агрегацией антенных комплексов, а не фотодеградацией.

Механизм потери устойчивости гомеостаза эритроцитов после взятия донорской крови

Краснова Мария Алексеевна, Зайцева Галина Владимировна, Маслова Марина Николаевна

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физический институт им.

П.Н. Лебедева Российской академии наук, Россия, Москва,

mashavin@mail.ru

Данная работа касается проблем хранения донорской крови человека. После взятия из организма частично утрачиваются ее нативные свойства. Это может происходить из-за потери устойчивости гомеостаза эритроцитов. Выяснение механизма этого процесса является целью данной работы.

Объектом исследования являются эритроциты человека. Метод исследования заключается в анализе кинетики проточного гомеостатирования основных параметров энергетического метаболизма этих клеток — показателя кислотности pH, концентрации АТФ ($n_{\text{ATФ}}$) и

количества липидов в мембранах. На фазовой плоскости ($n_{\text{АТФ}}$, $p\text{H}$), для исследования устойчивости метаболизма эритроцитов, были получены кривые баланса скоростей роста и убыли указанных параметров. Состоянию эритроцитов *in vivo* соответствует пересечение всех кривых баланса в одной точке. После взятия крови из организма в эритроцитах изменяются скорости процессов метаболизма, что на фазовом портрете отразится в изменении взаимного расположения кривых баланса (в их смещении и/или деформации). При этом возможны два варианта. Первый – в исходной области (соответствующей параметрам *in vivo*) кривые баланса пересекаться в одной точке не будут, а пересекутся попарно. Метаболизм эритроцитов в этом случае будет характеризоваться появлением незатухающих колебаний всех его параметров. Второй вариант – в исходной области не будет даже попарного пересечения кривых. При этом метаболизм эритроцитов может перейти на другой уровень, что отобразится пересечением кривых баланса в другой области фазовой плоскости с более низкими, чем *in vivo*, концентрациями АТФ и с другими значениями $p\text{H}$. В этом случае можно говорить о том, что произошла потеря устойчивости исходного состояния эритроцитов. Из проведенного анализа следует, что метаболизм эритроцитов *in vivo* имеет границы устойчивости по выбранным свободным параметрам – $p\text{H}$ и $n_{\text{АТФ}}$.

На основе анализа кинетики основных параметров энергетического метаболизма эритроцитов ($n_{\text{АТФ}}$, $p\text{H}$ цитоплазмы и количества липидов в мембране) предложен механизм потери устойчивости гомеостаза этих клеток после взятия донорской крови из организма. Более подробное исследование рассмотренных в данной работе вопросов может помочь в разработке конкретных методик восстановления нативных свойств донорской крови.

Моделирование кривой индукции флуоресценции для димера фотосистемы II.

Маслаков А.С., Антал Т.К., Ризниченко Г.Ю.

*Биологический факультет МГУ, кафедра биофизики, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы
1, корп. 12,*

alexei.maslakov@gmail.com

Представлена математическая модель димерного суперкомплекса фотосистем II для описания начального участка кривой индукции флуоресценции хлорофилла а. Модель основана на симуляции электронтранспортных процессов в реакционном центре ФСII. В отличие от кинетических моделей, основанных на решении систем дифференциальных уравнений, этот метод позволяет изучать особенности гетерогенных систем, напрямую задавая параметры компонентов с отличными друг от друга свойствами.

Рассматривали только начальный участок кривой индукции флуоресценции и в модели учитывали только события, происходящие на донорной стороне реакционного центра ФСII, – восстановление P680 и перенос электрона с P680 на Pheo и Qa. Рассматривали поведение ансамбля, состоящего из статистически значимого числа фотосистем. Для каждого реакционного центра ФСII в ансамбле на каждом шаге симуляции (с временным интервалом 5 пс) рассчитывали вероятность изменения его состояния и далее случайным образом (с учетом вероятности того или иного изменения состояния) определяли, останется ли его состояние прежним или изменится, и каким образом. Также на каждом шаге симуляции для каждой фотосистемы рассчитывали вероятность высвечивания квантов флуоресценции и случайным образом определяли, произойдет ли это высвечивание на данном временном интервале, собирали данные о высвечивании квантов флуоресценции по всему ансамблю и строили кривую индукции флуоресценции. Как показывают экспериментальные данные, в случае отсутствия взаимодействия между отдельными реакционными центрами начальный участок кривой индукции флуоресценции имеет экспоненциальную форму, в случае их объединения в энергетически взаимосвязанный комплекс из двух ФС – сигмоидную. Это было учтено в модели введением вероятности энергетического обмена между объединенными в пару реакционными центрами.

С помощью данной модели проверили гипотезу об изменениях, происходящих в реакционных центрах ФСII при серном голодании *Chlamydomonas reinhardtii*.

Изучение взаимодействия мезенхимных стволовых клеток меченых Turbo FP635 и модели экспериментальной опухоли методами флуоресцентной микроскопии и *in vivo* имиджинга

Мелешина А.В.¹, Черкасова Е.И.¹, Сергеева Е.А.², Киселева Е.В.³, Дашинимаев Э.Б.³

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского¹ биологический факультет, Институт прикладной физики РАН², Нижний Новгород, Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН³, Москва, Россия

almele@ya.ru

Привлечение стволовых клеток мезенхимального происхождения в регенеративный процесс при индуцированном воспалении и их участие в туморогенезе является предметом дискуссий. В данной работе была исследована модель «животное-реципиент-опухоль-стволовые клетки», с использованием мышей линий D2xJ (nude), культуры опухоли, стволовых клеток стромы жировой ткани человека, трансфецированных красным флуоресцентным белком Turbo FP635. Для идентификации селективности накопления и анализа распределения в организме флуоресцентно меченых клеток использовались методы флуоресцентного поверхностного прижизненного имиджинга и лазерной сканирующей флуоресцентной микроскопии. В группах животных с комплексным введением стволовых клеток методом биоимиджинга *in vivo* была детектирована флуоресценция в области селезенки на 5-9 день после инъекции меченых стволовых клеток и сохранялась до 10 - 14 суток. В группе с локальным введением стволовых клеток (в область опухоли) мест их локализации выявлено не было. Для верификации распределения и выявления ниш стволовых клеток в тканях животного была применена конфокальная флуоресцентная микроскопия (Axiovert 200M LSM 510 META (Carl Zeiss), Германия). Для идентификации экзогенной флуоресценции белка Turbo FP635 регистрировали спектральные данные с 12 внутренних органов и опухолевой ткани реципиента. Скопления клеток со спектральными характеристиками, соответствующими флуоресцентному белку Turbo FP635 обнаружены в опухолевой ткани и костном мозге животных при локальном введении меченых стволовых клеток, а также в легких при системном введении меченых стволовых клеток. Полученные данные позволяют сделать вывод, что исследуемый тип стволовых клеток при местном и системном введении интегрирует в селезенку, костный мозг, легкие и ткани опухоли реципиента и может быть детектирован методами прижизненного имиджинга и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

Зависимость параметров индуцированных электрическими сигналами ответа фотосинтеза от возраста проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.)

Румянцев Евгений Александрович

*Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Россия,
Нижний Новгород
csanter@rambler.ru*

В процессе развития в растительном организме происходит изменение ряда физиологических процессов и их регуляции при действии различных абиотических факторов. Одним из механизмов регуляции является генерация и распространение электрических сигналов, которые оказывают сильное влияние на один из наиболее значимых физиологических процессов, такой как фотосинтез. Целью настоящей работы явилось изучение индуцированных электрическими сигналами ответов фотосинтеза у пшеницы и определение зависимостей их параметров от возраста.

Объектом исследования служили проростки пшеницы (*Triticum aestivum*) возрастом от 11 до 18 суток. Исследование фотосинтетической активности (ФА) проводилось с использованием РАМ-флуориметра (Dual-РАМ-100) и стандартного газоанализатора (GFS-3000). Регистрация электрической активности осуществлялась внеклеточно с помощью стандартной трехканальной электрофизиологической системы.

Индукцированный ожогом края листа пшеницы переменный потенциал (ВП) вызывает обратимое снижение ФА и приводит к изменению таких показателей как: поглощение CO₂, квантовый выход фотосистем I и II, фотохимического и нефотохимического тушений. ВП

вызывает снижение поглощения CO_2 на величину 40-45% у проростков с 11 по 16 сутки, с 16 по 18 сутки ингибирование поглощения увеличивается до 63%. Под влиянием ВП квантовый выход фотосистемы I снижается, а квантовый выход фотосистемы II и фотохимическое тушение имеют более сложную временную зависимость, и в период с 11 по 13 сутки ВП вызывает возрастание этих величин, а начиная с 14 суток – снижение. Нефотохимическое тушение в ответ на ВП с 11 по 13 сутки меняется незначительно, а с 14 возрастает и выходит на новый уровень.

Таким образом, результаты наших экспериментов указывают на усиление ответов фотосинтеза с увеличением возраста проростка. При этом необходимо отметить, что интегральный ответ – всегда угнетение, а показатели световой стадии – меняют направление своего ответа, что может быть обусловлено различиями в механизмах преобразования электрического сигнала в функциональный ответ. Данные различия могут быть связаны с изменениями проводящей системы листа, которая служит основным путем распространения ВП, возможными изменениями в механизме внутриклеточной передачи сигнала, а так же с возрастными изменениями ФА на уровне отдельной клетки.

Влияние переменного потенциала на световую и темновую стадии фотосинтеза проростков тыквы (*Cucurbita pepo* L.)

Шерстнева Оксана Николаевна

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Россия, Нижний Новгород

sherstneva-oksana@yandex.ru

Электрические сигналы способны вызывать быстрое повышение устойчивости растений к действию стрессоров. Это требует участия процессов энергообмена, что подтверждается влиянием электрических сигналов на фотосинтез. Однако данные о направленности ответов и их параметрах достаточно противоречивы.

Исследование параметров световой и темновой стадий фотосинтеза осуществлялось на проростках тыквы (*Cucurbita pepo* L.) с помощью измерительной системы, включающей РАМ-флуориметр Dual-РАМ-100 и газоанализатор GFS-3000. Параллельно проводилась регистрация биопотенциалов с использованием стандартной электрофизиологической установки с экстраклеточным отведением.

Показано, что ожог листа вызывал распространяющиеся электрические сигналы по типу переменного потенциала (ВП). При прохождении ВП в исследуемый лист наблюдались изменения параметров газообмена, в частности, снижение уровня ассимиляции CO_2 и транспирации. Параметры световой стадии практически не менялись, за исключением нефотохимического тушения, которое возрастало в ответ на ВП. В единичных случаях ВП вызывал снижение квантового выхода фотосистем I и II. Изменения параметров фотосинтеза развивались в течение 3–10 минут. В 30 % случаев помимо кратковременных изменений фотосинтеза наблюдалось частичное восстановление его параметров, а затем развивалась медленная инактивация (30 минут – час и более).

Полученные результаты показывают, что ВП проходит в лист и влияет на фотосинтетические процессы у проростков тыквы. При этом вызванные ВП изменения фотосинтеза проявляются, в первую очередь в снижении поглощения CO_2 . Это указывает на влияние электрических сигналов на активность цикла Кальвина. Изменения световой стадии выражены намного слабее, что косвенно свидетельствует в пользу первичной роли изменений цикла Кальвина в формировании ответа фотосинтеза.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для поддержки молодых российских ученых (МК-1869.2012.4).

Расчёт энергетических спектров каротиноидов методами вычислительной квантовой химии

Ярошевич Игорь Александрович

Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия,
igor@erg.biophys.msu.ru

Каротиноиды и ксантофиллы входят в состав подавляющего количества биологических мембран в качестве минорной компоненты. В соответствии с современными представлениями, в животных клетках эти молекулы выполняют роль антиоксидантов, дезактивируя либо предотвращая образование активных форм кислорода. В фотосинтезирующих клетках каротиноидные пигменты активно участвуют в процессах сбора, трансформации и диссипации солнечной энергии. Функциональная нагрузка каротиноида в биологическом объекте тесно связана со структурой его нижних возбуждённых электронных состояний. Экспериментальное исследование нижних энергетических уровней каротиноидов затруднено ввиду квантовых запретов на оптические переходы между соответствующими электронными состояниями, и именно поэтому важной является разработка теоретических методов, которые позволяют точно определить строение нижних возбуждённых электронных состояний каротиноидов.

В работе в рамках методов *ab initio* исследованы каротиноиды различной структуры, различающиеся по количеству атомов в сопряжённой цепи и характеру боковых групп заместителей. Методом конфигурационного взаимодействия (КВ) рассчитана энергетическая схема нижних четырёх электронных состояний каротиноидов. Рассчитанные данные хорошо согласуются с экспериментальными. Исследована зависимость изменения энергетической схемы от строения соответствующего пигмента. Обнаружена зависимость положения первого триплетного уровня каротиноида с его эффективностью в процессах тушения синглетного кислорода и триплетного хлорофилла. Разработана схема, на основании которой можно определить биологическую функцию каротиноида в светособирающем комплексе как антенны, либо тушителя возбужденного синглетного хлорофилла.

Нанобиотехнология

Молекулярный интерфейс барназа-барстар как путь к получению высокостабильных конструкций коллоидных частиц

Агаева У.Ф., Коростылев Е.В., Лукаш С.В., Никитин М. П.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва,
aghayeva.u@gmail.com

В настоящее время для ряда приложений наночастиц, в частности, для создания биосенсоров и терагностических агентов для медицины, большой интерес представляют многофункциональные наноструктуры, сочетающие в себе полезные свойства их компонентов. Одним из перспективных способов достижения такой многофункциональности является самосборка наночастиц, опосредованная биомолекулами (ДНК, белками и их низкомолекулярными лигандами и др.), химически конъюгированными с поверхностью частиц. Разработанный в нашей лаборатории принцип создания многофункциональных наноагентов с использованием полностью белковой системы, состоящей из двух бактериальных белков, барназы и барстара из *Bacillus amyloliquefaciens*, был применен в настоящей работе для самосборки двойных и тройных суперструктур из полистирольных коллоидных частиц двух типов: магнитных и флуоресцентных. Для повышения эффективности и специфичности самосборки белки были химически конъюгированы с частицами через гибкий гидрофильный полиэтиленгликолевый линкер, который позволил осуществить переход к многоточечному связыванию между частицами и устранить неспецифическое взаимодействие между ними. Эффективность разработанного метода была подтверждена с помощью оптической эпифлуоресцентной, а также сканирующей электронной микроскопии.

Учитывая способность барназы и барстара к формированию исключительно прочного комплекса, мы решили проверить, насколько стабильны полученные структуры в экстремальных условиях, как правило, приводящих к денатурации большинства про- и эукариотических белков. Для этого предварительно собранные структуры были подвергнуты следующим условиям: 1) инкубация в присутствии высоких концентраций денатурирующих агентов (мочевины, гуанидин гидрохлорида) и/или соли (NaCl); 2) инкубация при экстремально кислых значениях pH (до pH 1,5). Во всех случаях заметное снижение сохранности структур достигалось лишь на третий–десятый день инкубации, причем наиболее выраженным оно было в случае низких pH. Нагревание собранных структур до 70°C в течение 1–2 ч также не приводит к видимым в оптический микроскоп изменениям их структуры. Существенную толерантность к указанным условиям продемонстрировал и сам процесс самосборки, когда в них помещались исходные конъюгаты и оценивалась эффективность сборки по сравнению с обычными условиями (в натрий-фосфатном буфере). Более того, сравнение исследуемой системы с другими системами для сборки коллоидных частиц (стрептавидин–биотин, антитело–малый гаптен, антитело–крупный мультиэпитопный антиген, протеин А–кроличьи IgG антитела) показало, что, в то время как резистентность структур, предварительно собранных с помощью этих систем, относительно сравнима, их поведение в отношении эффективности сборки в экстремальных условиях различается существенно. Это может иметь фундаментальное значение для анализа молекулярных взаимодействий, обуславливающих сборку частиц. Таким образом, полученные конструкции коллоидных частиц демонстрируют необычную для биоконъюгатов стабильность и резистентность по отношению к условиям, существенно далеким от физиологических, а их поведение в таких условиях представляется исключительно интересным для дальнейшего изучения гибридных систем, включающих биомолекулярную и коллоидную составляющие.

Living yeast cells encapsulated in polyelectrolyte multilayered films doped with halloysite nanotubes

Demina T.A., Konnova S.A., Sharipova I.R.

*Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation,
deminatanja@gmail.com*

Halloysite clay nanotubes are versatile nanomaterials having a great potential for commercial application such as drug delivery vehicles, enzyme immobilization vessels, bone implants, additives in polymer composites, biocides, anticorrosion protective coatings, etc. Encapsulation of individual cells with halloysite nanotubes has a significant scientific interest for applications in biochemical sensors, reactors and for fundamental cell biology. In recent years, the layer-by-layer assembly has been extensively used to functionalise living microbial cells with polymer shells and nanoparticles. Here we focused our efforts on studying the possible toxic effects of encapsulation of isolated yeast cells with polymer shells doped with halloysite nanotubes.

Saccharomyces cerevisiae cells were coated with polyelectrolyte multilayered films doped with halloysite nanotubes (50 nm×900 nm). The fabrication of hybrid shells on the cells was confirmed using electron microscopy. To study the long term viability effects, we obtained 60 hours growth curves of intact yeast cells, cells mixed with nanotubes, cells encapsulated with polymeric multilayered films and cells encapsulated with polymeric multilayered films doped with halloysite nanotubes. The growth curves of cells encapsulated with polymeric multilayered films and cells encapsulated with polymeric multilayered films doped with halloysite nanotubes demonstrate the 4 hours delay of the stationary phase in comparison with intact yeast cells and cells mixed with nanotubes. The viability of the cells was tested in the zero time point of the growth curve, in 24 hours and in 48 hours using fluorescein diacetate viability dye and fluorescent microscopy.

The majority of yeast cells coated with polymers/halloysite nanotubes remained viable and were able to bud after a certain “hibernation”-like delay if compared with native yeast. Halloysite nanotubes mixed and incubated with yeast cells did not affect the viability or propagating rates of the cells. We assume that halloysite nanotubes are nontoxic for the yeast cells and the method of yeast encapsulation

with nanotubes appears to be highly biocompatible and can be potentially used as a promising tool in biotechnology.

The authors thank their supervisors Dr. D.R. Yarullina and Dr. R.F. Fakhrullin (Kazan Federal University), Prof. Y.M. Lvov (Louisiana Tech) for halloysite nanotubes samples and Mr. Y.N. Osin (Kazan Federal University) for SEM images.

Исследование систем пролонгированного высвобождения белков на основе микрочастиц из поли-3-гидроксибутирата

Зернов А.Л.^{1,2}, Иванов Е.А.², Бонарцев А.П.^{1,2}, Махина Т.К.², Бонарцева Г.А.²

Студент

¹*МГУ им. М.В.Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия;*

²*Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва, Россия.*

altoba@gmail.com

Разработка и исследование полимерных систем для контролируемого высвобождения (ПСКВ) биологически активных веществ (БАВ) белковой природы – перспективное направление в современной биотехнологии. Их использование позволяет устранить недостатки традиционных лекарственных форм: токсичность, нестабильность веществ, неудовлетворительную фармакокинетику и др. В настоящее время поли-3-гидроксибутират (ПГБ), биodeградируемый и биосовместимый полимер, используется для создания широкого спектра ПСКВ (микро- и наносферы, микро- и нанокапсулы, матриксы, резервуары).

Для получения микрочастиц в данной работе был использован ПГБ 25 кДа, полученный в нашей лаборатории микробиологическим путем; Гидроксиапатит (ГА); Полиэтиленгликоль (ПЭГ) с различной молекулярной массой. Микросферы изготовлены при использовании методики двойного эмульгирования S/O/W. Контролируемое высвобождение белка из микроструктур проводилось *in vitro* в фосфатном буфере (pH 7,4) при 37°C. Характер включений белка определяли с помощью конфокального микроскопа.

Размеры полученных микросфер варьировали от 20 до 80 мкм. Их исследование с помощью методов конфокальной микроскопии доказало включение частиц ГА с адсорбированным на них белком в полимерный матрикс микросфер в виде конгломератов, а не диффузно. В таком состоянии большее количество белка находится в нативном состоянии, не подвергаясь необратимой адсорбции на полимерном матриксе. Исследовано влияние гидрофильного полимера ПЭГ на характеристики пролонгированного высвобождения.

Так же в рамках данной работы было проведено исследование, иллюстрирующее механизм высвобождения белка из микроструктур. Микросферы из ПГБ 25 кДа инкубировали в растворе fitc-ЧСА с концентрацией 40 мг/мл в течение часа. Было показано вхождение белка внутрь полимерных структур посредством диффузии, а, следовательно, возможен и обратный механизм, то есть высвобождение белка из микросфер посредством диффузии.

Таким образом, разработанная методика позволяет получать микрочастицы, способные к пролонгируемому высвобождению белков по диффузионному механизму и изменять характер этого процесса при использовании различных вспомогательных веществ.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГК № П548 от 17 мая 2010 г. и ГК № 16.740.11.0652 от 02 июня 2011 г. Министерства образования и науки РФ.

Синтез модульных нанотранспортеров с помощью метода интеин-опосредованного лигирования белков

Малышева В.Ю.^{1,2}, Уласов А.В.²

¹*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия;* ²*Институт биологии гена РАН, Москва, Россия;*

valery.maly@gmail.com

Ранее в нашей лаборатории был разработан ряд рекомбинантных модульных нанотранспортеров (МНТ) для направленной доставки противораковых веществ в ядра клеток-мишеней. Тип рецептора, сверхэкспрессируемого у данной линии клеток, определяет

лигандный модуль, который закодирован в последовательности МНТ. Данная методика предполагает, что для каждого нового лиганда необходимо создавать свою конструкцию. Поэтому для расширения спектра используемых лигандов мы применили метод интеин-опосредованного лигирования белков для присоединения лигандного модуля к МНТ.

Варьируя аминокислотный состав интеинового модуля, а также условия проведения реакции, мы разработали методику присоединения пептида (лиганд к меланокортиновым рецепторам, МкР) к МНТ, позволяющую получить наибольший выход целевого МНТ. Данные о биологической активности МНТ (выражена в EC_{50} – концентрации вещества, необходимой для достижения полумаксимального эффекта), синтезированного с помощью данной методики МНТ были получены с помощью метода стимулирования МкР-опосредованного меланогенеза на клеточной линии меланомы мышей В16-F1, сверхэкспрессирующей МкР 1 типа.

Мы установили, что количественный выход МНТ, конъюгированного с пептидом, выше при использовании дитиотреитола, чем при использовании 2-меркаптоэтансульфоновой кислоты в качестве тиолового агента. Проведение реакции при $+23^{\circ}C$ приводит к повышению количественного выхода целевого белка, по сравнению с реакцией, проведенной при $+4^{\circ}C$. С помощью мутагенеза получили варианты МНТ с заменой аминокислоты, прилегающей к сайту расщепления, на Ser, Gln или Ala. Наиболее эффективно расщепление проходило в случае мутации Gln, наименее эффективно в случае Ser. Эксперименты по стимулированию меланогенеза показали, что МНТ, полученные с помощью метода IPL, обладают биологической активностью, сравнимой с таковой у свободного пептида, использованного для ковалентного присоединения (EC_{50} : $2,76 \pm 0,91$ нМ, $1,46 \pm 0,47$ нМ, соответственно) и более высокой биологической активностью по сравнению с МНТ, изначально содержащем в своем нуклеотидном составе последовательность лигандного модуля (EC_{50} $8,57 \pm 2,69$ нМ).

Таким образом, МНТ, полученный методом интеин-опосредованного лигирования, обладает высокой биологической активностью; наибольший количественный выход целевого белка наблюдается при проведении реакции при $+23^{\circ}$, использовании дитиотреитола в качестве тиолового агента и при замене аминокислоты, прилегающей к сайту расщепления на Gln.

Влияние наночастиц серебра на структурную целостность мембраны эритроцита

Сарычева Ася Сергеевна

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова Факультет наук о

материалах, Москва, Россия,

assergevna@gmail.com

Одним из актуальных направлений современной науки является создание частиц, используемых в биомедицинских исследованиях для усиления сигнала комбинационного рассеяния света, регистрируемого от объектов: клеток, белков, мембран. Усиление сигнала комбинационного рассеяния коллоидными частицами серебра или золота вследствие плазмонного резонанса происходит в том случае, когда расстояние между молекулой, комбинационно рассеивающей свет, и поверхностью частиц составляет не более 10-20 нм, можно исследовать свойства примембранного гемоглобина, который, является важным звеном в процессе переноса кислорода. В то же время известно, что коллоидные частицы благородных металлов ввиду своей реакционной способности могут оказывать деструктивное воздействие на живые клетки. Информация о механизмах влияния наночастиц на клетки крови человека позволит сконструировать наночастицы, обладающие оптимальными характеристиками для усиления сигнала КР и не оказывающие деструктивного влияния на клетки. Целью данной работы является определение механизма влияния коллоидных растворов серебра на мембрану эритроцита. Первостепенной задачей являлось определение состояния НЧ в среде инкубации клетки. Для инкубации эритроцитов используется буфер Аллена со значительным содержанием хлорид-ионов, которые обладают сродством к ионам серебра, а значит равновесие серебро в растворе – серебро в твердой фазе нарушается, что приводит к снижению содержания ионов серебра в растворе. В то же время известно, что ионы серебра оказывают токсическое влияние на живые клетки. Исходя из этого, мы поставили перед собой следующие задачи:

1. Оценить влияние ионов серебра на эритроциты

2. Подобрать бесхлорную среду, оптимальную для инкубации клеток
3. Оценить влияние бесхлорного буфера на клетки, наночастицы и клетки с наночастицами
4. Оценить степень гемолиза клеток при действии различных НЧ серебра
5. Выявить локализацию наночастиц на поверхности эритроцита

В ходе работы был подобран буфер для инкубации клеток, содержащий нитрат-ионы вместо ионов хлора. Синтезированы НЧ серебра по методу Леопольда-Лендла, определён размер частиц, дзета-потенциал и положение максимума плазмонного резонанса. Показано, что разрушению клетки при добавлении НЧ предшествует изменение формы. Выявлено, что наночастицы в нитратном буфере оказывают большую деструкцию, чем в буфере Аллена, это позволяет предположить, что разрушающее действие на клетку оказывают ионы серебра, которые в случае буфера Аллена связываются хлорид-ионами. Показано, что частицы коллоидного серебра адсорбируются на поверхности эритроцита.

Структурно-функциональные свойства инулиназ и пути их регулирования: теоретический и практический аспекты

Холявка Марина Геннадьевна

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», биолого-почвенный факультет,

Воронеж, Россия

holyavka@rambler.ru

Одним из перспективных продуктов функционального питания является фруктоза, которая в настоящее время превратилась в популярный заменитель сахара. Промышленное получение 95 % фруктозного сиропа может быть основано на применении иммобилизованной инулиназы (КФ 3.2.1.7). Исследования структурно-функциональных свойств инулиназ в условиях различного микроокружения заслуживают особого внимания. При иммобилизации энзима его микроокружение представляет собой систему регуляции, контроля и стабилизации ферментативной активности.

Целью работы был анализ структурных характеристик инулиназ, выделенных из различных продуцентов, описание функциональных особенностей этих ферментов в условиях различного микроокружения, выявление оптимальных для их функционирования параметров системы.

Путем сочетания атомно-силовой микроскопии с методами динамического светорассеяния, гель-хроматографии и электрофореза нами были определены размеры и молекулярные массы инулиназ различного происхождения. Установлено, что инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и *Aspergillus niger*, а также инулиназа I из *Helianthus tuberosus* образуют гетеродимеры, а инулиназы II и III представлены мономерными формами.

С целью получения стабильных и высокоактивных биокатализаторов для промышленного производства фруктозных сиропов нами была осуществлена иммобилизация инулиназ, выделенных из продуцентов различных таксономических групп, на синтетических полимерных носителях. Установлено, что наибольшую каталитическую активность проявляют ферменты, адсорбированные на анионообменных смолах КУ-2 и АВ-17-2П. Показано, что иммобилизация позволяет увеличить значение температурного оптимума для функционирования инулиназы, стабилизирует конформацию ее молекулы, защищает пространственную структуру фермента от воздействия денатурирующих факторов.

Таким образом, детальное и разностороннее изучение влияния различных физико-химических агентов на свободные и иммобилизованные инулиназы, вероятно, будет способствовать выявлению механизмов регулирования каталитической активности ферментных препаратов и способов целенаправленного изменения их характеристик за счет варьирования их микроокружения путем связывания поверхности белковых глобул с матрицами нерастворимых носителей природного и синтетического происхождения.

Детекция и идентификация наночастиц оксидов металлов в биологических образцах методами аналитической электронной микроскопии

Шебанова Анастасия Сергеевна, Феофанов Алексей Валерьевич,

Шайтан Константин Вольдемарович

Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Россия, Москва

n_shebanova@mail.ru

Быстрое увеличение масштабов производства наноматериалов требует разработки эффективных методов контроля за попаданием техногенных наночастиц в окружающую среду, а также способов оценки их потенциальной опасности для живых организмов. Метод просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) позволяет визуализировать наночастицы и даёт информацию об их размере и морфологии. Применение ПЭМ в комбинации с аналитическими методами позволяет одновременно с характеристикой морфологии и локализации частиц проводить их идентификацию и определять элементный состав. В данной работе для детекции и идентификации наночастиц оксидов титана, церия и алюминия в биологических образцах была опробована ПЭМ в комбинации с двумя аналитическими методами – спектроскопией характеристических потерь энергии электронов (СХПЭЭ) и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией (ЭДС). В качестве модельной системы для апробации методов СХПЭЭ и ЭДС была выбрана сыворотка крови, в которую добавляли наночастицы оксидов титана, церия, алюминия. Помимо образцов сыворотки крови с наночастицами, которые наносились на подложки для ПЭМ в виде суспензии, были приготовлены ультратонкие срезы животных клеток, культивированных в присутствии наночастиц оксидов титана и церия. Анализ приготовленных образцов проводили на электронных микроскопах LEO912AB OMEGA, Karl Zeiss, Германия, оснащённом внутриколонным энергетическим фильтром для СХПЭЭ, и JEM 2100, JEOL, Япония, оснащённом рентгеновским детектором и постколонным энергетическим фильтром для СХПЭЭ. В результате методом ПЭМ в комбинации с СХПЭЭ и ЭДС были охарактеризованы морфология и размер введённых наночастиц оксидов металлов, а также, в случае нахождения в образцах групп из нескольких частиц, получена информация об их элементном составе. Метод СХПЭЭ показал хорошие результаты по определению титана и церия в составе наночастиц оксидов титана и церия, метод ЭДС позволил охарактеризовать элементный состав наночастиц всех трёх оксидов. Таким образом, была показана применимость методов аналитической ПЭМ для выявления и идентификации наночастиц данных оксидов металлов в биологических образцах.

Стеновые доклады

Действие активных форм кислорода на комплекс LH2 из серной фотосинтезирующей бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila*

Ашихмин Александр Александрович

ФГБУ науки ИФПБ РАН, Россия, Пуццино

alex-asch@rambler.ru

Известно, что синглетный кислород является сильным окислителем. В работе проведено изучение действия синглетного кислорода на контрольные и бескаротиноидные комплексы LH2 из *Ect. haloalkaliphila*. В качестве источника синглетного кислорода использовали бенгальский розовый.

Освещение комплексов LH2 (светофильтр ОС-14, $\lambda > 570$ нм) в присутствии бенгальского розового (25 мкМ) показало, что скорость окисления БХл800 и БХл850 в обоих видах (каротиноидных и бескаротиноидных) комплексов существенно отличается. Образующий этим красителем синглетный кислород, в течение 60 минут освещения окислял БХл850 в контрольном комплексе на ~52%, а в бескаротиноидном на ~78%. Одновременно происходило окисление БХл800 (~21% у контроля и ~69% у бескаротиноидного комплекса). Процесс окисления в контрольном комплексе сопровождался образованием окисленного продукта с

максимумом поглощения при 700 нм, а в бескаротиноидном комплексе образование подобного продукта окисления не зарегистрировано.

При облучении комплексов LH2 в течение 60 минут сине-зеленым (фильтры СЗС-22 и ЖС-4) светом (область поглощения каротиноидов) происходило фотоокисление обоих типов БХл (63% для БХл850 и 21% для БХл800) и образование окисленного продукта при 700 нм. В бескаротиноидном комплексе при тех же условиях БХл850 фотоокислялся на 39%, а БХл800 на 29%. В спектре поглощения данного комплекса зарегистрировано небольшое количество окисленного продукта с максимумом при 700 нм. Каротиноиды при воздействии внешнего источника активных форм кислорода (бенгальский розовый) на систему выполняют защитную функцию. Процессы фотоокисления комплекса LH2 при облучении сине-зеленым светом (область поглощения каротиноидов) предположительно могут быть вызваны их способностью инициировать образование активных форм кислорода.

РФ НШ-307.2012.4.

Структурированный капрон, способный к молекулярному распознаванию

Булушев Роман Дмитриевич

Новосибирский Государственный Университет, Россия, Новосибирск

rbulushev@gmail.com

Получение дешевых и стабильных синтетических материалов, способных к молекулярному распознаванию представляет большой научный и практический интерес. Примером таких материалов являются молекулярно импринтированные полимеры (МИПы) – полимеры, содержащие в своей структуре отпечаток молекулы-шаблона и способные к ее специфическому распознаванию. Цель данной работы – разработка подхода к получению импринтированного капрона для белковых молекул.

В работе использованы: капрон – основа МИПов, его растворитель – 2,2,2-трифторэтанол (ТФЭ), белковые шаблоны: бычий (БСА) и человеческий (ЧСА) сывороточные альбумины, гемоглобин (Гмг) и их флуоресцентно меченые аналоги, порогены (глицерин, диметилформамид, полиэтиленгликоль и т.д.). Исследование физико-химических характеристик белков в ТФЭ проводили с использованием спектрофотометрии и спектрополяриметрии; формируемые полимеры характеризовали с помощью оптической и сканирующей электронной микроскопии; коэффициент селективности МИПов оценивали, как отношение эффективности связывания шаблона с МИПом и контрольным полимером, полученном в отсутствие шаблона.

Предложен новый подход к получению МИПов из капрона. Формирование полимерного каркаса происходит при переходе капрона из растворенного в твердотельное состояние в присутствии молекулярного шаблона и порогенов. В качестве основного растворителя капрона выбран ТФЭ. Показана растворимость и сохранность вторичной структуры различных белков в ТФЭ. Исследована структура полимеров в зависимости от условий их формирования (состав раствора, пороген, температура). Показана доступность сайтов специфического распознавания полимера. Разработаны подходы к получению полимеров в форматах микрочастиц и мембран. Показана нетоксичность капроновых мембран в отношении мезенхимальных стволовых клеток крысы. Получены МИПы для ЧСА, БСА, Гмг с коэффициентами селективности 1.31, 1.62, 2.01, соответственно.

В предложенном подходе белковый шаблон находится в не денатурирующих условиях, в отличие от большинства методов получения МИПов, использующих реакцию полимеризации. Варьирование композиции раствора полимера приводит к формированию пористых капроновых каркасов разной структуры с сорбционной емкостью до 39 м²/г. Получены полимеры, обладающие селективностью к разным белкам при сохранении неизменными условий формирования МИПов. Нетоксичные капроновые МИПы в формате микрочастиц могут быть использованы *in vivo* в терапевтических целях.

Работа выполнена при поддержке ГК №1073, программы УМНИК, МКБ.

Механизмы повреждения/регенерации плазматической мембраны нейрональной клетки в культуре при инициации нейродегенеративных процессов

Владимирова Инна Валерьевна

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет,
Москва, Россия*

vladimirova-bph@yandexl.ru

Известно, что при гиперстимуляции NMDA рецепторов, а также при воздействии на нейроны экзогенных АФК, происходит избыточная активация ядерного фермента поли(АДФ-рибоза) полимеразы (PARP-1). PARP-1 участвует в инициации клеточной гибели и в некоторых случаях это приводит к повреждениям плазматической мембраны.

Исследования проводились на гранулярные нейроны мозжечка крысы с помощью световой и лазерной конфокальной сканирующей микроскопии (ЛКСМ). Была сопоставлена динамика повреждения плазматической мембраны (способности пропускать флуоресцентные красители) с показателями, характеризующими ионный и метаболический гомеостаз клетки: концентрация внутриклеточного Ca²⁺, митохондриальный мембранный потенциал. Изучено влияние нейропротекторов с различными механизмами действия (антиоксиданты, ингибиторы PARP-1) на нарушения целостности плазматической мембраны, вызванные пронекротическими агентами.

PARP является сигнальной молекулой, способствующая высвобождению апоптозиндуцирующего фактора из мембранного пространства митохондрий, что приводит к гибели клетки. Ингибиторы PARP-1 защищают клетки от гибели при патогенных воздействиях, в том числе при гиперактивации глутаматных рецепторов.

Изменение параметров флуоресценции хлорофилла *Chlorella* sp. при адаптации к свету различной интенсивности

Деркач И.С., Колюхов И.В.

*Московский Государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
кафедра биофизики, Российская Федерация, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ, д. 1,
стр. 12, +7(916)934-71-13*

pchelinskij@mail.ru

В естественных водных экосистемах и в биокультураторах лимитирующим фактором роста культуры микроскопических фотосинтезирующих организмов может быть дефицит минерального питания, в частности дефицит азота. Важно задачей является своевременное определение времени начала голодания: в природных водоёмах это позволит прогнозировать дальнейший путь развития экосистемы, а в биокультураторах – своевременно реагировать на изменения и эффективно управлять процессом культивирования. Удобным экспресс-методом определения дефицита азота может стать измерение различных параметров флуоресценции культуры, характеризующих уровень фотосинтетической активности организмов. В нашей работе исследуется возможность определения дефицита минерального питания в культуре водорослей по изменениям параметров флуоресценции.

Для исследования были выбраны водоросли рода *Chlorella* как распространённый и хорошо изученный объект.

В ходе работы для исследуемой культуры *Chlorella* sp. на разных стадиях роста были получены кривые индукции флуоресценции и световые кривые, измеренные при различных интенсивностях насыщающего света. На основании этих данных были построены зависимости параметров флуоресценции хлорофилла от времени роста культуры для оценки параметров фотосинтеза. В ходе экспериментов изучали особенности изменения нефотохимического тушения возбуждённых состояний хлорофилла и скорости электронного транспорта в процессе адаптации к свету различной интенсивности.

На основании проведённых исследований выявлено, что для развития нефотохимического тушения и выхода скорости электронного транспорта на стационарный уровень требуется

световая адаптация длительностью не менее 3 минут, тогда как в лабораторной практике часто используют меньшие времена световой адаптации.

Установлено, что измерение скорости электронного транспорта при малых временах световой адаптации является более чувствительным способом определения дефицита минерального питания, чем её измерение в условиях стабильного нефотохимического тушения.

Анализ динамики начального уровня и квантового выхода флуоресценции на разных стадиях роста культуры позволяет предположить, что на стадии линейного роста культуры перенос электронов с ФСII на ФСI активируется быстрее, чем на стационарной стадии.

Применение циклических гидроксиламинов для исследования генерации супероксидного анион-радикала в тилакоидных мембранах высших растений

Козулева Марина Алексеевна

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Россия, Пущино

kozuleva@gmail.com

На свету в хлоропластах при восстановлении молекулярного кислорода в фотосинтетической электрон-транспортной цепи образуется супероксидный анион-радикал, $O_2^{\bullet-}$, который способен инициировать реакции, приводящие к повреждению хлоропластных структур. До сих пор остается предметом обсуждения возможность образования $O_2^{\bullet-}$ внутри биологических, и в том числе, тилакоидных мембран.

Для решения этой проблемы впервые при исследовании фотосинтетических объектов были применены детекторы $O_2^{\bullet-}$ нового класса, циклические гидроксиламины (ЦГА). ЦГА в реакции с $O_2^{\bullet-}$ окисляются до нитроксильных радикалов, накопление которых регистрируется с помощью ЭПР-спектроскопии. В работе использовали четыре ЦГА, СМ-Н, ТМТ-Н, DCP-Н и САТ1-Н, различающиеся коэффициентами распределения в системе октанол/вода.

Было найдено, что липофильный СМ-Н, добавленный к суспензии изолированных тилакоидов, ускорял восстановление окисленного донора фотосистемы 1, $P700^+$, и по этой причине не может быть использован для регистрации образования $O_2^{\bullet-}$ в тилакоидах. Липофильный ТМТ-Н и гидрофильные САТ1-Н и DCP-Н не влияли на скорость переноса электронов в тилакоидах и на восстановление $P700^+$. В присутствии супероксиддисмутазы, ускоряющей реакцию дисмутации $O_2^{\bullet-}$ в водной среде, происходило индуцированное светом накопление радикалов ТМТ $^{\bullet}$, но не DCP $^{\bullet}$. Этот факт прямо свидетельствовал о возможности генерации $O_2^{\bullet-}$ внутри тилакоидной мембраны. Характеристики накопления САТ1 $^{\bullet}$ оказались, однако, ближе к таковым ТМТ $^{\bullet}$, а не DCP $^{\bullet}$. Различия в характере взаимодействия с $O_2^{\bullet-}$ гидрофильных САТ1-Н и DCP-Н может быть объяснено тем, что из-за наличия положительного заряда молекулы САТ1-Н электростатически связываются с отрицательно заряженной поверхностью тилакоидной мембраны, реагируя с $O_2^{\bullet-}$ до их выхода в водную фазу.

Результаты работы свидетельствуют о возможности генерации $O_2^{\bullet-}$ внутри мембраны тилакоида, что согласуется с данными об образовании там же H_2O_2 , главного сигнального агента в растительной клетке. Образованные внутри мембраны молекулы H_2O_2 могут миновать системы детоксикации, расположенные в стромах хлоропласта, и запускать сигнальные пути, в том числе, за пределами хлоропласта.

Исследование специфической активности нанокапсулированной формы рекомбинантного эритропоэтина человека

Колесова Марина Евгеньевна, Хрипко Ольга Павловна

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Россия, Новосибирская обл., р. п. Кольцово

m.e.kolesova@gmail.com

Большинство работ по созданию нанокапсулированных лекарственных препаратов посвящено подбору полимеров, конструированию частиц и описанию их физико-химических свойств [1]. Исследования влияния сложных полимерных комплексов на организм животных и

человека встречаются крайне редко. В связи с этим, работа направлена на изучение специфической активности препаратов нанокапсулированного рекомбинантного эритропоэтина человека (рчЭПО) для перорального применения.

Проведены эксперименты по определению оптимальной дозы нанокапсулированных препаратов рчЭПО, вводимых перорально. Самок мышей ICR разделяли на 4 группы по 5 животных. В течение 4 дней каждой группе перорально вводили препарат не капсулированного эритропоэтина (ЭПО) в дозах 10, 40 и 80 МЕ/мышь в сутки. На 5 день забирали кровь для исследования. В качестве отрицательного контроля выступала группа мышей, получавших физиологический раствор. В результате проведенных экспериментов наблюдалась ярко выраженная зависимость количества ретикулоцитов в периферической крови мышей от вводимой дозы рчЭПО. Максимальный выход ретикулоцитов из костного мозга наблюдался при дозе ЭПО соответствующей 40 МЕ/мышь в сутки.

Специфическую активность нанокапсулированной формы ЭПО определяли по изменению количества ретикулоцитов в периферической крови мышей. Препараты вводили перорально в дозе 40 МЕ/мышь в сутки в течение 4 дней. На 5 день забирали кровь для исследования. Показано достоверное увеличение содержания ретикулоцитов в периферической крови животных, получавших препараты капсулированного ЭПО по сравнению с контролями. В группе отрицательного контроля количество ретикулоцитов составило 4,56 %. В группе положительного контроля, получавшей не капсулированный препарат ЭПО, – 5,34 %, а для капсулированных препаратов показатель варьировал от 6,19 % до 8,78 % в зависимости от полимера, выбранного для капсулирования, и его концентрации. Статистические различия рассчитывали с помощью t-критерия Стьюдента.

В результате работы на лабораторных животных продемонстрирована эффективность применения нанокапсулированной формы рчЭПО для стимуляции эритропоэза.

Литература

Kumari A., Yadav S.K., Yadav S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2010, №75(1). p. 1–18.

Оценка фармакокинетики фотосенсибилизаторов методом просветного флуоресцентного имиджинга *in vivo*

Леканова Н.Ю.¹, Балалаева И.В.¹, Малеханова Е.А.¹, Ширманова М.В.¹, Клапшина Л.Г.²

Аспирант

¹-Нижегородский государственный национальный исследовательский университет

им. Н.И.Лобачевского, биологический факультет, Нижний Новгород, Россия

²-Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН

nat-lekanova@yandex.ru

На сегодняшний день предклинические исследования фотосенсибилизаторов (ФС) проводятся с помощью различных методик. Приоритетное значение для современной экспериментальной медицины имеют методы наблюдения *in vivo*, которые позволяют неинвазивно получить сведения о взаимодействии флуорофоров с тканями животных в норме и при альтерации, механизмах их распределения в организме и динамике циркуляции.

Целью работы является оценка фармакокинетики фотосенсибилизаторов с помощью метода просветного флуоресцентного имиджинга *in vivo*. Исследования проводились для двух препаратов, применяющихся в настоящее время в клинической практике: «Фотосенс» (ФГУП «ГНЦ «НИОПИК») и «Фотодитазин» (ООО «Вета-Гранд»), а также для потенциального ФС на основе тетрафенилтетрацианопорфиразинового комплекса иттербия (ИМХ РАН). Мониторинг животных с экспериментальными опухолями проводился в течение 7 суток после введения препарата. На основе количественной оценки уровня сигнала флуоресценции в полученных изображениях построены кривые накопления и выведения ФС в тканях.

Установлено, что максимум накопления препаратов «Фотодитазин» и «Фотосенс» приходится на 2-3 ч и 4-5 часа после инъекции соответственно. Возвращение сигнала к контрольному уровню наблюдалось через 5 и 7 суток. Максимум накопления порфиразинового

комплекса иттербия в опухоли достигался за 6-10 часов. Значительное снижение уровня флуоресценции соединения в нормальных тканях отмечено через 24 ч. после инъекции. Зарегистрировано более длительное удержание препарата в опухоли. Данные, полученные методом флуоресцентного имиджинга *in vivo*, подтверждены методами спектроскопии и конфокальной микроскопии образцов тканей *ex vivo*.

Таким образом, метод просветного флуоресцентного имиджинга *in vivo* позволяет неинвазивно исследовать основные параметры фармакокинетики фотосенсибилизаторов с учетом индивидуальных особенностей каждого животного.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты №11-04-97100-р_поволжье_a, №11-02-00916_a) и Министерства образования и науки РФ (ГК №16.512.11.2140).

Измерение фотохимической фазы кривой индукции флуоресценции хлорофилла *Clorella* sp. при адаптации к постоянному свету различной интенсивности

Львов А.М., Конюхов И.В.

Московский Государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биофизики, Российская Федерация, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12,

delinor0@gmail.com

Изучение состояния фотосинтетического аппарата водорослей, адаптированных к постоянному свету различной интенсивности, может дать информацию об изменении пигментного состава клетки и о состоянии фотосинтетического аппарата на разных стадиях роста популяции, что может служить достоверным показателем благополучия культуры. В качестве объекта исследования была выбрана *Clorella* sp.

Для оценки состояния фотосинтетического аппарата снимались и анализировались спектры поглощения и кривые индукции флуоресценции хлорофилла.

В ходе работы были сопоставлены спектры поглощения хлорофилла культур, находящихся на разных стадиях роста. Были сняты, проанализированы и сопоставлены кривые индукции флуоресценции хлорофилла, адаптированного к свету разной интенсивности, для культур, находящихся на разных стадиях роста. Также было рассчитано характеристическое время фотохимического участка индукционной кривой и эффективное сечение молекулы хлорофилла. Было показано, что характеристическое время фотохимического участка индукционной кривой существенно зависит от интенсивности предварительной световой адаптации. Также было выявлено, что при выходе культуры на стадию стагнации значение эффективного сечения молекулы хлорофилла в значительно меньшей степени зависят от продолжительности световой адаптации, чем на стадии линейного роста.

В данной работе было показано, что антенные комплексы реакционных центров взаимодействуют друг с другом. Также было показано, что состояние электрон-транспортной цепи различно для культур, находящихся в разных стадиях роста. При переходе культуры из одной стадии роста в другую изменений в пигментном составе клетки выявлено не было. Методы, использовавшиеся в данной работе, имеют потенциальное применение для определения состояния культуры *Clorella* sp.

Исследование сайт-специфического связывания ДНК с никующей эндонуклеазой Nt.BspD6I методом атомно-силовой микроскопии

Мачулин Андрей Валериевич¹, Дерюшева Евгения Игоревна², Юнусова Альфия Кяшафовна³

¹ *Институт биофизики клетки Российской академии наук, Россия, Пущино
and.machul@gmail.ru*

² *Тульский государственный университет, Россия, Тула
janed1986@ya.ru*

³ *Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук,
Россия, Пущино
a_junusova@rambler.ru*

Никующие эндонуклеазы, являющиеся уникальными по своим функциям ферментами, уже нашли применение в ряде биотехнологических методов, таких как изотермическая реакция для амплификации олигонуклеотидов и геномной ДНК. Никующая эндонуклеаза Nt.BspD6I является гетеродимерной эндонуклеазой рестрикции, одна из субъединиц которой проявляет специфическую никующую активность: связывается с двухцепочечной ДНК и вносит разрыв в одну цепь на расстоянии 4-х нуклеотидов от сайта связывания. Специфическая никующая активность никазы была хорошо изучена и описана. Тем не менее, структурных исследований сайт-специфического взаимодействия для комплекса ДНК-никазы проведено не было. В данной работе атомно-силовая микроскопия была использована для визуализации специфического связывания и места посадки белка. Подобранные ионные условия, а также соотношение ДНК к белку в конечном растворе позволили нам с высоким разрешением визуализировать образовавшийся после взаимодействия ДНК-белковый комплекс. Через пять минут после инкубации раствора ДНК с никующей эндонуклеазой на изображениях наблюдались молекулы ДНК со связанным белком, который располагался в ожидаемом месте связывания и «разделял» цепь ДНК на два сегмента (равных, примерно, 1/3 и 2/3 длины). Кроме того, молекула ДНК рядом с местом связывания имела высоту, соответствующую одноцепочечной молекуле ДНК, что согласуется с внесением одноцепочечного разрыва никазой при комплексообразовании. Поскольку до сих пор не удалось получить пригодные для рентгеноструктурного анализа кристаллы комплекса ДНК с никазой, полученные в данной работе результаты являются первым наглядным подтверждением описанного ранее механизма взаимодействия ДНК с никующей эндонуклеазой.

Разработка метода фотодинамической терапии с использованием генетически кодируемого фотосенсибилизатора

Минакова Екатерина Андреевна¹, Ширманова М.В.², Снопина Л.Б.², Серебровская Е.О.³, Лукьянов К.А.³, Евтеева Н.В.¹, Турчин И.В.⁴, Лукьянов С.А.³, Загайнова Е.В.²

¹ – *Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского, биологический факультет, г. Нижний Новгород Россия,* ² – *Научно-исследовательский институт прикладной и фундаментальной медицины Нижегородской государственной медицинской академии, г. Нижний Новгород, Россия,* ³ – *Институт биоорганической химии Российской академии наук, г. Москва, Россия,* ⁴ – *Институт прикладной физики Российской академии наук, г. Нижний Новгород, Россия*

minakova_kat@mail.ru

Фотодинамическая терапия (ФДТ) - метод лечения опухолей, основанный на способности фотосенсибилизаторов при воздействии лазерного облучения генерировать активные формы кислорода, которые вызывают гибель опухолевых клеток. Традиционно фотосенсибилизаторами служат порфириновые соединения, которые экзогенно вводятся в организм и избирательно накапливаются в опухоли. Однако ФДТ часто сопровождается побочными эффектами, а неравномерное распределение фотосенсибилизатора в опухоли создает сложности в дозиметрии. В 2005 г. в лаборатории Лукьянова С.А. (ИБХ РАН) был создан первый генетически кодируемый фотосенсибилизатор – красный фототоксичный белок.

В отличие от химически-синтезируемых фотосенсибилизаторов, он экспрессируется непосредственно опухолевыми клетками. Деструктивное действие фототоксичного белка показано на сегодняшний день на культурах клеток *in vitro*. Однако ФДТ опухолей с фототоксическим флуоресцентным белком до сих пор не проводилось.

Целью данной работы является разработка метода фотодинамической терапии на моделях опухолей животных с использованием генетически кодируемого фотосенсибилизатора. Объектом исследования служили мыши *nude* с раком шейки матки человека. Опухолевые клетки стабильно экспрессировали красный фототоксичный белок. Облучение опухолей выполняли многократно. Наблюдение за изменением размеров опухолей и интенсивности флуоресценции проводилось *in vivo* методом поверхностного флуоресцентного имиджинга. По окончании сеанса терапии образцы опухолей *ex vivo* были отправлены на гистологическое исследование, электронную и конфокальную флуоресцентную микроскопию. Было установлено, что после облучения опухолей интенсивность их флуоресценции снижается, предположительно из-за фотообесцвечивания хромофора. По результатам патоморфологического анализа в леченых опухолях с белком обнаружены дистрофические изменения. При анализе динамики роста опухолей отмечена тенденция к росту опухолей у животных без лечения, тогда как размер леченых опухолей изменялся не значительно. Таким образом, в данной работе впервые на моделях опухолей животных продемонстрирована принципиальная возможность разрушения опухолевой ткани с помощью генетически-кодируемого фототоксичного белка.

Влияние дефицита кислорода в среде на состав периферических белков в мембранах эритроцитов

Пономарчук О.О.

*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра биофизики, Россия, Москва
oluneva@yandex.ru*

Известно, что активность ионного транспорта и биохимических процессов в эритроцитах, а также их объем, зависят от содержания кислорода в среде. Одним из факторов регуляции активности белков (ионных транспортеров, каналов, ферментов) может быть взаимодействие периферических белков с мембраной эритроцитов, зависящее от содержания кислорода в среде.

Для проверки гипотезы об изменении состава периферических белков эритроцитов в зависимости от содержания кислорода в среде сконструировали герметичную камеру, позволяющую проводить необходимые для получения теней эритроцитов манипуляции в среде со сниженным содержанием кислорода. Контроль за содержанием кислорода в средах с тенями эритроцитов осуществляли с помощью полярографического метода, спектров комбинационного рассеяния гемоглобина и спектров поглощения гемоглобина. С помощью электрофореза в ПААГ получили информацию о белковом составе мембран в образцах теней эритроцитов. На основе полученных данных были выявлены различия в белковом составе мембран эритроцитов, приготовленных в среде со сниженным содержанием кислорода по сравнению с образцами теней эритроцитов, приготовленных в среде, находящейся в равновесии с воздухом.

Полученные результаты обсуждаются в контексте проблемы поиска сенсора кислорода в эритроцитах.

Зависимость активности митохондриальной аспаратаминотрансферазы от условий адсорбции на наночастицах золота

Салем А.Э.¹, Хорошунова Т.Н.²

¹Белорусский государственный университет, Беларусь, Минск,

²Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, РФ, Москва

ankel2008@gmail.com

Влияние наночастиц на процессы жизнедеятельности клетки практически не изучены. Весьма ограничена информация о действии наночастиц на ферменты. В связи с этим целью

данной работы являлось изучение влияния адсорбции митохондриального изофермента аспаратаминотрансферазы (мАспАТ) на наночастицах золота на его активность. Активность мАспАТ определяли по А. Кармен. Для изучения адсорбции мАспАТ на поверхности наночастиц золота использовали такое разведение белка, при котором падение оптической плотности раствора составляло не более 0,1 оптических единиц в минуту. Адсорбцию мАспАТ на поверхности наночастиц золота регистрировали спектрофотометрически.

Принимая во внимание тот факт, что рI мАспАТ равна 9,4, для обеспечения положительного поверхностного заряда молекулы был выбран рН раствора, равный 7,0. В данных условиях отрицательно заряженные частицы коллоидного золота легко адсорбируют мАспАТ на своей поверхности. Установлено, что активность мАспАТ сразу после добавления наночастиц коллоидного золота снижается на 50%, а спустя 40 минут уменьшается на 80% по сравнению с контролем. Предварительная обработка фермента α -кетоглутаратом в конечной концентрации 160 ммоль/л полностью предотвращала потерю активности мАспАТ, наблюдавшуюся при взаимодействии мАспАТ с наночастицами золота. Пиридоксальфосфат практически не влиял на активность фермента, адсорбированного на наночастицах золота.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить что, при адсорбции мАспАТ на наночастицах золота происходит изменение конформации белковой глобулы, приводящее к деформации структуры активного центра фермента и, как следствие, к снижению его активности. Субстрат мАспАТ α -кетоглутарат, встраиваясь в активный центр, предотвращает конформационные изменения последнего и обеспечивает реализацию каталитических параметров на уровне нативного фермента.

Работа выполнена в рамках совместного проекта БРФФИ-РФФИ № Б10Р-249.

Роль терминальных эмиттеров фикобилисом *Synechocystis* sp. в процессах нефотохимического тушения флуоресценции.

Свирин Михаил Дмитриевич

Московский Государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биофизики, Российская Федерация, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12, +7(910)420-45-95

yohurt@mail.ru

Фотосинтез – процесс, являющимся основным источником биологической энергии и главным входом неорганического углерода в биологический цикл. Основная часть света поглощается светособирающими комплексами (ССК), роль которых в сине-зеленых водорослях выполняют фикобилисомы состоящие из ряда специфических белков. Однако, при высоких интенсивностях света фотосистема не справляется с потоком энергии и возрастает вероятность образования свободных радикалов, для предотвращения чего существуют системы нефотохимического тушения флуоресценции, включающие в себя каротиноиды, в частности у цианобактерий - оранжевый каротин-протеин (ОСР), для которого до сих пор неизвестен сайт связывания в фикобилисомах.

Для исследования был выбран мутант цианобактерии *Synechocystis* PCC6803 Δ PSI/ Δ PSII, у которого отсутствуют обе фотосистемы и, соответственно, фотохимическое тушение. Таким образом, цепь переноса энергии в фикобилисомах мутанта состоит из следующих белков: фикоцианин (ФЦ), аллофикоцианин (АФЦ) и терминальный эмиттер (ТЭ). При облучении интенсивным сине-зеленым цветом ОСР переходит из оранжевой в красную форму, которая способна служить акцептором возбуждения.

Эффективность переноса энергии оценивали по изменению среднего времени жизни флуоресценции фикобилипротеинов. Темно- и светоадаптированные образцы были заморожены в жидком азоте, после чего при возбуждении пикосекундным лазером (405 нм) с помощью метода счета фотонов регистрировали кинетики затухания флуоресценции в диапазоне температур от -180 °С до +20 °С.

Установлено, что при комнатных температурах наблюдается значительное тушение флуоресценции АФЦ, однако при -180 °С тушение флуоресценции АФЦ отсутствует. Полученные результаты позволяют предположить, что ОСР взаимодействует именно с ТЭ.

Также, получена зависимость времени жизни флуоресценции АФЦ от времени, которая позволила рассчитать константу скорости инактивирования красного ОСР и перевода его в оранжевую форму белком восстановления флуоресценции (FRP), величина которой составила $1,12 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$.

Кинетика структурной реорганизации комплекса альфа-кристаллин – белок-мишень

Филиппов Дмитрий Олегович

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,

физический факультет, Москва, Россия

dimonfilippov@mail.ru

Согласно современным представлениям шапероноподобная (антиагрегационная) активность малых белков теплового шока (sHsps) обусловлена образованием комплексов sHsp – белок-мишень. sHsps представляют собой высокомолекулярные мультисубъединичные ансамбли, которые характеризуются динамичной четвертичной структурой. В настоящей работе свойства комплексов sHsp – белок-мишень изучались на примере комплексов, включающих альфа-кристаллин и белок-мишень двух типов: облученная ультрафиолетом гликогенфосфорилаза *b* (УФ-Phb) из скелетных мышц кролика и апо-форма Phb. Условия УФ-облучения были подобраны таким образом, что облученный фермент полностью терял ферментативную активность и утрачивал нативную структуру, согласно данным дифференциальной сканирующей калориметрии.

Антиагрегационную активность альфа-кристаллина оценивали по подавлению агрегации УФ-Phb и апо-Phb при 37°C. Тот факт, что добавление альфа-кристаллина приводит к практически мгновенной остановке процесса агрегации, указывает на достаточно быстрое образование первичного комплекса альфа-кристаллин – белок-мишень. В связи с тем, что альфа-кристаллин обладает динамической четвертичной структурой, первично образовавшийся комплекс альфа-кристаллин – белок-мишень подвергается дальнейшей структурной реорганизации. Эта идея была высказана в работе S.G. Roman *et all* [Biochemistry 2011, 50, 10607-10623]. Настоящая работа посвящена изучению кинетики структурной реорганизации комплексов между альфа-кристаллином и УФ-Phb или апо-Phb. Добавление краудинг-агента (полиэтиленгликоля с молекулярной массой 20000 дальтон) к комплексу альфа-кристаллин – белок-мишень приводит к агрегации комплекса. За кинетикой агрегации следили по увеличению интенсивности светорассеяния (*I*) при длине волны 632,8 нм. В качестве начальной скорости агрегации использовали величину $(dI/dt)_0$. Обнаружено, что величина $(dI/dt)_0$ уменьшается при увеличении времени инкубации альфа-кристаллина с белком-мишенью до момента добавления краудинг-агента. Таким образом, структурные изменения первичного комплекса альфа-кристаллин – белок-мишень приводят к повышению устойчивости комплекса к агрегации в условиях краудинга. Из зависимости $(dI/dt)_0$ от времени инкубации белка-мишени с альфа-кристаллином рассчитано время полупревращения для структурной реорганизации первично образовавшегося комплекса альфа-кристаллин – белок-мишень.