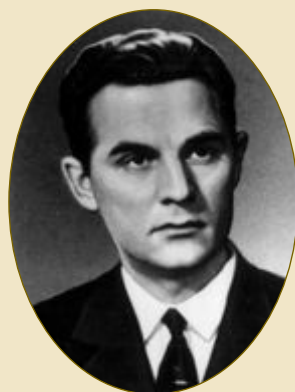


· БЕЛОЗЕРСКИЙ · ТОДД · СЕНГЕР · ОЧОА ·

· КОЛЬЦОВ · ШРЕДИНГЕР · ЭЙВЕРИ · ЧАРГАФФ · УОТСОН · КРИК ·

**ВЕСТНИК**  
**биотехнологии**  
**и физико-химической**  
**биологии**  
**имени Ю.А. Овчинникова**



**Т. 2, № 1**  
**2006**

· КОРНБЕРГ · НИРЕНБЕРГ · КОРАНА · ТЕМИН · БАЛТИМОР · БАЕВ ·

· СМИТ · ГИЛБЕРТ · БЕРГ · ЭНГЕЛЬГАРТ ·

2006, Т. 2, № 1

**ВЕСТНИК БИОТЕХНОЛОГИИ  
И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ  
ИМЕНИ Ю.А. ОВЧИННИКОВА**

**Научно-практический журнал**

**Основан в 2005 году**

**Главный редактор**

Р.Г. Василев

**Редакционная коллегия**

Е.Г. Борисенко, В.С. Воробьев, С.И. Матаев, Ю.В. Махотин, О.Я. Мезенова

**Редакционный совет**

В.А. Быков (Москва), В.А. Вахитов (Уфа), А.А. Воробьев (Москва),  
В.Г. Дебабов (Москва), В.В. Зверев (Москва), А.И. Иваненко (Москва),  
В.Т. Иванов (Москва), Л.В. Калакуцкий (Пуцзино), М.П. Кирпичников (Москва),  
О.И. Киселев (Санкт-Петербург), А.И. Мирошников (Москва), Т.В. Овчинникова (Москва),  
О.Н. Озолин (Пуцзино), Е.Н. Орешкин (Москва), А.Н. Панин (Москва),  
Е.В. Пименов (Киров), В.О. Попов (Москва), Л.С. Сандахчиев (Новосибирск),  
К.Г. Скрябин (Москва), Г. Хаммерлинг (Германия), Р.М. Хаитов (Москва),  
В.И. Швец (Москва), Н.К. Янковский (Москва)

Журнал зарегистрирован в Росохранкультуре  
Рег. ПИ № ФС77-19745 от 11 апреля 2005 г.

Зав. редакцией О.В. Воробьева  
Адрес: 119296 Москва, Университетский пр-т, 9  
Тел.: 8-916-640-76-18, 8-903-143-99-14  
E-mail: obr@biorosinfo.ru, ptashka095@rambler.ru

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр  
медико-социальных проблем»  
Адрес: 127581 Москва, Керамический проезд, 53, кор. 1  
Тел.: 8-916-251-64-13  
E-mail: raifvasilov@hotmail.com

*Издается при поддержке  
Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова*

© Информационно-аналитический центр  
медико-социальных проблем, 2006.

---

---

**СОДЕРЖАНИЕ**

**Колонка главного редактора**

К читателям. *Р.Г.Василов* ..... 4

**Оригинальные статьи**

Сравнительный анализ электростатических и функциональных свойств  $\sigma^{70}$ -специфичных промоторов, содержащих олиго dA-последовательности.

*С.Г. Камзолова, П.М. Бескаравайный, А.А. Осипов, Т.Р. Дзелядин, А.А. Сорокин* ..... 5

Некоторые особенности биосинтеза хитиноподобных ферментов культурой *Streptomyces griseus* var. *streptomycini*.

*С.В. Авраменко, В.А. Галынкин, А.Н. Поздникина* ..... 11

Новая органическая форма йода для профилактики микроэлементозов.

*Л.В. Антипова, А.Р. Салихов* ..... 18

Константы Михаэлиса микробного электрода для условий электрокаталитического окисления субстрата при двух способах иммобилизации бактерий.

*Е.В. Чубарова, О.Н. Пономарева, Т.Н. Кувичкина, В.А. Богдановская, А.Н. Решетилов* ..... 25

Зависимость активности сайт-специфической эндонуклеазы *GlaI* от количества и положения метилированных цитозинов в узнаваемой последовательности 5'-GCGC-3'.

*Ю.Э. Томилова, В.А. Чернухин, С.Х. Дегтярев* ..... 30

Сравнительная характеристика методов RAPD и semi-RAPD для молекулярного маркирования редиса (*Raphanus sativus* L.).

*Т. В. Матвеева* ..... 40

**Краткие сообщения**

Использование капиллярного электрофореза для количественного определения глюкозаминилмурамилдипептида в гидролизатах молочнокислых бактерий.

*М.В. Гаврилин, С.П. Сенченко* ..... 46

**Обзоры**

Гены и белки, обеспечивающие деление клеток прокариот.

*И.Е. Вишняков, С.Н. Борхсениус* ..... 49

Биоразнообразие и доступ к генетическим ресурсам: анализ проблемы и прогноз.

*Л.В. Калакуцкий* ..... 63

**Страницы истории**

Из истории отечественной молекулярной биологии: к 100-летию со дня рождения А.Н. Белозерского.

*В.С. Воробьев* ..... 69

Юбилейные и знаменательные даты 2006 г. .... 74

**Хроника**

События первого полугодия 2006 г. .... 81

**Информация**

Предстоящие мероприятия 2006 года ..... 85

**Правила для авторов** ..... 86

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* ..... 4

Original articles

Comparative analysis of electrostatic and functional properties of  $\sigma^{70}$ -specific A-tracts containing promoters.  
*S.G. Kamzolova, P.M. Beskaravainy, A.A. Osypov, T.D. Dzhelyadin, A.A. Sorokin* ..... 5

Some features of chitinolytic enzymes biosynthesis in *Streptomyces griseus* var. *streptomycini* culture  
*S.V. Avramenko, V.A. Galynkin, A.N. Pozdnikina* ..... 11

A new organic form of iodine for a prophylaxis of microelementoses.  
*L.V. Antipova, A.R. Salikhov* ..... 18

Michaelis constants of microbial electrode for conditions of electrocatalytic substrate oxidation under two ways of bacterial immobilization.  
*E.V. Chubarova, O.N. Ponamoreva, T.N. Kuvitchkina, V.A. Bogdanovskaya, A.N. Reshetilov* ..... 25

Dependence of site-specific endonuclease *GlaI* activity on quantity and location of methylcytosines in recognition sequence 5'-GCGC-3'.

*J.E. Tomilova, V.A. Chernukhin, S.Kh. Degtyarev* ..... 30

Comparative characteristics of RAPD and semi-RAPD methods for molecular marking of radish (*Raphanus sativus* L.).  
*T.V. Matveeva* ..... 40

Short communications

Use of capillary electrophoresis for a quantitation of glucosaminylmuramyl dipeptide in lactic-acid bacteria hydrolyzates.  
*M.V. Gavrilin, S.P. Senchenko* ..... 46

Reviews

Genes and proteins providing cell division in prokaryotes.  
*I.E. Vishnyakov, S.N. Borhsenius* ..... 49

Biodiversity and access to genetic resources: the analysis of a problem and the forecast.  
*L.V. Kalakutsky* ..... 63

Pages of history

From history of Russian molecular biology: to the 100<sup>th</sup> anniversary from the date of A.N. Belozersky's birth.  
*V.S. Vorobyev* ..... 69

Anniversary and significant dates 2006 ..... 74

The chronicle

Events of the first half-year 2006 ..... 81

The information

Forthcoming actions 2006 ..... 85

Rules for authors ..... 86

## К читателям

Выпуском данного номера открывается очередной том журнала — второй, и соответственно журнал вступает во второй год своего существования. В течение предыдущего года отыскивалась адекватная форма, очерчивалась предметная область, устанавливались связи с квалифицированными авторами и т.д.

Выходящий в свет номер содержит ряд интересных работ, выполненных главным образом в академических учреждениях и охватывающих различные темы в сфере физико-химической биологии. Одна из них посвящена изучению рестриктаз — ДНК эндонуклеазы *GlaI* (работа сотрудников НПО «СибЭнзим», Новосибирск). Продолжается цикл публикаций по генетике растений, выполненных в Санкт-Петербургском университете. Исследователи из Пущино дали материалы по анализу электростатических и функциональных свойств специфичных промоторов, по вопросам создания биосенсоров и биотопливных элементов.

Представлены биотехнологические работы. Среди них — исследование В.А. Галынкина с коллегами по изучению биосинтеза хитинолитических ферментов в культуре, работа воронежских авторов (Л.В. Антипова, Р.Г. Салихов), посвященная изучению стабильности препаратов йодированных животных белков в пищевых системах.

Кроме оригинальных статей, помещены обзоры по актуальным проблемам. Так, например, И.Е. Вишняков и С.Н. Борхсениус собрали информативные материалы по цито- и биохимическим основам клеточного деления (септации) у прокариот. Крайне важный обзор подготовил член-корреспондент РАН Л.В. Калакуцкий. В нем анализируется проблема биоразнообразия, в том числе и ее такие значимые аспекты, как правовые основы регулирования использования биологических (генетических) ресурсов и т.д.

По традиции наполняется исторический раздел. На этот раз публикуются материалы к 100-летию юбилею со дня рождения А.Н. Белозерского, который отмечался в 2005 г. В прошлом номере об этом была помещена краткая заметка, а здесь собраны и обстоятельно проанализированы факты биографии и научной деятельности ученого. Приведены основные юбилейные и знаменательные даты 2006 года в области физико-химической биологии и биотехнологии. Дан список новых книг с аннотациями.

В разделе «Хроника» освещен ряд научных и научно-организационных мероприятий первого квартала 2006 г., которые имеют как прямое, так и опосредованное отношение к профилю журнала.

В журнале также обращается внимание актива Общества биотехнологов России и заинтересованных специалистов на проведение в Пущино в октябре 2006 г. очередного съезда Общества, который, как правило, оставляет существенный след и способствует объединению профессионалов в данной области.

**Главный редактор,  
вице-президент Общества биотехнологов России,  
профессор Р.Г. ВАСИЛОВ**

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ $\sigma^{70}$ -СПЕЦИФИЧНЫХ ПРОМОТОРОВ, СОДЕРЖАЩИХ ОЛИГО dA-ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

С.Г. КАМЗОЛОВА, П.М. БЕСКАРАВАЙНЫЙ, А.А. ОСИПОВ,  
Т.Р. ДЖЕЛЯДИН \*, А.А. СОРОКИН

*Институт биофизики клетки РАН, Пущино Московской обл.*

Вычислены профили распределения электростатического потенциала вокруг трех синтетических консенсус-подобных промоторов  $P_{s1}$ ,  $P_{s2}$ ,  $P_{s3}$  и их производных  $P_{s1}/A_3$ -40,  $P_{s1}/A_3$ -44,  $P_{s1}/A_3$ -48, содержащих олиго dA-последовательности (A-треки) в разных позициях в upstream области промоторной ДНК. Проведен сравнительный анализ электростатических свойств всех промоторов с их функциональным поведением. Найдены характеристические электростатические элементы в upstream области промоторов, содержащих A-треки, которые коррелируют с их функциональными свойствами. Обсуждается роль специфических электростатических характеристик промоторной ДНК как новых сигнальных элементов, принимающих участие в дифференцированном узнавании промоторов РНК-полимеразой.

*Ключевые слова:* промотор, A-треки, электростатический потенциал, РНК-полимераза ( $E\sigma^{70}$ ), узнавание.

Узнавание промоторов РНК-полимеразой и образование открытых промоторных комплексов являются центральными событиями инициации транскрипции в клетке. Основным компонентом промоторов *E. coli*, узнаваемых главной формой РНК-полимеразы ( $E\sigma^{70}$ ), является «коровая» область (от англ. «core»), которая включает последовательности от точки старта транскрипции +1 п.о. до позиции -40 п.о. Эта область содержит 2 консервативных мотива нуклеотидной последовательности — канонические гексануклеотиды ТАТААТ и ТТГАСА, расположенные на расстоянии -10 п.о. и -35 п.о. от точки начала транскрипции [1]. Показана роль этих гексануклеотидов как сигнальных элементов промоторов, участвующих в промоторно-полимеразном узнавании через взаимодействие их с двумя разными доменами  $\sigma$ -субъединицы РНК-полимеразы [2–6]. Известны некоторые детали этого взаимодействия: с одной стороны идентифицированы некоторые конкретные нуклеотиды, образующие функционально значимые контакты с белком [4, 5], с другой стороны, выявлены отдельные аминокислоты в обоих белковых доменах, формирующие специфические связи с функциональными группами канонических нуклеотидов [2, 3, 6].

Возможность формирования стереохимически благоприятных контактов между функционально значимыми аминокислотами двух активных центров  $\sigma$ -субъединицы РНК-полимеразы и соответствующими нуклеотидами двух сигнальных элементов промоторной ДНК для индивидуальных промоторов зависит от степени подобия их нуклеотидных последовательностей в -10 и -35 областях каноническим гексануклеотидам и «правильного» расстояния между ними, соответствующего 17 п.о. [1, 7]. Исходя из этого, было сформулировано «правило консенсусного промотора», позволяющее оценивать силу конкретного промотора на основании его структурного соответствия каноническим элементам и длине спейсерной ДНК [8]. В ряде случаев было продемонстрировано успешное применение этого правила, однако для многих промоторов не удалось обнаружить строгой корреляции между их активностью и структурной близостью соответствующих промоторных ДНК к консенсусному промотору [9–11].

Показано, что нуклеотидные последовательности, расположенные выше (upstream) и ниже (downstream) коровой области промотора, также влияют на функционирование и силу промотора [11, 12]. Для небольшого числа промоторов ( $\approx 15$ ) найдено, что помимо  $\sigma$ -субъединицы в прямой контакт с промоторной ДНК может вступать С-концевой домен  $\alpha$ -субъединицы [13]. Со стороны промоторов в контакт с  $\alpha$ -субъединицей вовлечены

\* Автор для переписки:

© 2006 г. Дজেлядин Т.Р.

142290 Пущино Московской обл.

E-mail: dzhelyadin@icb.psn.ru; kamzolova@icb.psn.ru

нуклеотидные последовательности длиной 25 п.о., находящиеся в разных положениях в upstream области [14]. Учитывая функциональную значимость этого участка, предложено считать его третьим сигнальным элементом промоторной ДНК (UP-элемент) [12, 13], который, однако, в отличие от двух канонических гексануклеотидов, не является универсальным. Следует отметить, что природа UP-элемента и характер его взаимодействия с  $\alpha$ -субъединицей находятся пока в процессе выяснения. Хотя в результате широкомасштабного мутационного отбора удалось получить конструкцию UP-элемента, которая наиболее эффективна во взаимодействии с  $\alpha$ -субъединицей [12], однако она не проявляет текстологической гомологии с естественными UP-элементами [13–16]. Более того, сами естественные UP-элементы, идентифицированные в разных промоторах, различаются по нуклеотидной последовательности, не обнаруживая каких-либо явных гомологичных участков [13–16]. Единственной общей особенностью всех изученных UP-элементов является их обогащенность А/Т-парами и наличие коротких А-треков.

Следует отметить, что последовательности, обогащенные А/Т-парами и содержащие А-треки, характеризуются особыми физическими свойствами, которые могут выступать в роли сигнальных элементов для РНК-полимеразы. Так, А/Т-богатые последовательности являются наиболее легкоплавкими участками в двунитовой ДНК, которые известны как предпочтительные мишени для взаимодействия с РНК-полимеразой [17–18]. Кроме того, А-треки проявляют черты неканонической В-формы ДНК и способствуют формированию устойчивого изгиба ДНК [19]. Наличие стабильных изгибов двойной спирали в upstream области промоторной ДНК характерно для многих промоторов и рассматривается как один из факторов, участвующих в формировании промоторной функции [19].

В последнее время появились также сведения о том, что в процесс промоторно-полимеразного узнавания вносят важный вклад электростатические взаимодействия между  $\alpha$ -субъединицей фермента и дальней upstream областью промоторной ДНК [20–23].

Таким образом, хотя точные механизмы взаимодействия  $\alpha$ -субъединицы с промоторами неизвестны, очевидно, что в нуклеотидной последовательности upstream области, особенностях структуры ДНК и ее физико-химических свойствах скрываются большие информационные возможности для формирования разнообразных сигнальных элементов. Отсутствие существенной гомологии в нуклеотидных последовательностях upstream

областей разных промоторов предполагает возможность альтернативного взаимодействия  $\alpha$ -субъединицы с разными элементами промоторной ДНК.

Предметом дальнейших исследований являются идентификация таких сигнальных элементов и выяснение механизмов участия их в промоторно-полимеразном узнавании для индивидуальных промоторов.

В данной работе изучены электростатические свойства трех синтетических консенсус-подобных промоторов  $P_{s1}$ ,  $P_{s2}$  и  $P_{s3}$  [24] и их производных  $P_{s1}/A_3$ -40,  $P_{s1}/A_3$ -44 и  $P_{s1}/A_3$ -48, содержащих конструкцию из А-треков в разных позициях в upstream области  $P_{s1}$  [25]. Все эти промоторы ранее были охарактеризованы по функциональным свойствам, включая их эффективность и кинетические параметры взаимодействия с РНК-полимеразой на разных стадиях комплексообразования и инициации транскрипции [24, 25]. Выбор этих промоторов для нашего исследования обусловлен необычным характером их функционального поведения, не соответствующего правилу «консенсусного промотора», что указывало на перспективность поиска в них новых сигнальных элементов, отличных от канонических промоторных детерминант. Полученные результаты свидетельствуют о том, что электростатические характеристики промоторной ДНК могут быть ответственны за взаимодействие с РНК-полимеразой на ранних этапах промоторно-полимеразного узнавания.

## Материалы и методы

Три синтетических промотора  $P_{s1}$ ,  $P_{s2}$  и  $P_{s3}$  и их биохимические характеристики взяты из [24]. Три производных промотора  $P_{s1}/A_3$ -40,  $P_{s1}/A_3$ -44 и  $P_{s1}/A_3$ -48, содержащие конструкцию из 3 пятичленных А-треков в разных позициях в upstream области  $P_{s1}$  промотора, взяты и охарактеризованы в соответствии с данными [25].

Вычисления распределения электростатического потенциала вокруг двойной спирали ДНК промоторов проведены с использованием оригинальной методики [20].

## Результаты и обсуждение

Нуклеотидные последовательности синтетических консенсус-подобных промоторов  $P_{s1}$ ,  $P_{s2}$  и  $P_{s3}$  даны на рисунке 1а. Промоторы  $P_{s2}$  и  $P_{s3}$  содержат канонические гексануклеотиды в -10 и -35 областях. Кроме того,  $P_{s3}$  имеет оптимальный спейсер между ними, соответствующий 17 п.о. В  $P_{s2}$  канонические гексануклеотиды

разделены спейсерной ДНК длиной 16 п.о. вследствие нуклеотидной делеции в -14 позиции. Таким образом,  $P_{s2}$  и  $P_{s3}$  идентичны по нуклеотидной последовательности, за исключением этой делеции. Промотор  $P_{s1}$  содержит -35 консенсусный гексануклеотид и консенсусный 17-членный спейсер, но его последовательность в -10 области отклоняется от канонического гексануклеотида на один нуклеотид вследствие замены А на Г в -12 положении. Степень гомологии нуклеотидных последовательностей консенсусному промотору [8] для промоторов  $P_{s1}$ ,  $P_{s2}$  и  $P_{s3}$  составляет 59, 61 и 71%, соответственно [24]. Показано, что все три промотора способны корректно инициировать специфический синтез РНК как *in vitro*, так и *in vivo* [24]. Однако оказалось, что активность промоторов не согласуется с «правилом консенсусного промотора». Так, сила промоторов  $P_{s1}$ ,  $P_{s2}$  и  $P_{s3}$  соответствует 3,4, 8,4 и 2,1, соответственно [24]. Таким образом,  $P_{s3}$ , наиболее близкий по последовательности консенсусному промотору, оказался самым слабым из трех промоторов. Он проявляет только  $1/4$  от активности самого сильного  $P_{s2}$  промотора. А  $P_{s1}$  и  $P_{s2}$ , обладающие сходными коэффициентами подобия, различаются в 2,5 раза по своей активности.

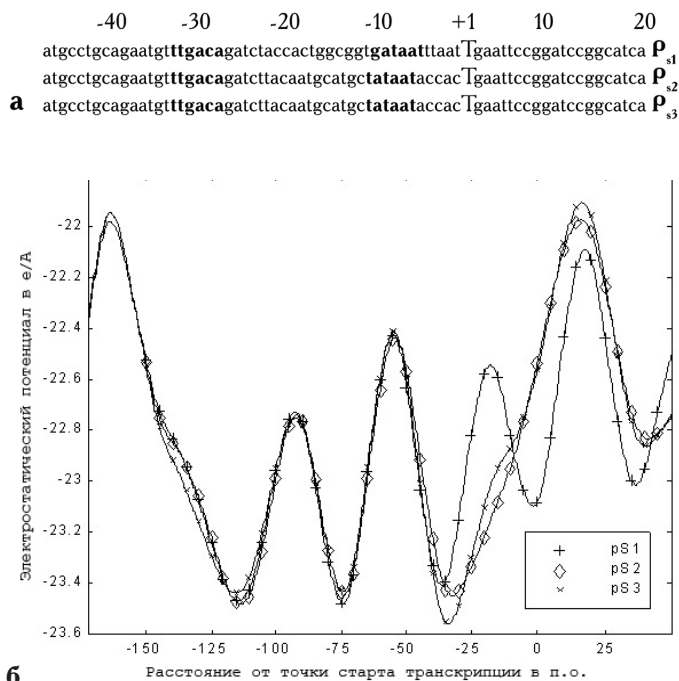


Рис. 1. Распределение электростатического потенциала вокруг двойной спирали ДНК, содержащей промоторы  $P_{s1}$ ,  $P_{s2}$  и  $P_{s3}$ : а) нуклеотидная последовательность промоторов; б) распределение электростатического потенциала

Кроме того, были исследованы кинетические характеристики взаимодействия РНК-полимеразы с  $P_{s1}$ ,  $P_{s2}$  и  $P_{s3}$  на разных стадиях комплексообразования и инициации транскрипции. Показано, что в суммарном процессе промоторно-полимеразного взаимодействия разные стадии являются скоростью лимитирующими у разных промоторов: для  $P_{s1}$  такой стадией является ранний этап, относящийся к присоединению РНК-полимеразы к промотору; в то же время для  $P_{s2}$  и  $P_{s3}$  скоростью лимитирующей оказывается более поздняя стадия, включающая образование иницирующего комплекса и «очистку» промотора [24].

Чтобы выяснить возможные причины столь различного функционального поведения структурно близких промоторов, были исследованы их электростатические свойства. Вычислено распределение электростатического потенциала вокруг фрагмента ДНК, содержащего эти промоторы. Полученные результаты представлены на рисунке 1б.

Интересно отметить, что электростатические профили похожи у промоторов  $P_{s2}$  и  $P_{s3}$ , активность которых лимитируется на поздней стадии образования продуктивного комплекса. В то же время  $P_{s1}$ , отличающийся от них скоростью лимитирующей стадией на раннем этапе, характеризуется другим профилем электростатического потенциала. Поскольку электростатические взаимодействия вносят свой вклад в активность промоторов на самых ранних стадиях промоторно-полимеразного узнавания [20, 22], разумно предположить, что различие в функционировании  $P_{s1}$  по сравнению с промоторами  $P_{s2}$  и  $P_{s3}$  может быть (по крайней мере, частично) объяснено различием в их электростатических свойствах. При этом в случае  $P_{s1}$  электростатическая компонента может играть роль как в определении силы промотора, так и в конкретизации пути его взаимодействия с ферментом. В случае  $P_{s2}$  и  $P_{s3}$  промоторов, которые характеризуются одним и тем же типом взаимодействия с РНК-полимеразой и обладают сходными электростатическими свойствами, какие-то другие факторы ответственны за непредсказуемое с позиции «правила консенсусного промотора» различие в их активности. Одним из таких факторов может быть разное пространственное расположение канонических сигнальных элементов в двух промоторах, что способно привести к разной стабильности открытых промоторных комплексов, в частности, к суперстабильности комплексов на  $P_{s3}$  промоторе [24]. Как известно, суперстабильные комплексы обладают меньшей продуктивностью в синтезе РНК из-за затрудненной «очистки» промотора



при инициации транскрипции, чем и может объясняться более низкая активность  $P_{s3}$  промотора.

Ранее было показано, что введение А-треков в upstream область  $P_{s1}$  промотора влияет на его активность, увеличивая ее [25]. Предполагается, что это обусловлено более эффективным связыванием РНК-полимеразы с производными промоторами вследствие образования дополнительных контактов А/Т-обогащенной upstream области с  $\alpha$ -субъединицей, однако, природа этих контактов остается неизвестной.

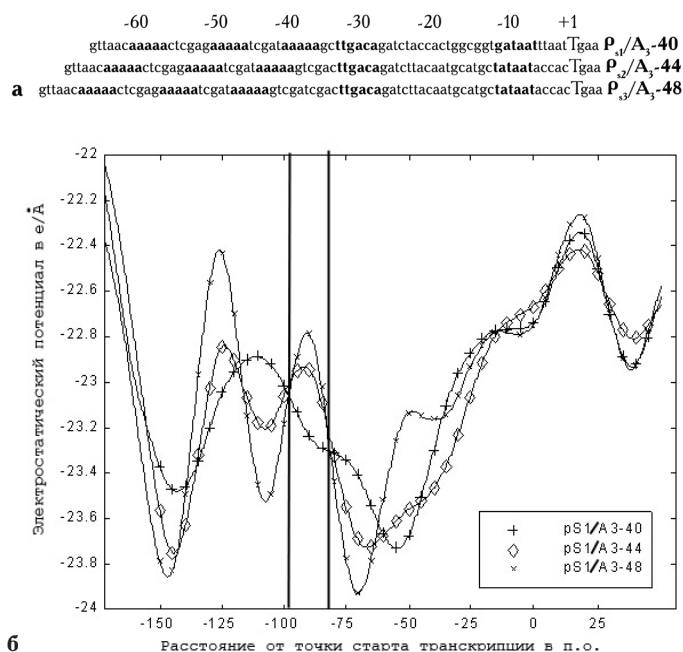
В наших работах было найдено, что в узнавании  $\alpha$ -субъединицей промоторной ДНК важную роль могут играть электростатические взаимодействия между ними, которые, однако, возможны только при наличии специфических электростатических сигналов в upstream области промоторов [20–23]. Поэтому мы решили исследовать, как введение А-треков в upstream область  $P_{s1}$  промотора влияет на его электростатические свойства в сравнении с функциональными последствиями.

Были использованы 3 производных  $P_{s1}$  промотора, содержащие конструкцию из трех пятичленных А-треков, которые ранее были детально охарактеризованы по функциональным свойствам [25]. Нуклеотидные последовательности этих производных  $P_{s1}/A_3$ -40,  $P_{s1}/A_3$ -44 и  $P_{s1}/A_3$ -48 представлены на рисунке 2а. Конструкция, содержащая А-треки, расположена в положении -40 п.о., -44 п.о. и -48 п.о. в промоторах  $P_{s1}/A_3$ -40,  $P_{s1}/A_3$ -44 и  $P_{s1}/A_3$ -48, соответственно.

Известно, что активность  $P_{s1}$  стимулируется введением А-треков во всех трех производных промоторах. Сила промоторов  $P_{s1}$ ,  $P_{s1}/A_3$ -40,  $P_{s1}/A_3$ -44 и  $P_{s1}/A_3$ -48 оказалась равной 3,4, 17,1, 10,6 и 10,8, соответственно [25]. Максимальная (пятикратная) активация наблюдалась для  $P_{s1}$ , содержащего А-треки в положении -40 п.о. Интересно отметить, что стимулирующий эффект был одинаковым (трехкратным) для производных  $P_{s1}/A_3$ -44 и  $P_{s1}/A_3$ -48, в которых расположение А-треков в отношении коровой области  $P_{s1}$  отличается почти на полвитка спирали. Это отвергает возможное объяснение стимуляции активности за счет появления в upstream области функционально значимых изгибов двунитевой ДНК, индуцируемых А-треками: для справедливости такого объяснения требуется расположение А-треков в двух промоторах на расстоянии, кратном витку спирали, что необходимо для корректного направления изгибов в одну сторону, благоприятную для взаимодействия с ферментом [19].

Для изучения влияния А-треков на электростатические свойства промоторов, проведено вычисление

распределения электростатического потенциала вокруг фрагмента ДНК, содержащего  $P_{s1}/A_3$ -40,  $P_{s1}/A_3$ -44 и  $P_{s1}/A_3$ -48.



б

Рис. 2. Распределение электростатического потенциала вокруг А-трек содержащих промоторов  $P_{s1}/A_3$ -40,  $P_{s1}/A_3$ -44 и  $P_{s1}/A_3$ -48: а) нуклеотидная последовательность промоторов; б) распределение электростатического потенциала

Полученные данные представлены на рисунке 2б. Видно, что введение А-треков в любое положение upstream области  $P_{s1}$  сильно влияет на электростатические свойства промотора, внося многочисленные изменения в его профиль (сравнить рис. 1б, кривая  $P_{s1}$ , и рис. 2б). Интересно, что изменение электростатического профиля охватывает многие нуклеотидные последовательности, включая те, которые находятся далеко от места введения А-треков. Хотя А-треки вводятся во всех промоторах в положении выше -40 п.о., однако изменения в распределении потенциала наблюдаются и в коровой области, и в downstream участках промоторной ДНК. Этот результат согласуется с нашими прежними данными об отсутствии прямой корреляции между нуклеотидной последовательностью и ее электростатическим профилем, тем самым подтверждая независимый характер промоторных сигнальных элементов, основанных на электростатических свойствах промоторной ДНК и ее первичной структуре [20–23].

Наибольший интерес для нашей задачи представляют электростатические свойства ДНК в далекой

upstream области промоторов, соответствующей нуклеотидной последовательности -75 п.о. — -100 п.о. (указано вертикальными линиями на рис. 2б), так как этот участок может быть вовлечен в электростатические взаимодействия с  $\alpha$ -субъединицей [20, 22]. Как следует из рисунка 2б, промоторы  $P_{s1}/A_3$ -44 и  $P_{s1}/A_3$ -48, которые отвечают одинаковой активацией на введение А-треков, характеризуются сходными электростатическими профилями в далекой upstream области. Оба промотора содержат в этой области специфический электростатический элемент, отличительной особенностью которого является его колоколообразный характер с более отрицательным потенциалом по обе стороны колокола и протяженным максимумом при -80 п.о. — -90 п.о. В целом, этот участок отличается более высоким потенциалом по сравнению с соседними областями, что характерно для таких промоторов как P131.7 фага T4 и glnABP1-3939139 *E.coli* [20,22].

В противоположность этому промотор  $P_{s1}/A_3$ -40, который отличается от  $P_{s1}/A_3$ -44 и  $P_{s1}/A_3$ -48 гораздо большим стимулирующим эффектом на введение А-треков, характеризуется другим профилем распределения потенциала в указанном участке промоторной ДНК. При -75 п.о. — -80 п.о. потенциал является максимально отрицательным, затем величина потенциала постепенно увеличивается, достигая максимального значения в соседнем более далеком upstream участке при -115 п.о. Такое распределение потенциала напоминает специфический элемент рибосомального промотора *E.coli* glnABP1-4032828 и промотора фага T4 P164.5 [20, 22]. Общей особенностью для них является более отрицательное значение потенциала по сравнению с соседней более далекой upstream областью.

Как было показано, в случае промоторов фага T4 присутствие различных характеристических электростатических элементов в upstream области промоторной ДНК приводит к различию во взаимодействии их с  $\alpha$ -субъединицей РНК-полимеразы, обеспечивая тем самым дифференцированный ответ в функционировании разных промоторов [20–23].

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что электростатические профили трех А-трек содержащих промоторов могут быть классифицированы на основе присутствия в них функционально значимых специфических элементов, которые могут быть вовлечены в дифференцированное узнавание промоторной ДНК  $\alpha$ -субъединицей РНК-полимеразы, объясняя тем самым различие в их функциональном поведении.

*Авторы выражают благодарность Э.Г. Савельевой за всестороннюю техническую помощь в работе.*

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Министерства промышленности и науки Московской области, грант № 04-04-97275.*

## Литература

1. Harley C. B., Reynolds R. Analysis of Escherichia coli promoter sequences // Nucl. Acids Res. — 1987. — Vol. 15. — P. 2343–2361.
2. Dombroski A.J., Walter W.A., Record M.T. Jr., Siegel D.A. and Gross C.A. Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor  $\sigma^{70}$  exhibit specificity of binding to promoter DNA // Cell. — 1992. — Vol. 70. — P. 501–512.
3. Joneto M., Gribskov M., Gross C.A. The  $\sigma^{70}$  family: sequence conservation and evolutionary relationships // J. Bacteriol. — 1992. — Vol. 174. — P. 3843–3849.
4. Waldburger C., Gardella T., Wong B., Susskind M.M. Changes in conserved region 2 of Escherichia coli  $\sigma^{70}$  affecting promoter recognition // J. Mol. Biol. — 1990. — Vol. 215. — N 2. — P. 267–276.
5. Zuber P., Healy J., Carter H.L. 3rd, Cutting S., Moran C.P. Jr., Losick R. Mutation changing the specificity of an RNA polymerase sigma factor // J. Mol. Biol. — 1989. — Vol. 206. — N 4. — P. 605–614.
6. Malhotra A., Severinova E., Darst S.A. Crystal structure of a  $\sigma^{70}$  subunit fragment from Escherichia coli RNA polymerase // Cell. — 1996. — Vol. 87. — P. 127–136.
7. Hawley D., McClure W.R. Compilation analysis of Escherichia coli promoter DNA sequences // Nucl. Acids Res. — 1983. — Vol. 11. — P. 2237–2255.
8. Mulligan M.E., Hawley D.K., Enriken R., McClure W.R. Escherichia coli promoter sequences predict in vitro RNA polymerase selectivity // Nucl. Acids Res. — 1984. — Vol. 12. — P. 789–800.
9. Horwitz M.S., Joeb L.A. DNA sequences of random origin as probes of Escherichia coli promoter architecture // J. Biol. Chem. — 1988. — Vol. 263. — P. 14724–14731.
10. Grana D., Gardella T., Susskind M.M. The effect of mutations in the ant promoter of phage P22 depends on context // Genetics. — 1988. — Vol. 120. — P. 319–327.
11. Bujard H., Brenner M., Deuschle U., Kammerer W., Knaus R. Structure-function relationship of Escherichia coli promoters. In: RNA polymerase and the Regulation of Transcription. Reznikoff W.S. et al. (eds.), Elsevier, New York, 1987. — P. 95–104.
12. Estrem Sh.T., Gaal T., Ross W., Gourse R.L. Identification of UP element consensus sequence for bacterial promoters

- // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — Vol. 95. — P. 9761–9766.
13. Ross W., G.K.K., Solomon Y., Igarashi K., Zou C., Ishihama A., Severinov K., Gourse R.L. The third recognition element in bacterial promoters. DNA binding by the  $\alpha$  subunit of RNA polymerase // Science. — 1993. — Vol. 262. — P. 1407–1413.
  14. Negre D., Bonod-Bidaud C., Oudot C., Prost J.F., Kolb A., Ishihama A., Cozzone A.J., Cortay J.C. DNA flexibility of the UP element is a major determinant for transcriptional activation at the Escherichia coli acetate promoter // Nucl. Acids Res. — 1997. — Vol. 25. — P. 713–718.
  15. van Ulsen P., Hillebrand M., Kainz M., Collard R., Zulianello L., van de Putte P., Gourse R. L., Goosen N. Function of the C-terminal domain of the alpha subunit of Escherichia coli RNA polymerase in basal expression and integration host factor-mediated activation of the early promoter of bacteriophage Mu // J. Bacteriol. — 1997. — Vol. 179. — P. 530–537.
  16. Jardini P., Bown J.A., Volkert M.R., Busby S.J. Ada protein — RNA polymerase  $\sigma$  subunit interaction and  $\alpha$  subunit — promoter DNA interaction are necessary at different steps in transcription initiation at the E. coli ada and aid B promoters // J. Biol. Chem. — 1998. — Vol. 273. — P. 13307–13312.
  17. Kamzolova S.G., Postnikova G.B. Spin-labeled nucleic acids // Quart. Rev. Biophys. — 1981. — Vol. 14. — P. 223–288.
  18. Камзолова С.Г., Иванова Н.Н., Камзалов С.С., Якушевич Л.В. Конформационный анализ комплексов РНК-полимеразы E. coli с ДНК // Биофизика. — 1998. — Т. 43. — С. 433–437.
  19. Perez-Martin I., Rojo F., de Lorezo V. Promoters responsive to DNA bending: a common theme in prokaryotic gene expression // Microbiol Rev. — 1994. — Vol. 58. — P. 268–280.
  20. Kamzolova S.G., Sivozhelezov V.S., Sorokin A.A., Dzhelyadin T.R., Ivanova N.N., Polozov R.V. RNA Polymerase — Promoter Recognition. Specific Features of Electrostatic Potential of «early» T4 Phage DNA Promoters // J. Biomol. Struct. Dyn. — 2000. — Vol. 18(3). — P. 325–334.
  21. Камзолова С.Г., Сорокин А.А., Осипов А.А., Бескаравайный П.М. Общие закономерности формирования  $\sigma^{70}$ -специфичных промоторов в геноме E. coli на основе электростатических характеристик промоторной ДНК // Биофизика. — 2005. — Т. 50. — № 3. — С. 444–449.
  22. Kamzolova S.G., Sorokin A.A., Dzhelyadin T.R., Beskaravainy P.M., Osypov A.A. Electrostatic potentials of E.coli genome DNA // J. Biomol. Struct. Dyn. — 2005. — Vol. 23(3). — P. 341–346.
  23. Kamzolova S.G., Sorokin A.A., Beskaravainy P.M., Osypov A.A. Comparative analysis of electrostatic patterns for promoter and non promoter DNA / In: Bioinformatics of genome regulation and structure II. Kolchanov N., Hofstaedt R., Milanesi Z., eds. Springer Science Business Media Inc., 2006. — P. 67–74.
  24. Ellinger T., Behnke D., Bujard H., Gralle J.D. Stalling of Escherichia coli RNA polymerase in the +6 to +12 region in vivo is associated with tight binding to consensus promoter elements // J. Mol. Biol. — 1994. — Vol. 239. — P. 455–465.
  25. Ellinger T., Behnke D., Knaus R., Bujard H., Gralle J.D. Context-dependent effects of upstream A-tracts // J. Mol. Biol. — 1994. — Vol. 239. — P. 466–475.

## COMPARATIVE ANALYSIS OF ELECTROSTATIC AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF $\sigma^{70}$ -SPECIFIC A-TRACTS CONTAINING PROMOTERS

S.G. KAMZOLOVA, P.M. BESKARAVAINY, A.A. OSYPOV,  
T.D. DZHELYADIN, A.A. SOROKIN

*Institute of Cell Biophysics of RAS, Pushchino, Moscow region*

Distribution of electrostatic potential of three synthetic consensus-like promoters  $P_{s1}$ ,  $P_{s2}$ ,  $P_{s3}$  and their derivatives containing A-tracts at different position in upstream region  $P_{s1}/A_3$ -40,  $P_{s1}/A_3$ -44,  $P_{s1}/A_3$ -48 was calculated. Electrostatic patterns of all promoters were analyzed and compared with their functional behavior. Some specific electrostatic motifs were found in upstream region of A-tracts containing promoters that may be involved as signal elements in differential recognition of promoter DNA by RNA polymerase  $\alpha$ -subunit.

*Keywords:* promoter, A-tracts, electrostatic potential, RNA-polymerase ( $E\sigma^{70}$ ), recognition.

## НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА ХИТИНОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ КУЛЬТУРОЙ *STREPTOMYCES GRISEUS* VAR. *STREPTOMYCINI*

С.В. АВРАМЕНКО, В.А. ГАЛЫНКИН\*, А.Н. ПОЗДНИКИНА

ГОУ ВПО Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия

Изучены некоторые параметры биосинтеза хитинолитических ферментов культурой *Streptomyces griseus* var. *streptomycini* в процессе глубинного культивирования на среде с неочищенным кристаллическим хитином. Показано, что активность компонентов хитинолитического комплекса коррелирует с фазами роста и развития продуцента. Определено оптимальное время культивирования исследуемого штамма при данных условиях. Изучена зависимость биосинтетической активности продуцента от степени обработки хитина, а также влияние дополнительных источников углеводного питания на биосинтез хитиназа.

**Ключевые слова:** хитинолитические ферменты, *Streptomyces*, биосинтез, глубинное культивирование.

Хитин — линейный  $\beta$ -1,4-связанный аминополисахарид, мономерным звеном которого является N-ацетил-D-глюкозамин. Будучи одним из наиболее распространенных в природе биополимеров (занимает второе место после целлюлозы), хитин является строительным компонентом наружного скелета членистоногих (насекомых, ракообразных), а также входит в состав клеточной стенки грибов и некоторых водорослей. У большинства организмов хитин ассоциирован с другими полимерами, например, с белками или глюканами [1].

Так как хитин практически нерастворим в воде, интерес представляет процесс деполимеризации хитина с целью получения его водорастворимых производных — хитодекстринов, N-ацетил-D-глюкозамина и глюкозамина, имеющих широкую область применения. В частности, хитоолигосахариды при степени полимеризации 5-6 обладают выраженной противоопухолевой и бактериостатической активностью [2]. N-ацетил-D-глюкозамин и глюкозамин, являясь компонентами протеогликана хрящей, используются для лечения остеоартритов и регенерации хрящевых тканей. Глюкозамин также может применяться для устранения дефицита мукополисахаридов в организме [3].

Структурная деполимеризация хитина может быть осуществлена как химическим, так и энзиматическим способом. Преимущества ферментативной деполимеризации хитина перед химической связаны, прежде всего, с отсутствием частичного деацетилирования получаемых олигомеров и возможностью получения стандартного продукта с заданными характеристиками. При этом процесс ферментативного гидролиза является саморегулируемым и протекает, как правило, в гомогенных условиях (в растворе) с высоким выходом [4].

Для получения хитоолигосахаридов различной степени полимеризации возможно применение ферментов неспецифического действия (например, папаина) [5] или специфических ферментов — хитиназ, осуществляющих катализ реакции гидролиза  $\beta$ -гликозидных связей между двумя соседними мономерными звеньями в хитине. Полная ферментативная деполимеризация хитина с образованием свободного N-ацетил-D-глюкозамина осуществляется комплексом хитинолитических ферментов, действие которых является синергичным и последовательным [1].

Хитинолитические ферменты также используются при решении теоретических и практических задач биотехнологии, например, для энзиматического протопластирования клеток дрожжевых и мицелиальных грибов при биохимических, генетических и молекулярно-биологических исследованиях. Известно, что хитинолитические ферменты индуцируют лизис опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* [6], что указывает на перспективность их применения при создании противоопухолевых препаратов.

\* Автор для переписки:

© 2006 г. Галынкин В.А., профессор, д.т.н., зав. кафедрой микробиологии, ГОУ ВПО Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия 191186 Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 14  
Тел./факс: (812) 315-24-96  
E-mail: jorga-81@yandex.ru

Также хитиназы могут быть использованы в качестве биохимического реактива при количественном и качественном определении хитина в составе клеточной стенки грибов и других биологических объектах.

Хитинолитические ферменты широко распространены в живых организмах. В зависимости от происхождения они выполняют разную биологическую роль, отличаются по структуре, субстратной специфичности и ряду биохимических свойств [7]. В настоящее время в наибольшей степени изучены хитиназы микроорганизмов. Способностью утилизировать хитин обладают как бактерии (*Streptomyces*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Vibrio*, *Cytophaga*), так и микроскопические грибы (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* и др.) [7, 8, 9, 10, 11].

В результате скрининга, проведенного среди культур актиномицетов, нами был отобран перспективный для дальнейшего изучения штамм-продуцент хитинолитических ферментов *Streptomyces griseus var. streptomycini* [12]. Отличительной особенностью хитиназного комплекса этой культуры является способность к активному гидролизу как коллоидной, так и кристаллической форм хитина.

Целью настоящей работы было исследование биосинтетической активности продуцента и некоторых его физиологических особенностей в зависимости от фаз роста и развития в процессе глубинного культивирования на среде с кристаллическим хитином, изучение влияния степени обработки хитина, а также влияния дополнительных источников углеводного питания на уровень активности хитинолитических ферментов.

## Материалы и методы

Объектом исследования являлся штамм актиномицета из коллекции культур микроорганизмов музея кафедры микробиологии СПХФА *Streptomyces griseus var. streptomycini*.

При глубинном культивировании исследуемого штамма использовали ферментационную среду следующего состава, %:  $\text{NaNO}_3$  — 0,2;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,05;  $\text{KCl}$  — 0,05;  $\text{FeSO}_4$  — 0,0015; дрожжевой экстракт — 0,1; пептон — 0,2; неочищенный кристаллический измельченный хитин панциря ракообразных с размером частиц 0,1–0,2 мм (процесс измельчения проводили в шаровой мельнице) — 1,0%; рН среды после стерилизации — 6,5. Посевная среда отличалась от ферментационной содержанием хитина, количество которого составляло 0,5%. Посевной мате-

риал получали в течение 48 часов. Количество посевного материала для засева ферментационной среды составляло 4% от объема среды. Процесс культивирования проводили при температуре 28–30 °С, в качалочных колбах объемом 750 мл (объем среды в колбе 75 мл) при частоте вращения 220 об/мин.

Кристаллический очищенный хитин был получен путем последовательного обеззоливания, депротеинирования и обезжиривания по стандартным методикам [13]. Коллоидный хитин получали из очищенного согласно методике, описанной Л.А. Трачук, с применением концентрированной соляной кислоты [14].

Для определения содержания белка в хитине проводили щелочную экстракцию 1 N NaOH при температуре  $121 \pm 2$  °С (в автоклаве при избыточном давлении 0,1 МПа), после чего определяли количество белка по модифицированному методу Лоури [15].

Молекулярную массу определяли вискозиметрическим методом по величине характеристической вязкости раствора хитина с использованием вискозиметра Убеллоде. В качестве растворителя использовали N,N-диметилацетамид с 5% LiCl, измерения относительной вязкости раствора проводили при температуре 25 °С, для расчета молекулярной массы использовали формулу [16]:

$$[\eta] = 2,4 \cdot 10^{-3} \cdot M^{0,69},$$

где  $[\eta]$  — характеристическая вязкость.

Хитиназную активность определяли по количеству редуцирующих сахаров, образующихся в результате гидролиза коллоидного хитина, по реакции с хлористым 2,3,5-трифенилтетразолием. Реакционная смесь состояла из 3 мл 0,5% суспензии коллоидного (размер частиц 0,1–0,2 мм) или очищенного кристаллического (размер частиц менее 0,1 мм) хитина, 3 мл 0,2 M Na-фосфатного буфера и 1 мл нативного раствора. Для проведения ферментативного гидролиза пробы выдерживали в течение 1 часа при 37 °С. По окончании реакции хитин отделяли центрифугированием с последующим фильтрованием. В фильтрате определяли содержание редуцирующих сахаров. За единицу активности принимали количество фермента, под действием которого образуется 1 мкМ N-ацетилглюкозамина в течение 1 часа в условиях реакции.

Определение белка в культуральной жидкости проводили по модифицированному методу Лоури [15].

Количество биомассы и органического вещества в процессе культивирования определяли согласно методике [17].

## Результаты и обсуждение

При разработке биотехнологического процесса получения биологически активных веществ одним из первых этапов является оптимизация условий культивирования, цель которой заключается в увеличении биосинтетической активности продуцента. В связи с этим, в первую очередь, необходимо изучить динамику изменения параметров роста и развития культуры, а также биосинтеза целевого продукта, что позволит установить взаимосвязь между этими процессами и дать им количественную характеристику. Для этого в процессе культивирования исследуемого штамма определяли следующие параметры: содержание белка, редуцирующих сахаров, хитиноподобную активность по кристаллическому и коллоидному хитину, количество биомассы и органического вещества (хитина). Результаты представлены на рисунках 1–5.

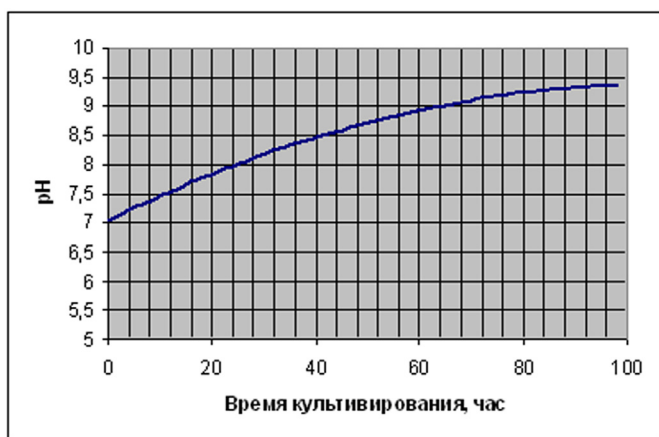


Рис. 1. Изменение pH в процессе культивирования *Str. griseus var. Streptomycini*

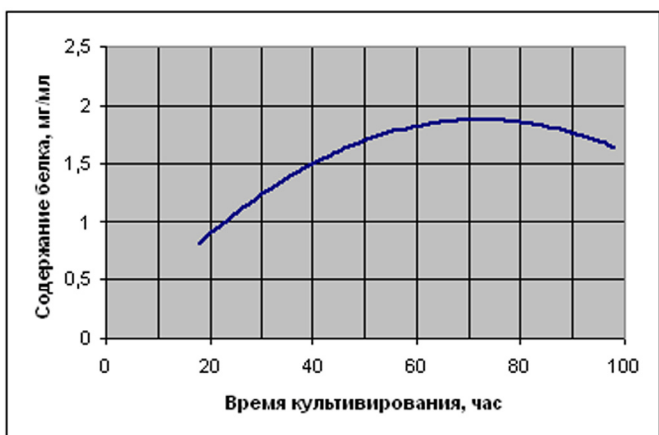


Рис. 2. Изменение содержания белка в процессе культивирования *Str. griseus var. streptomycini*

На одной из первых стадий культивирования, а именно: на стадии логарифмического роста (20–36 часов) — происходит интенсивное накопление биомассы (рис.3). В этот же период начинается активный биосинтез хитиназы (рис. 5), при этом содержание органического вещества (хитина) уменьшается (рис. 3). Нужно отметить, что процессы накопления ферментов в среде и соответственно гидролиз хитина с образованием редуцирующих веществ и их утилизация продуцентом протекают одновременно. В каждый момент времени существует определенное равновесие между этими процессами. Увеличение содержания редуцирующих сахаров и белка в культуральной жидкости (рис. 2, 4) указывает на то, что скорость биосинтетических процессов превышает скорость процессов утилизации продуктов гидролиза хитина. Интересно, что биосинтез хитиназы, активной по отношению к коллоидному хитину, начинается на более ранних сроках, чем образование фермента, имеющего сродство к кристаллическому хитину,

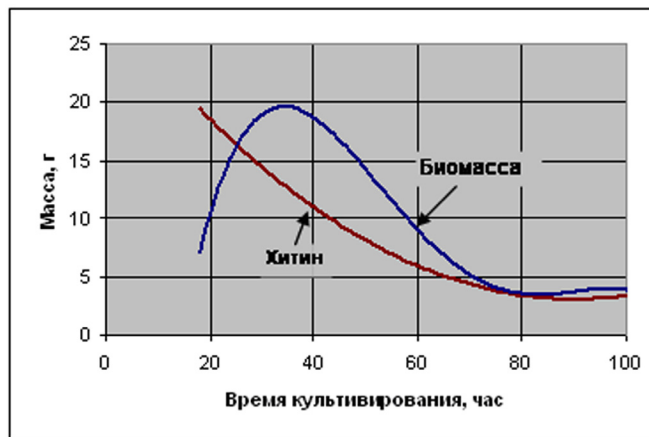


Рис. 3. Динамика изменения биомассы и органического вещества в процессе культивирования *Str. griseus var. Streptomycini*



Рис. 4. Изменение содержания редуцирующих сахаров в процессе культивирования *Str. griseus var. streptomycini*

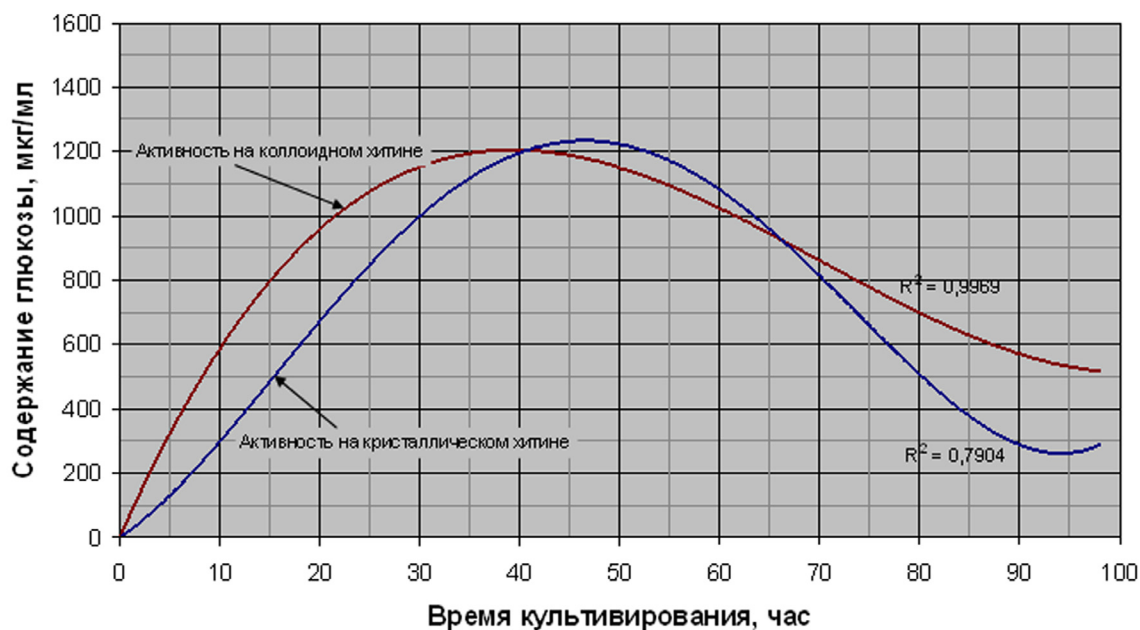


Рис. 5. Изменение хитиноподобной активности в процессе культивирования *Str. griseus var. streptomycini*

что, по-видимому, связано с необходимостью присутствия хитоолигосахаридов или N-ацетил-D-глюкозамина в среде для индукции его синтеза (рис. 5).

Наибольшее количество ферментов экскретируется в культуральную жидкость на вторые сутки культивирования (38–54 часов), в стадии замедления роста продуцента. Этот период характеризуется максимальным содержанием редуцирующих сахаров и белка, что свидетельствует о высокой биосинтетической активности культуры. Начиная с 60 часов хитиноподобная активность продуцента резко уменьшается.

Таким образом, оптимальное время культивирования продуцента *Streptomyces griseus var. streptomycini* при данных условиях составляет 46–52 часа.

Нативный хитин, обладая жесткой кристаллической структурой, является трудноутилизуемым субстратом. Его химическая обработка с целью повышения биологической доступности представляет собой многостадийный (деминерализация, депротенирование, получение коллоидной формы), трудоемкий и энергозатратный процесс с использованием агрессивных сред и поэтому не всегда является рациональной с технологической и экономической точек зрения.

Согласно данным литературы, панцирь ракообразных наряду с хитином содержит минеральную часть, представленную преимущественно фосфатами и карбонатами кальция, а также белки, липиды, мела-

нины и другие пигменты [4]. Известно, что белковая составляющая панциря может оказывать неодинаковое влияние на уровень хитиноподобной активности различных продуцентов. Так, например, при биосинтезе хитиназ бактериями *Serratia marcescens* используется высокоочищенный депротенированный хитин [18]. В то же время бактериальные клетки *Aeromonas liquefaciens* проявляют больший уровень хитиназной активности на среде с деминерализованным панцирем, содержащим белок [19]. Для бактерий *Serratia marcescens* также было установлено, что уменьшение размера частиц хитина и переводение его в коллоидную форму интенсифицируют биосинтез хитиноподобных ферментов [18].

Определены некоторые характеристики хитина, который был использован в качестве индуктора биосинтеза хитиноподобных ферментов (табл. 1).

Для оценки влияния некоторых характеристик субстрата (форма хитина, степень измельчения, степень чистоты) на биосинтетическую активность *Streptomyces griseus var. streptomycini* при глубинном культивировании исследуемого штамма в качестве источника органического вещества использовали хитин панциря ракообразных различной степени подготовки, а именно: неочищенный кристаллический хитин разной степени измельчения (фракция I с размером частиц менее 0,1 мм, фракция II — 0,1–0,2 мм, фракция III — 0,2–0,4 мм) и очищенный

хитин (фракция II) в кристаллической и коллоидной формах. В качестве сравнения использовался кристаллический неочищенный хитин (фракция II), хитиназная активность на котором принята за 100%.

**Таблица 1**  
**Характеристика субстрата (хитина)**

Параметр	Неочищенный хитин	Очищенный хитин
Зольность, %	1,35±0,03	0,43±0,01
Влажность, %	8,80±0,06	6,05±0,03
Содержание белка, %	2,25±0,01	0,70±0,01
Молекулярная масса, кДа	Не определялась	66,40±0,30

Установлено, что степень измельчения хитина не оказывает существенного влияния на уровень активности хитиназ исследуемого штамма *Streptomyces griseus var. streptomycini* (рис. 6).

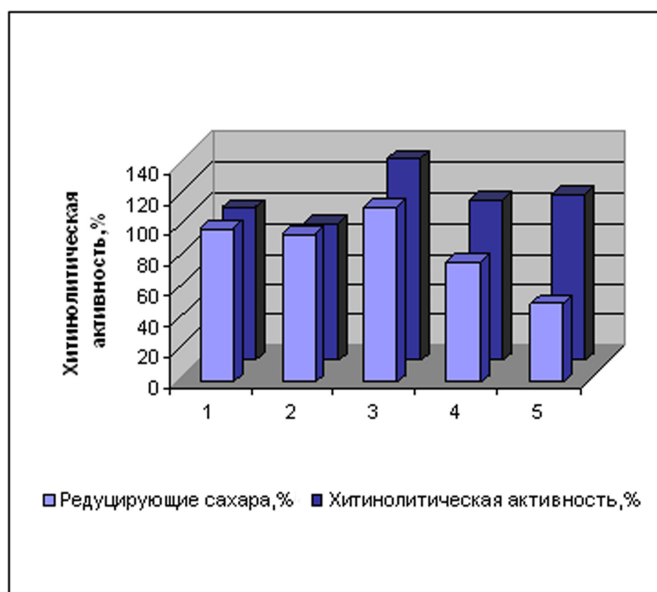


Рис. 6. Влияние степени обработки хитина на уровень активности хитинолитических ферментов. 1 – кристаллический неочищенный хитин, размер частиц 0,1–0,2 мм; 2 – кристаллический очищенный хитин, размер частиц 0,1–0,2 мм; 3 – коллоидный очищенный хитин, размер частиц 0,1–0,2 мм; 4 – кристаллический неочищенный хитин, размер частиц менее 0,1 мм; 5 – кристаллический неочищенный хитин, размер частиц 0,2–0,4 мм

Низкое содержание редуцирующих сахаров в культуральной жидкости в случае использования крупномолотой фракции хитина (III) свидетельствует о том, что непосредственно хитин практически не утилизируется продуцентом, однако эффективно индуцирует биосинтез хитинолитических ферментов. Так как субстрат подвергается конверсии в незначительной степени, то возможна его вторичная утилизация в производственном цикле.

Компонентный состав хитина также практически не влияет на биосинтетическую активность культуры.

При использовании в качестве субстрата коллоидной формы хитина наблюдалось увеличение уровня активности на 33% по сравнению с кристаллической формой, что связано с существенным облегчением доступа фермента к гликозидным связям полимера. Секретируемый фермент по мере накопления в среде активно гидролизует коллоидный хитин. По-видимому, образующиеся при этом хитоолигомеры усиливают индукционный эффект субстрата, что приводит к увеличению уровня активности хитинолитических ферментов.

Для некоторых продуцентов хитиназ, в частности, для *Serratia marcescens* и *Streptomyces plicatus*, было отмечено положительное влияние на уровень биосинтеза ферментов сахарозы и маннозы, внесение которых в среду в качестве легкоутилизируемого источника углерода в дополнение к хитину увеличивало выход хитинолитических ферментов на 20–50% [18, 20].

В связи с этим представляло интерес оценить влияние дополнительных источников углеводного питания на биосинтетическую активность исследуемого штамма.

В качестве дополнительных источников углеводного питания использовали сахарозу и маннозу, которые были добавлены в среду с кристаллическим неочищенным хитином (фракция II) в количестве 0,5 и 1%. Активность на среде с хитином была принята за 100%.

Добавление в среду сахарозы не приводило к значительным изменениям продуктивности изучаемого продуцента (рис. 7). Однако при внесении в среду маннозы в количестве 1,0% наблюдалось увеличение биосинтетической активности в 3 раза, тогда как содержание редуцирующих сахаров увеличилось в 20 раз. По-видимому, присутствие маннозы в ферментационной среде способствует ускорению биосинтетических процессов и соответственно уменьшению времени максимального накопления хитинолитических ферментов.



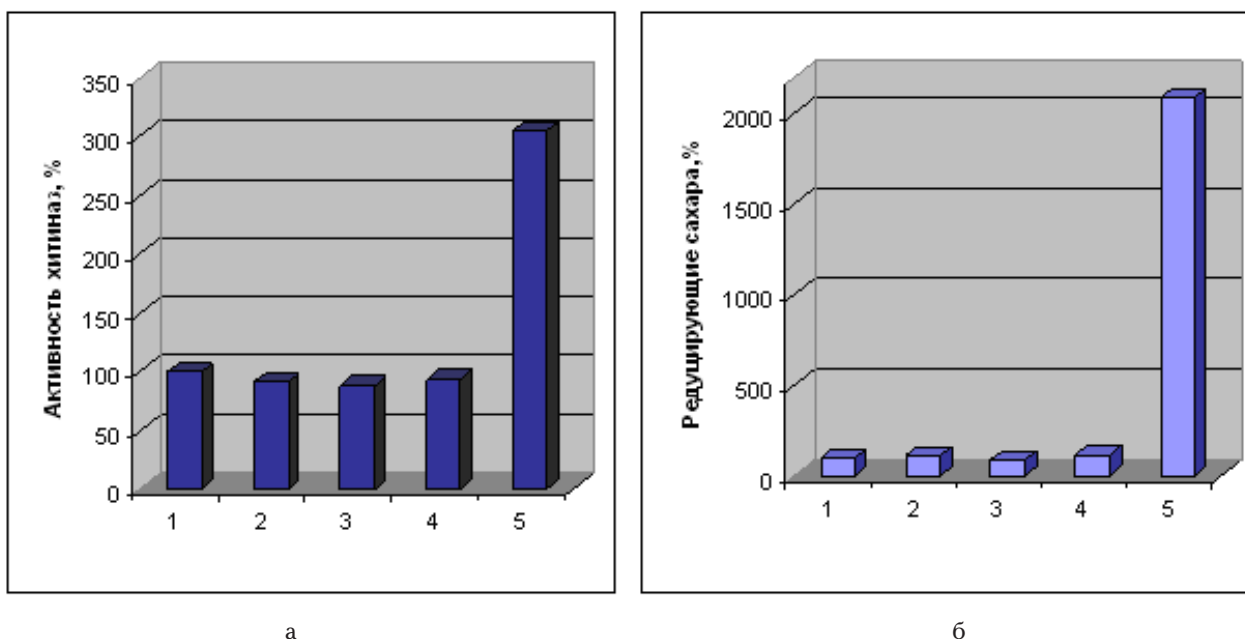


Рис. 7. Влияние дополнительного источника углеводного питания на биосинтез хитиназ (а — активность хитиназ, б — редуцирующие сахара).

- 1 — хитин 1%,
- 2 — хитин + сахароза 0,5%,
- 3 — хитин + сахароза 1,0%,
- 4 — хитин + манноза 0,5%,
- 5 — хитин + манноза 1,0%.

### Заключение

Таким образом, в ходе проведенного исследования было определено оптимальное время культивирования исследуемого штамма-продуцента *Streptomyces griseus var. streptomycini*, которое составило 46–52 часа. Установлено, что биосинтетическая активность продуцента практически не зависит от степени измельчения хитина и его компонентного состава. Переведение хитина в коллоидную форму усиливает биосинтетическую активность продуцента благодаря более высокой скорости накопления хитоолигосахаридов в среде и проявляющемуся за счет этого синергичному индукционному эффекту хитина и хитоолигомеров. Введение маннозы в количестве 1,0% в качестве дополнительного легкоутилизируемого источника углеводного питания в ферментационную среду увеличивает биосинтетическую активность продуцента в 3 раза.

Результаты проведенного исследования имеют важное практическое значение при разработке биотехнологического процесса получения хитинолитических ферментов.

### Литература

1. Reetarani S.P., Ghormade V., Deshpande M.V. Chitinolytic enzymes: an exploration // *Enzyme Microbiol. Technol.* — 2000. — Vol. 226. — P. 473–483.
2. Стояченко И.А., Варламов В.П. Очистка и некоторые свойства хитиназ из *Streptomyces kurssanovii* // *Биотехнология.* — 1993. — № 2. — С. 29–36.
3. Ильина А.В. и др. Ферментативный гидролиз  $\alpha$ -хитина // *Прикладная биохимия и микробиология.* — 2004. — Т. 40, № 1. — С. 42–45.
4. *Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение* / Под ред. К.Г. Скрыбина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. — М.: Наука, 2002. — 368 с.
5. Алексеева М.Ф. и др. Деструкция хитина и хитозана неспецифическими ферментами // *Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: Материалы Седьмой Международной конференции, Санкт-Петербург — Репино, 15–18 сентября 2003 г.* — М.: Изд-во ВНИРО, 2003. — С. 384–387.
6. Pan Xing Q. etc. Chitinase induces lysis of MCF-7 cells in culture and of human breast cancer xenograft B11-2 in SCID mice // *Anticancer Research.* — 2005. — Vol. 25. — N 5. — P. 3167–3172.

7. Dahiya N., Tewari R., Hoondal G.S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2005 Oct. – P. 1–10.
8. Liu B.-L. etc. Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation // *Enzyme Microbiol. Technol.* – 2003. – Vol. 33. – P. 410–415.
9. Vaidya R., Vyas P., Chhatpar H.S. // *Enzyme Microbiol. Technol.* – 2003. – Vol. 33. – P. 92–96.
10. Мелентьев А.И. и др. Хитинолитическая активность бактерий рода *Bacillus* – антагонистов микромицетов // Новые достижения в исследовании хитина и хитозана: Материалы Шестой Международной конференции, Москва – Щелково, 22–24 октября 2001 г. – М.: Изд-во ВНИРО, 2001. – С. 354–357.
11. Кряжев Д.В. и др. Деструкция хитина микроскопическими грибами // *Биотехнология.* – 2003. – № 4. – С. 88–89.
12. Авраменко С.В., Галынкин В.А. Скрининг продуцентов хитинолитических ферментов среди представителей рода *Streptomyces* // Сборник научных трудов юбилейной конференции, посвященной 60-летию факультета промышленной технологии лекарств, СПб, 9 декабря 2005 г. – СПб.: Изд-во СПХФА, 2005. – С. 98–100.
13. *Methods in enzymology* / Ed. by W.A. Wood. – 1988. – Vol. 161B. – P. 416–423.
14. Трачук Л.А., Шемякина Т.М., Честухина Г.Г., Степанов В.М. // *Биохимия* – 1996. – Т. 61. – Вып. 2. – С. 15–16.
15. Tsuyoshi O.S., Barr J.K. A simplified method of quantitating protein using the biuret and phenol reagents // *Anal. Biochem.* – 1978. – Vol. 86. – N 1. – P. 193–200.
16. Terbojevich M., Corrado C., Cosani A., Marsano E. Solution studies on the chitin – LiCl-N-N' – DMAA system // *Carbohydr. Res.* – 1988. – Vol. 180. – P. 73–86.
17. Пириева Д.А. и др. Физиолого-биохимические свойства *Actinomyces kurssanovii* активного продуцента хитиназы // *Микробиология.* – 1977. – Т. 46. – Вып. 4. – С. 661–666.
18. Monreal J., Reese T.E. The chitinase of *Serratia marcescens* // *Canadian J. of Microbiology.* – 1969. – Vol. 15. – N 7. – P. 689–696.
19. Чигалейчик А.Г., Пириева Д.А. Внеклеточная хитиназа *Aeromonas liquefaciens* // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 1976. – Т. 12. – Вып. 2. – С. 238–242.
20. Abd-Allah E.F. *Streptomyces plicatus* as a model of biocontrol agent // *Folia Microbiol.* – 2001. – Vol. 46. – N 4. – P. 309–314.

## SOME FEATURES OF CHITINOLYTIC ENZYMES BIOSYNTHESIS IN *STREPTOMYCES GRISEUS* VAR. *STREPTOMYCINI* CULTURE

S.V. AVRAMENKO, V.A. GALYNKIN, A.N. POZDNIKINA

*St.-Petersburg State Chemico-Pharmaceutical Academy*

The chitinolytic enzymes production by *Streptomyces griseus* var. *streptomycini* during the submerged fermentation with native unpurified chitin was studied. The activity of chitinolytic complex correlated with growth and development phases of the producer. The optimal fermentation time to reach the highest yields of chitinase was determined. The correlation between chitinase biosynthesis and degree of the chitin refinement was studied. The additional carbohydrate sources were evaluated to increase chitinolytic enzymes production.

*Keywords:* chitinolytic enzymes, *Streptomyces*, biosynthesis, culture.

## НОВАЯ ОРГАНИЧЕСКАЯ ФОРМА ЙОДА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ МИКРОЭЛЕМЕНТОЗОВ

Л.В. АНТИПОВА\*, А.Р. САЛИХОВ

*Воронежская государственная технологическая академия*

Цель работы — получение и исследование стабильности препарата йодированных животных белков в пищевых системах. Объектом исследования служил препарат животных белков WB 1/40 (Германия), рекомендуемый в качестве пищевой добавки для мясных продуктов и препарат йодида калия по ГОСТ 4232-74 с массовой долей йода 76,5%. Использованы современные физико-химические методы анализа. Методами хроматографии и электрофореза установлено наличие положительно заряженных групп и фракций в составе белков препарата, что предполагает возможность эффективного связывания аминной формы йода. Изменение электропроводности раствора указывает на рост удельного сопротивления среды, а количество связанного йода — на йодирование белков препарата. Экспериментально установлено, что 1 г препарата животных белков может связывать 50–80 мкг йода. Предварительно гидратированные и йодированные белки использовали в составе модельного мясного фарша. Показано также, что йодирование не приводит к ухудшению функционально-технологических свойств сырого фарша и качественных показателей готовых продуктов. Исследование стабильности йодированных белков в пищевых системах при воздействии температуры показало, что при внесении их в количестве 10–25% обеспечивается 50–150 мкг йода в 100 г продукта. Применение йодированных белковых препаратов перспективно для профилактики микроэлементозов путем обогащения пищевых систем.

*Ключевые слова:* микроэлементозы, йод, препарат животных белков, йодирование, мясные фарши, функциональные продукты.

Недостаточное поступление микронутриентов с пищей — общая проблема всех цивилизованных стран, что требует широкомасштабных мер эффективной коррекции этих дефицитов на государственном уровне [1, 2]. Одним из наиболее дефицитных микроэлементов питания является йод. На Земле в регионах с недостаточностью йода в окружающей среде проживают 2 млрд. человек. Особую тревогу вызывает ежегодный прирост детей и молодых людей до 30 лет с эндемическим зобом, в том числе на обширных территориях России. В настоящее время во всем мире, включая и нашу страну, применяется дополнительное введение йода в организм при питании с целью профилактики йодной недостаточности путем создания БАД и функциональных продуктов [3, 4, 5, 6]. Однако проблема остается актуальной, требует дальнейших исследований и разработки подходов, принципов и методов коррекции йодной недостаточности в трофи-

ческих цепях, где наибольшую перспективу имеет производство продуктов массового спроса. Попадая в кровь в процессе пищеварения, йод доставляется к щитовидной железе, в которой он используется для эндогенного синтеза гормонов трийодтиронина и тироксина.

Зарубежный и отечественный опыт показывает, что наиболее эффективным и экономичным является обеспечение населения путем обогащения пищевых продуктов и рационов микроэлементами, в частности, йодом в неорганической и органической формах [9]. При этом использование органических носителей йода из-за стабильности в пищевых системах является, по мнению большинства специалистов, предпочтительным. Особенно интересны в качестве носителей белки с необходимыми функционально-технологическими свойствами, улучшающими показатели пищевых систем.

Цель настоящей работы состояла в получении и исследовании стабильности препарата йодированных животных белков в пищевых системах.

### Материалы и методы

Объектом исследования служил препарат коллагеновых белков WB 1/40, поставляемый на российский

\* Автор для переписки:

© 2006 г. Антипова Людмила Васильевна,  
д.т.н., профессор, заведующий кафедрой Воронежской  
государственной технологической академии  
394000 Воронеж, пр-т Революции, 19  
Тел. (4732) 55-37-51  
E-mail: meatech@yandex.ru

рынок фирмой «Провико» (Германия). Он представляет собой функциональный, экологически чистый порошкообразный продукт. Согласно рекомендациям по применению, вырабатывается из свиной шкурки, имеет белый с кремовым оттенком цвет, нейтральный запах и вкус, рН 1%-ного раствора равен 6,5. Препарат имеет высокую влагосвязывающую способность, значительно улучшает технологические свойства пищевых систем. В качестве источника йода применяли йодид калия по ГОСТ 4232-74 с массовой долей йода 76,5%.

Аминокислотный состав указанного белкового препарата определяли на приборе ААА-881 (Mikrotecna, Praga) в соответствии с инструкцией к прибору, массовую долю белка — по Кьельдалю [10], электрофоретические исследования образцов проводили с помощью установки вертикального электрофореза VE-1M («Биоклон») в пластинках полиакриламидного геля (массовая доля 7,5%) с использованием додецилсульфата натрия (SDS). В качестве инициатора процесса полимеризации применяли 10%-ный раствор персульфата аммония, а сополимеризации — TEMED. Полимеризацию осуществляли в течение 0,5 часа при комнатной температуре. В качестве электрофорезного буфера использовали трис-глициновый буфер с рН 8,3. Электрофорез вели в соответствии с инструкцией к прибору. Удельную электропроводность определяли на кондуктометре Н9033 Multi-repuy Conductivity meter фирмы Hanna Instruments (Чехия) в соответствии с инструкцией к прибору. Функционально-технологические свойства определяли согласно методам, приведенным в литературе [10].

В качестве пищевой системы исследовали модельный мясной фарш, состоящий из измельченной на волчке с диаметром решетки 2 x 3 мм свинины по ГОСТ 7724 и говядины по ГОСТ 779-87 в соотношении 1:1. Содержание связанного йода определяли роданидно-нитритным методом (по Проскуряковой).

Определение цветовых характеристик мясных фаршей проводили с помощью спектрофотометра по методу, разработанному сотрудниками кафедры физики Воронежской государственной технологической академии [11]. При этом учитывали, что для количественной оценки цветовых ощущений, создаваемых излучением, используют две величины: световой поток, падающий на глаз человека, и цветность. Цветность — двумерная величина, определяемая соотношением уровней возбуждения трех цветовых аппаратов среднего человеческого глаза, работающего в условиях дневного освещения. Если один из них принять за единицу, то два других будут нести информацию о цветности, так как цветность может быть

отображена в виде точки на плоскости и охарактеризована двумя координатами X и Y, которые можно определить по спектру отражения какого-либо тела. Системы указанного вида получили названия равноконтрастных, которые применяют в современных приборах измерения цвета — колориметрах и спектрофотометрах.

Подбор белков и использование органических форм йода для обогащения пищевых систем обусловлены большим сродством йода к белкам. При этом комплекс йод-белок отличается высокой прочностью за счет образующихся связей в остатках аминокислот подобно механизму образования гормонов щитовидной железы [12]. Необходимое условие органификации йода в щитовидной железе — наличие анионной формы (I<sup>-</sup>), что может быть достигнуто за счет присутствия в белке-носителе ионизированных положительно заряженных групп, например, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>. Таким образом, в оценке перспектив разработки носителя йода интерес представляет определение аминокислотного состава, который важен еще и в оценке биологической и функционально-технологической эффективности.

## Результаты

Установлено, что в составе белков препарата находятся следующие аминокислоты (г/100 г): *незаменимые*: валин — 2,5; изолейцин — 1,22; лейцин — 2,97; лизин — 3,82; метионин — 0,8; цистеин — 0,06; треонин — 1,54; тирозин — 0,52; триптофан — 0,60; фенилаланин — 2,49; аргинин — 7,31; гистидин — 0,56; *заменимые*: аланин — 9,12; аспарагиновая кислота — 5,72; глутаминовая кислота — 10,38; глицин — 23,85; пролин — 12,10; серин — 2,76. Полученные результаты свидетельствуют о том, что белки препарата обнаруживают характерные черты белков коллагенового ряда и имеют низкую сбалансированность входящих аминокислот относительно эталонных белков. Однако весьма важно констатировать, что они богаты глицином, аргинином, пролином — потенциальными источниками NH<sub>3</sub><sup>+</sup> - групп в растворе.

Для идентификации белковых фракций в препарате использовали вертикальный электрофорез в пластинах полиакриламидного геля размером 1,0 × 130 × 124 мм при 21 °С, в соответствии с прописью метода. После окончания электрофореза осуществляли выявление белковых полос окрашиванием геля в течение 40 мин в растворе Coomassie brilliant blue G-250. Отмытые в 6%-ной ТХУ гели погружали в раствор, содержащий этиловый спирт и воду в соотношении 1:1. В качестве маркерных белков использовали набор High Range Protein Miw

Marker: 40–330 кДа. Полученные электрофореграммы представлены на рисунке 1.

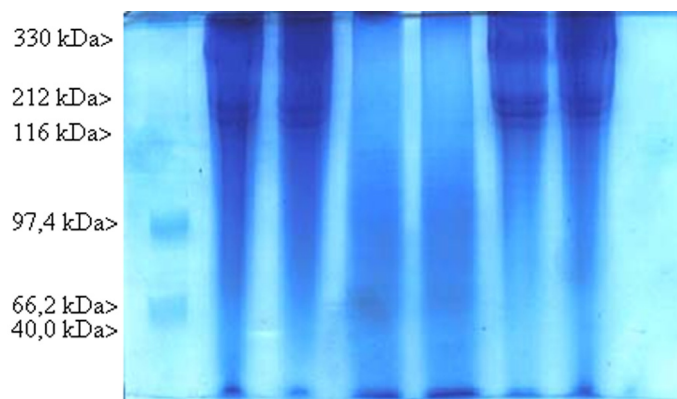


Рис. 1. Электрофореграммы животного белка WB 1/40

На рисунке 1 видно, что белок WB 1/40 – сложная смесь белковых веществ различной молекулярной массы – 300–40 кДа, что составляет менее 120 аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Расчет подвижности фракций и идентификация белковых полос в ПААГ указывают на наличие значительной доли фракций с преимущественным положительным зарядом, что делает возможным эффективное взаимодействие с анионной формой йода.

Реакцию связывания йода проводили в условиях pH 7,0–7,2, при этом препарат животного белка WB 1/40 обрабатывали водным раствором йодида калия различной концентрации и выдерживали в течение 24 ч при  $t = 0–4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Раствор йодида калия готовили растворением 1 г в дистиллированной воде KJ так, чтобы на белок приходилось 50, 100, 150, 200, 250 мкг йода.

Полученные данные представлены в таблице 1.

**Таблица 1**  
**Связывание йода препаратом белков**

№ п/п	Количество вносимого йода на 1 г белка, мкг	Связанный йод, на 1 г белка	
		в мкг	% к внесенному
1	50	50,0±0,3	100,0
2	100	79,7±0,7	80,0
3	150	79,0±0,6	53,3
4	200	79,0±1,0	40,0
5	250	79,3±0,9	32,0

В ходе экспериментальных исследований установлено, что 1 г препарата белков может максимально связывать 50–80 мкг йода.

Эффект связывания йода был дополнительно установлен в опытах по определению электропроводности системы. Показано, что удельная электропроводимость раствора йодида калия концентрацией 1 мкг/см<sup>3</sup> составляет  $723 \pm 2$  мкСм/см, а 1%-ного раствора белкового препарата WB 1/40 –  $1041 \pm 3,5$  мкСм/см. При смешивании компонентов (в 100 см<sup>3</sup> воды растворяли 100 мкг йодида калия и 1 г препарата белков WB 1/40) и выдержке во времени наблюдалось плавное снижение значения электропроводности (рис. 2), которое максимально проявлялось в интервале 0–12 ч, а затем процесс развивался со значительно меньшей скоростью. Полученные данные свидетельствуют о росте удельного сопротивления раствора, что, вероятно, достигается за счет образования соединения йода с белками препарата.

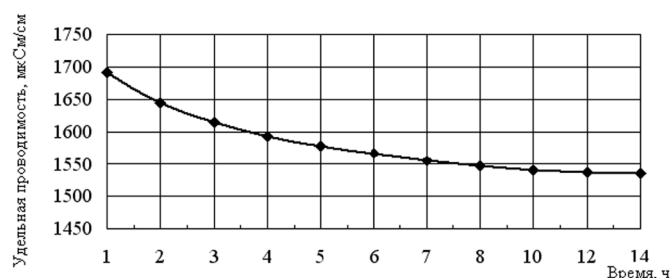


Рис. 2. Зависимость удельной проводимости раствора белка и йодида калия во времени

Количественное определение связанного йода с интервалом 2 ч проводили путем обработки препарата животного белка WB 1/40 раствором йодида калия в течение 0–24 ч при температуре 0–4 °С. Концентрация йодида калия в растворе при этом составляла 10 мкг/см<sup>3</sup> при соотношении белок : раствор – 1 : 10 (согласно рекомендациям фирмы по гидратации белков препарата для использования в пищевых системах). Полученные результаты (рис. 3) свидетельствуют о том, что йодирование белков происходит во времени и достигает максимума через 20 часов, что дает возможность получить 80 мкг связанного йода на 1 г белка и требует соответственно расхода йодида калия 105 мкг.

Пищевой белок WB 1/40 – препарат гидролизата высокомолекулярного биополимера коллагена, а, следовательно, обладает высокой сорбционной активностью. Сорбция – самопроизвольный физико-химический процесс поглощения полимерами газов, паров, жидкостей и растворимых веществ из окружающей среды, сопро-

возрастающий уменьшением изобарно-изотермического потенциала ( $\Gamma$ ), изменение которого описывается уравнением Гиббса [13]:

$$\Delta F = \Delta H - T\Delta S < 0 \quad (1),$$

где  $\Delta H$  и  $\Delta S$  — изменение соответственно энтальпии и энтропии системы;  $T$  — абсолютная температура.

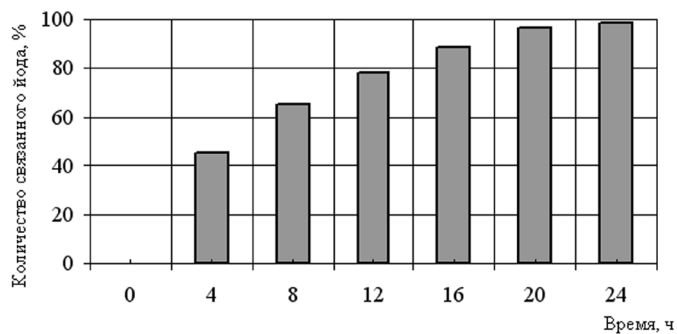
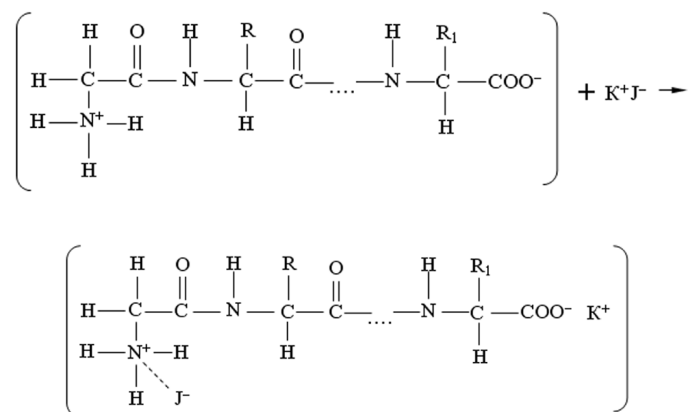


Рис. 3. Динамика связывания йода в зависимости от времени обработки белка WB 1/40 раствором KJ

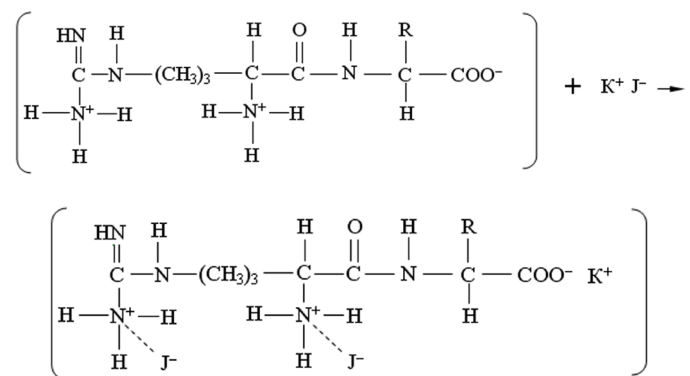
При внесении йодида калия в гидратированный белок WB 1/40 происходит выравнивание концентраций за счет диффузии. При этом при любой температуре, отличной от абсолютного нуля, происходит непрерывное движение частиц растворенного вещества и растворителя. Это приводит к уменьшению энергии Гиббса за счет увеличения энтропии системы. Являясь полиэлектролитами, белки препарата диссоциируют с образованием кислотных и основных групп. Сорбционная емкость (способность) полимеров характеризуется равновесным количеством сорбата, поглощенного единицей массы или объема раствора, и зависит от концентрации и температуры. Для определения сорбционной емкости биополимеров препарата использовали растворы йодида калия разной молярности: 0,02 М; 0,05 М; 0,1 М; 0,2 М. Характер изотермы поверхностного натяжения показывает, что йодид калия ведет себя в данном случае как поверхностно активное вещество. По изотерме сорбции Гиббса, отражающей количественное соотношение между величиной адсорбции, поверхностным натяжением и концентрацией разбавленного раствора, рассчитывали величину адсорбции. Графическая зависимость в координатах  $1/\tau - 1/c$  для процесса сорбции йода белками исследуемого препарата позволила установить, что величина предельной адсорбции, то есть количество поглощенного вещества, приходящегося на  $1 \text{ м}^2$  поверхности сорбата, для йодида калия составляет  $76,3 \cdot 10^9$  моль/ $\text{м}^2$ .

Наличие 23,8% глицина в составе полипептидных цепей белков препарата дает основание предполагать, что основным центром связывания анионов йода служат

$\text{NH}_3^+$ -группы полиглициновых структур и связывание происходит по схеме [14]:



Дополнительно йод, возможно, связывается с такими преобладающими в составе белков аминокислотами, как аргинин, по схеме:



Таким образом, в результате сорбции и возникновения химических связей возможно получить йодированный белок, имеющий большое практическое значение как заменитель основного сырья и улучшитель структуры, например, в технологии мясных продуктов с одновременным обогащением органической формой йода.

При создании продуктов на мясной основе с применением йодсодержащих препаратов придерживались следующих принципов [15]:

- регламентируемое содержание микронутриента должно быть достаточным для удовлетворения за счет продукта не ниже 15 и не выше 50% среднесуточной потребности в данном элементе при обычном уровне потребления обогащенного продукта;
- количество функционального ингредиента, дополнительно вносимого в обогащенный продукт, должно быть рассчитано с учетом их возможного естественного содержания в исходном продукте или сырье, а также потерь в процессе производства

и хранения с тем, чтобы обеспечить их содержание на уровне не ниже регламентируемого в течение всего срока годности обогащенного продукта;

- обогащение пищевой системы не должно ухудшать потребительские свойства этих продуктов;
- вносимый элемент должен быть биологически доступен в продукте;
- обогащение нацелено на производство продуктов массового потребления.

Одной из самых важных проблем, связанных с йодированием пищевых систем, является высокая летучесть йода и нестабильность его соединений. Особенно большие потери йода наблюдаются при кулинарной обработке с применением высоких температур, например, наиболее распространенных при обработке мясных изделий — 78–80 °С и 100 °С. Предварительно йодированный препарат белков подвергали нагреву и определяли изменение количества связанного йода во времени (табл. 2).

**Таблица 2**  
**Потери йода при тепловой обработке йодированного препарата белков**

Т-ра, °С	Содержание йода, мкг/г				
	0 ч (контроль)	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч
80	80,0±0,6	77,5±0,9	75,6±0,9	74,5±0,5	74,0±0,6
100	80,0±0,6	74,7±0,6	72,3±0,8	71,4±0,8	71,0±0,9

Исходя из результатов, можно рекомендовать внесение йодированных белков в рецептуры мясных продуктов в количестве 1–2,5% в негидратированном и 10–25% — в гидратированном виде. При этом содержание йода в 100 г продукта составит 50–150 мкг.

В аспекте исследования влияния внесения йодированных белков на качественные показатели продуктов и функционально-технологические свойства сырья использовали модельные мясные фарши с добавлением йодированного и исходного животного белка WB 1/40.

При исследовании влияния йодирования на функционально-технологические свойства модельных мясных фаршей проводили определение влагосвязывающей (ВСС), влагоудерживающей (ВУС), влаговыделяющей (ВВС) и жирудерживающей способности (ЖУС), эмульгирующей способности (ЭС) и стабильности эмульсии (СЭ), а также липкости и динамической вязкости.

В предварительно подготовленный фарш вводили 10% йодированного и нейодированного белка в гидра-

тированном виде (1:10) и определяли интересующие показатели. Контролем служил исходный препарат белков WB 1/40. Полученные результаты приведены в таблицах 3, 4.

Определение адгезивных свойств и динамической вязкости модельных фаршевых систем проводили в условиях разных массовых долей препарата в соответствии с рекомендациями фирмы по применению.

Полученные результаты указывают на увеличение исследуемых показателей мясных фаршей с применением препарата белков относительно контроля, однако йодирование не приводит к достоверному изменению свойств по сравнению с исходным препаратом белков. Другими словами, йодирование не снижает функциональности белков препарата в мясных системах. Аналогичное отмечается при сравнении реологических показателей (табл. 4). С учетом результатов исследования стабильности при термической обработке можно говорить о гарантированном содержании йода и высоком качестве готового продукта при использовании йодированного препарата белков WB — 1/40 в технологиях мясных продуктов.

В доказательство вывода свидетельствуют микробиологические и органолептические показатели. Последнее тесно связано с цветом мясных продуктов. Привлекательный, присущий свежему продукту цвет определяет потребительские свойства мясopодуlтов. При использовании йодсодержащих препаратов особое значение имеет опасность наличия свободного йода — сильного окислителя, который может негативно повлиять на образование нитрозомиоглобина (НОМЬ) и развитие розово-красного цвета мясных продуктов. Исследование цветности проводили на модельных мясных системах, которые готовили путем измельчения мясного сырья и смешивания с йодированным и нейодированным препаратом белков при гидратации 1:10 в соотношении 90:10, затем вводили нитрит натрия в соответствии с рекомендациями — 7,5 мг-%. Фарши подвергали варке при температуре 72 °С и определяли цветовые характеристики путем снятия спектральных кривых на спектрофотометре СФ-46 в видимой области (400–740 нм). Об изменении цвета модельных фаршей в системе L\*a\*b свидетельствуют данные таблицы 5, полученные на основании спектров отражения.

Данные таблицы 5 показывают, что опытные образцы во всех случаях несколько отличаются от контрольных, так как связаны с введением в состав мясного фарша препарата белков, не содержащего пигмента мяса — миоглобина. Однако йодирование не приводит к отклонению в цветности по сравнению с применением исходного препарата белков WB 1/40.

Таблица 3

**Функционально-технологические показатели сырых мясных фаршей**

Наименование образца модельного мясного фарша	Общая масса влаги, %	Показатели, %					
		ВСС	ВВС	ВУС	ЖУС	ЭС	СЭ
Контроль	60,5±1,2	51,5±0,9	19,4±0,8	40,5±2,1	52,3±0,8	46,8±1,4	52,1±0,9
с применением препарата WB 1/40	73,1±1,5	64,1±0,9	8,5±0,7	64,2±1,1	55,5±1,1	82,1±1,2	60±1,5
с применением йодированного препарата WB 1/40	72,5±1,0	64,7±1,1	8,8±0,4	63,2±0,8	55,3±0,9	82,1±0,9	58,2±0,8

Таблица 4

**Реологические свойства модельных фаршей**

Показатель	Массовая доля вносимого гидратированного препарата, %					
	0	5	10	15	20	25
	Препарат белка WB 1/40					
липкость, кг/см <sup>2</sup>	45,7±2,5	53,4±1,3	56,3±1,1	57,4±0,9	58,1±1,5	58,3±1,4
динамическая вязкость, Па·с	151,0±6,5	251±11,0	253,0±9,5	314,0±10,8	322,0±8,5	338,0±12,6
	Йодированный препарат белка WB 1/40					
липкость, кг/см <sup>2</sup>	45,7±2,5	52,4±2,5	54,6±2,3	56,6±1,5	57,5±1,8	57,8±1,5
динамическая вязкость, Па·с	151,0±6,5	226±9,4	268±8,9	301,0±7,5	331,0±6,3	352,0±7,1

Таблица 5

**Цветовые характеристики модельных мясных фаршей**

Образцы модельных фаршей	L* (светлота)	a (краснота)	B (желтизна)
	До тепловой обработки		
Контроль	49,50	19,96	6,19
10% WB 1/40	51,84	19,18	3,85
10% йодированного WB 1/40	51,84	19,18	3,85
	После тепловой обработки		
Контроль	57,08	17,71	2,69
10% WB 1/40	58,94	17,27	2,38
10% йодированного WB 1/40	58,87	17,28	2,39

**Заключение**

Таким образом, использование препарата белков коллагеновой природы в качестве носителя йода дает устойчивые пищевые системы при достижении заданного уровня содержания йода и высокого качества продуктов. Учитывая перспективность и распространенность ком-

мерческих коллагеновых препаратов как загустителей и наполнителей различных пищевых систем, следует положительно оценивать возможность обогащения йодом и производства функциональных пищевых продуктов массового потребительского спроса для лечения микроэлементозов, в частности, эндемического зоба у населения.



## Литература

1. Спиричев В.Б. Микронутриенты в питании и здоровье человека. Реализация концепции государственной политики в области здорового питания населения России // *Материалы Всерос. научн.-практ. сем.* — Томск, 2000. — С. 19–34.
2. Спиричев В.Б., Шитнюк Л.Н., Поздняковский В.М. Обогащение пищевых продуктов микронутриентами: научные подходы и практические решения // *Пищевая промышленность.* — 2003. — № 3. — С. 10–16.
3. Герасимов Г.А., Фадеев В.В., Свириденко Н.Ю. Йоддефицитные заболевания в России. Простое решение сложной проблемы. — М.: Адамант, 2002. — 168 с.
4. Горемекова Г.А., Куракин М.С., Маюрникова Л.А., Винограй Э.Г. Использование системного подхода при обогащении пищевых продуктов незаменимыми микронутриентами // *Пищевая промышленность.* — 2003. — № 11. — С. 70–73.
5. Дудкин М.С., Сагайдак Т.В., Щелкунов Л.Ф. Комплексы белков и пищевых волокон, обогащенные йодом // *Известия вузов. Пищевая технология.* — 2001. — № 2–3. — С. 18–21.
6. Костюченко М.Н., Цыганова Т.Б., Шатнюк Л.Н. Системный подход к обогащению хлебобулочных изделий йодом // *Хлебопечение в России.* — 2003. — № 1. — С. 34–35.
7. Титов Е.И., Митасева Л.Ф., Черкасова Л.Г. и др. Биоактивные добавки пробиотического действия для мясных продуктов // *Мясная индустрия.* — 2000. — № 5. — С. 35–36.
8. Цикуниб А.Д. Производство соевого молока, обогащенного йодом, для профилактики эндемического зоба // *Известия вузов. Пищевая технология.* — 1999. — № 1. — С. 40–41.
9. Дударькова И.В., Столярова В.А. Йоддефицитные состояния и пути их коррекции // *Тезисы межд. семинара «Федеральный и региональный аспекты государственной политики в области здорового питания».* Кемерово, 2002. — С. 22–24.
10. Антипова Л.В., Глотова И.А., Рогов И.А. Методы исследования мяса и мясных продуктов — М.: Колос, 2001. — 376 с.
11. Антипова Л.В., Безрядин Н.Н., Титов С.А. Физические методы анализа мяса и мясных продуктов. — СПб.: Гиорд, 2006. — 217 с.
12. Битуева Э.Б., Капустина Ю.Л., Жамсаранова С.Д. Восстановление микроэлементарного баланса организма на примере йодной недостаточности // *Фундаментальные исследования.* — 2004. — № 2. — С. 45.
13. Васильев В.П. Аналитическая химия. Физико-химические методы анализа. — М.: Дрофа, 2002. — 384 с.
14. Битуева Э.Б. Биотехнология йодсодержащих БАД органической природы: теоретические основы получения и применения в технологии пищевых продуктов. Автореферат на соискан. учен. степ. докт. техн. наук. — Воронеж, 2005. — 575 с.
15. Тутельян В.А., Спиричев В.Б., Шатнюк Л.Н. Коррекция микронутриентного дефицита — важный аспект концепции здорового питания населения // *Вопросы питания.* — 1999. — № 1. — С. 3–4.

## A NEW ORGANIC FORM OF IODINE FOR A PROPHYLAXIS OF MICROELEMENTOSES

L.V. ANTIPOVA, A.R. SALIKHOV

*Voronezh State Technological Academy*

The purpose of work consists in making and research of stability of a iodinated animal protein preparation in food systems. As object of research served a preparation of animal protein WB 1/40 (Germany), recommended as the food additive for meat products and a KJ preparation in accordance with GOST 4232-74 with mass fractions of iodine of 76,5%. Modern physical and chemical methods of the analysis were used. Methods of a chromatography and electroforesis established a presence of positively charged groups and fractions in the structure of proteins of a preparation that assumes an opportunity of the effective linkage of iodine amine forms. Change of electrical conductivity was an evidence of growth of the medium specific resistance, and quantity of the combined iodine was an indicator of iodination of the protein preparation. It was experimentally established, that 1 g of the animal protein preparation can combine 50–80 mkg of iodine. Preliminary hydrated and iodinated proteins were used for making of model minced meat. It was also shown, that iodination does not result in deterioration of functional-technological properties of crude forcemeat and quality indicators of ready products. Research of stability of iodinated proteins in food systems under the influence of temperature demonstrated, that addition of 10–25% of iodine provides 50–150 mkg of this microelement in 100 g of product. The use of iodinated protein preparations is perspective for a prophylaxis of microelementoses by means of the enrichment of food systems.

*Keywords:* microelementoses, iodine, animal protein preparation, iodination, minced meats, functional products.

## КОНСТАНТЫ МИХАЭЛИСА МИКРОБНОГО ЭЛЕКТРОДА ДЛЯ УСЛОВИЙ ЭЛЕКТРОКАТАЛИТИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ СУБСТРАТА ПРИ ДВУХ СПОСОБАХ ИММОБИЛИЗАЦИИ БАКТЕРИЙ

Е.В. ЧУБАРОВА<sup>1</sup>, О.Н. ПОНАМОРЕВА<sup>1</sup>, Т.Н. КУВИЧКИНА<sup>2</sup>,  
В.А. БОГДАНОВСКАЯ<sup>3</sup>, А.Н. РЕШЕТИЛОВ<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Тулский государственный университет, Тула;

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино;

<sup>3</sup>Институт электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

Для создания биосенсорных анализаторов и биотопливных элементов представляется важным изучение характеристик систем, содержащих иммобилизованные клетки. В работе изучены параметры процесса электрокаталитического окисления глюкозы иммобилизованными бактериальными клетками *Gluconobacter oxydans sbsp. industrius B-1280*. Медиатором электронного транспорта служил 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ). Выполнена сравнительная оценка параметров окисления глюкозы для двух способов иммобилизации бактерий — с помощью ацетатцеллюлозной мембраны (АЦ) и мембраны, полученной при полимеризации нафiona. Нашли, что при окислении насыщающей концентрации глюкозы (25 мМ) константы Михаэлиса для медиатора составляли 2,2 мМ для нафионовой и АЦ мембран. При варьировании концентрации глюкозы (концентрация ДХФИФ составляла 0,9 мМ) константы Михаэлиса для глюкозы составляли 2,0 и 1,7 мМ для нафионовой и АЦ мембран, соответственно; при этом АЦ мембрана обеспечивала более высокие значения максимальных скоростей реакции, что делает ее применение в экспериментах подобного типа предпочтительным.

**Ключевые слова:** бактериальные клетки, медиаторы, генерация тока, иммобилизация, биосенсоры, биотопливные элементы.

Способность медиаторов электронного транспорта обеспечивать перенос электронов в системе «субстрат-бактериальная клетка-медиатор-электрод» используется при создании биосенсоров, биотопливных элементов [1]. Эффективность процесса переноса определяется рядом параметров системы. В их число входят таких, как материал электрода, используемый штамм микроорганизма, тип субстрата, условия измерений, способ иммобилизации микроорганизмов, тип медиатора. Экспериментальному изучению роли каждого из указанных компонентов в генерации тока и потенциала уделяется значительное внимание [2].

Бактерии рода *Gluconobacter* являлись объектом многих исследований, ориентированных на изучение процессов окисления субстратов в присутствии медиаторов

электронного транспорта. Часть таких исследований была направлена на разработку биосенсорных систем анализа [3–7], в ряде других изучались основы механизма взаимодействия «медиатор-клетка» [8–11]. В работе [10] была рассмотрена эффективность опосредованного медиатором переноса электронов в процессе окисления глюкозы мембранолокализированными ферментами бактерий *Gluconobacter industrius*. Измерения проводились с бактериальными клетками, находящимися в суспензии. Авторы показали, что каталитическое поведение интактных клеток, находящихся в суспензии, напоминает поведение оксидоредуктаз, кинетика которых отвечает уравнению Михаэлиса–Ментен.

Перспективным направлением в настоящее время является разработка простых и надежных методов иммобилизации микроорганизмов на подходящих носителях, что позволит создавать приборы, характеризующиеся стабильностью при работе и хранении, а, следовательно, появляется необходимость изучения каталитических свойств и эффективности функционирования иммобилизованных систем. Ранее для создания биосенсорных

\* Автор для переписки:

© 2006 г. Решетиллов Анатолий Николаевич, д.х.н., профессор, заведующий лабораторией биосенсоров Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН 142290 Пушкино Московской обл.  
Тел.: (27) 73-16-66. Факс: (495) 956-33-70  
E-mail: anatol@ibpm.pushchino.ru

систем на основе бактерий рода *Gluconobacter* была применена АЦ мембрана [3–6], однако не проводилось количественной оценки и сравнения параметров функционирования данной мембраны и ее аналогов.

### Материалы и методы

Бактерии *Gluconobacter oxydans* sbsp. *industrius* B-1280 иммобилизовали на графитовом электроде 2 способами: удерживая нанесенные на графитовый электрод клетки ацетатцеллюлозной мембраной (АЦ) и мембраной, полученной полимеризацией нафiona. В качестве медиатора электронного транспорта использовали 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ). Окисляемым субстратом являлась глюкоза. Измерения выполняли в условиях фиксированного потенциала измерительного электрода (250 мВ) относительно электрода сравнения. Цель работы — получение сравнительной оценки параметров окисления глюкозы для двух способов иммобилизации бактерий: при удерживании клеток с помощью ацетатцеллюлозной мембраны и мембраны, полученной при полимеризации нафiona. Для режима генерации тока бактериями при фиксированном потенциале получены константы Михаэлиса для медиатора (КМ) и глюкозы (КГ).

Измерительный микробный электрод формировали, нанося 2 мкл суспензии клеток *Gluconobacter oxydans* sbsp. *industrius* B-1280 (далее *G. oxydans*) на торец круглого графитового электрода диаметром 3 мм (Aldrich, по. 496537). Выращивание клеток производили методом, описанным в [12]. Концентрация бактерий в суспензии составляла 168 мг сырого веса/мл. Боковую поверхность графитового электрода изолировали эпоксидным компаундом ЭДП-15. Клетки подсушивали при комнатной температуре в течение 15 мин., после чего для их иммобилизации на торец электрода наносили 3 мкл 0,1% раствора ацетата целлюлозы в ацетоне или 3 мкл 0,1% раствора нафiona (Fluka, 70160) в этиловом спирте. Поверхность электрода сушили в струе холодного воздуха в течение 10 мин. для удаления растворителей. Методика формирования электрода и иммобилизации клеток с помощью АЦ мембраны аналогична описанной в работах [4–6], на основании чего, а также с учетом диаметра использованного графитового электрода, нашли, что толщина АЦ мембраны, закрепляющей клетки, находится в диапазоне 2–4 мкм. Для мембран на основе нафiona подобной оценки не производили. В качестве медиатора использовали 2,6-дихлорфенолиндофенол фирмы ICN; глюкоза и реагенты для приготовления буферных растворов имели степень чистоты «чда».

### Результаты и обсуждение

Измерения выполняли по двухэлектродной схеме, регистрацию сигнала осуществляли с помощью гальванопотенциостата «IPC-Micro» (разработка Института физической химии РАН, Москва), подключенного к персональному компьютеру. В качестве электрода сравнения использовали графитовый электрод с рабочей поверхностью 30 мм<sup>2</sup>. Измерения выполняли при постоянном перемешивании в ячейке объемом 2 мл, измерительным раствором являлся фосфатный буфер (30 мМ, рН 6,0). Эксперименты выполнены при температуре 20 °С. Биокаталитическую реакцию инициировали введением в ячейку глюкозы. Зависимость силы тока от времени регистрировали при постоянном потенциале измерительного электрода 250 мВ относительно электрода сравнения. Вид типичных сигналов при окислении глюкозы для электрода, содержащего бактерии, удерживаемые АЦ мембраной, представлены на рисунке 1. Измеряемым параметром являлась амплитуда установившегося значения тока.

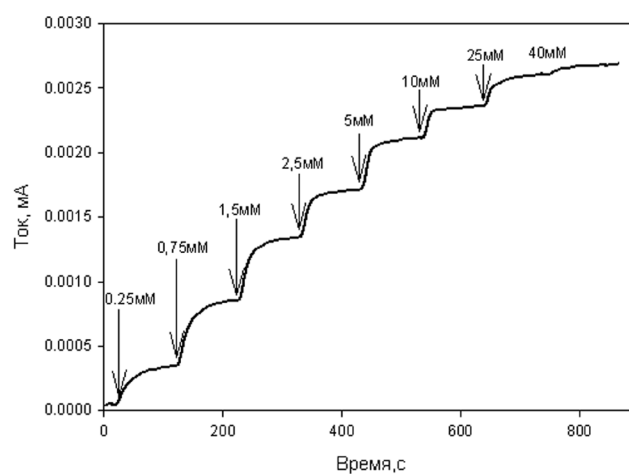


Рис. 1. Вид типичного сигнала, генерируемого электродом при увеличении концентрации глюкозы в среде (приведен для иммобилизации бактерий с помощью АЦ мембраны. Концентрация ДХФИФ составляла 0,9 мМ). Моменты введения субстрата указаны стрелками; цифры обозначают его конечную концентрацию

Для оценки констант Михаэлиса для медиатора получали калибровочную кривую, представляющую зависимость силы тока электрода от концентрации медиатора при насыщающей концентрации глюкозы в ячейке, равной 25 мМ. Аналогично для оценки констант Михаэлиса для глюкозы строили калибровочную кривую, представляющую зависимость силы тока электрода от

концентрации глюкозы при концентрации медиатора в ячейке, равной 0,9 мМ. Обработывая полученные данные с помощью программы *Sigma plot* (6-я версия), получали значение констант Михаэлиса и максимальной скорости реакции.

Вид калибровочных зависимостей при изменении концентраций субстрата и медиатора приведен на рисунках 2 и 3, соответственно. В обоих случаях сигнал электрода нормирован на максимальное значение тока ( $I/I_{max}$ ), получаемое в данной серии измерений.

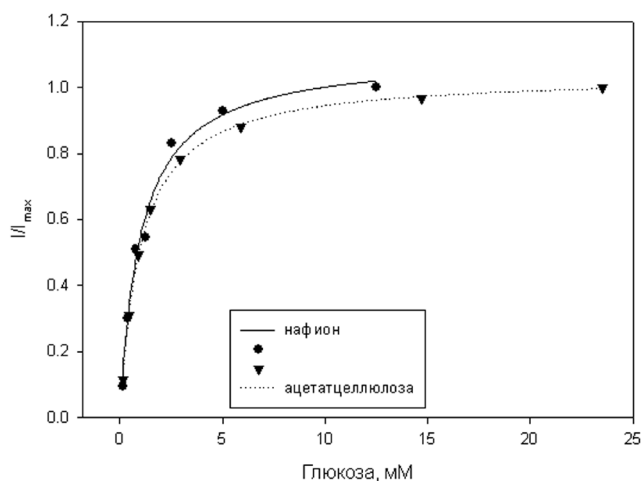


Рис. 2. Калибровочная зависимость электрода при изменении концентрации глюкозы. Концентрация ДХФИФ фиксирована (0,9 мМ). Представлены средние значения сигнала для выборки из трех измерений

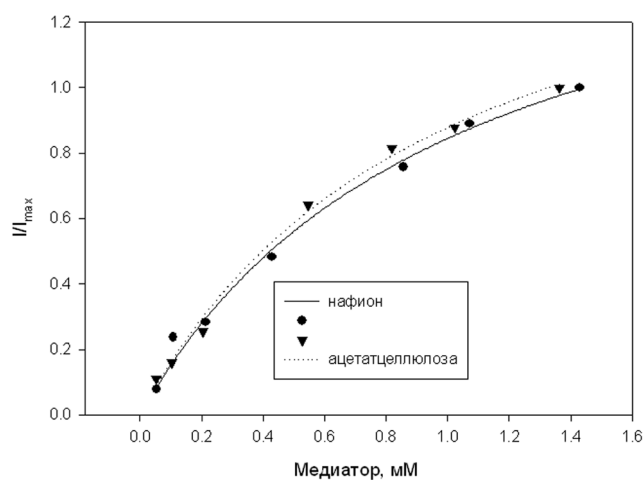


Рис. 3. Калибровочная зависимость электрода при изменении концентрации медиатора. Концентрация глюкозы фиксирована (25 мМ). Представлены средние значения сигнала для выборки из трех измерений

Из представленных зависимостей видно, что для обоих типов мембран в исследованных диапазонах концентраций величины генерируемых токов практически совпадают. Оценка параметров показала, что средние значения КМ составляют 2,2 и 2,2 мМ при иммобилизации бактерий с помощью нафийоновой и АЦ мембран. Средние значения константы Михаэлиса при варьировании концентрации глюкозы составили 2,01 и 1,69 мМ в случае иммобилизации бактерий с помощью нафийоновой и АЦ мембран, соответственно, и различаются недостоверно (уровень значимости совпадения результатов по Фишеру составляет 0,86 и 0,92, соответственно). Величины максимальных скоростей реакций ( $V_{max}$ ) для каждого случая представлены в таблице 1.

Таблица 1  
Сводная таблица полученных параметров уравнения Михаэлиса–Ментен

Изменяемый параметр	ДХФИФ		Глюкоза	
	нафийон	АЦ	нафийон	АЦ
КМ, мМ	2,15	2,16	2,01	1,69
$V_{max}$ , мкА	3,96	6,42	1,22	2,74
$R^2$	0,991	0,995	0,989	0,999

$R^2$  — коэффициент детерминации данных, определяющий соответствие данной выборки модели Михаэлиса–Ментен

Данные, приведенные в таблице 1, свидетельствуют о том, что при достаточно близких параметрах электродов в отношении констант КМ максимальные скорости реакций окисления глюкозы,  $V_{max}$ , выше в случае, когда для иммобилизации применяется АЦ мембрана. У авторов имеются предположения относительно возможных основ наблюдаемого эффекта; первое связано со структурной особенностью формируемых мембран, второе — с их физико-химическими свойствами, третье — с повреждением (перфорированием) клеточных мембран. Так, относительно структуры формируемых полимерных мембран можно предположить, что ни при использовании АЦ, ни при использовании нафийона не происходит формирование сплошной, неразрывной мембраны одинаковой толщины. В обоих случаях клетки удерживаются лишь островками полимера различной толщины и площади. В некоторых точках полимер силами сорбции связывается с материалом электрода, что позволяет в целом фиксировать биоматериал на электроде. Различия же в механических

свойствах участков мембран из АЦ и нафтона (например, средний размер площади и толщина одного участка), возможно, привели к тому, что мембрана из нафтона оказывала более высокое диффузионное сопротивление и тем самым снижала максимальную скорость реакции. Возможен также еще один вариант объяснения наблюдаемых высоких значений максимальной скорости реакций при использовании АЦ мембран. Версия состоит в том, что при формировании АЦ мембраны на слой бактерий наносится раствор АЦ в ацетоне. Применение ацетона может приводить к частичной перфорации бактериальных мембран, в результате чего облегчается доступ к мембрано локализованной альдозодегидрогеназе [14], производящей окисление глюкозы.

Из иных наблюдаемых особенностей электродов отметим различия в скорости реакции, то есть скорости изменения тока при изменении концентрации реагентов. Так, типичное время перехода значения тока к новому стационарному значению (время достижения 95% уровня установившегося значения) при изменении концентрации глюкозы в ячейке не выходило из диапазона 50–90 сек. для обоих типов мембран. Время же перехода значения тока к стационарному уровню при изменении концентрации медиатора было значительно выше и составляло от 90 до 180 сек. для обеих мембран. Наблюдаемое может быть обусловлено затрудненной диффузией медиатора в мембранах обоих типов.

### Заключение

В заключение отметим, что характеристики электродов с бактериями рода *Gluconobacter* изучались ранее в ряде работ. Преимущественно рассматриваемые схемы включали либо иммобилизованные бактерии в сочетании с такими медиаторами, как ферроцен [4–6], феррицианид [7], либо измерения на клеточных суспензиях в присутствии ДХФИФ [10]. Для иммобилизованных бактерий основное внимание уделялось изучению аналитических параметров электродов (чувствительности, селективности, стабильности). Было показано, что АЦ мембрана может эффективно удерживать на поверхности электрода ферроцен, а наиболее стабильные сигналы при генерации тока возникают при комбинированном использовании АЦ и нафтона [4–6, 13]. В данном исследовании получены параметры процесса окисления глюкозы бактериями, относящимися к роду *Gluconobacter*, в отдельности для мембран из АЦ и нафтона в присутствии медиатора 2,6-дихлорфенолиндофенола. Выявлено, что константы Михаэлиса оказались близкими для двух

типов материалов; вместе с тем значения максимальной скорости реакции окисления были выше для АЦ мембраны. В этой связи для достижения практической цели — получения высоких значений сигналов электродов — можно рекомендовать применение АЦ материала для иммобилизации бактерий.

*Исследование было поддержано грантом РФФИ 03-03-32174 «Биоэлектрокатализ: исследование кинетики и механизма анодных реакций на наноструктурированных композитных материалах, включающих биокатализаторы», грантом 04-04-97253 «Особенности окисления субстратов бактериальными клетками при взаимодействии с искусственными акцепторами электронов» программы «Фундаментальная наука в наукоградах Московской области», грантом РИ-16.0/025/026 «Научно-организационное, методическое и техническое обеспечение организации и поддержки научно-образовательных центров в области науки о Земле и осуществление на основе комплексного использования материально-технических и кадровых возможностей совместных исследований и разработок» ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники на 2002–2006 годы».*

### Литература

1. Kano K., Ikeda T. // *Electrochemistry*. — 2003. — Vol. 71. — P. 86–99.
2. Kano K., Ikeda T. // *Analytical Sciences*. — 2000. — Vol. 16. — P. 1013–1021.
3. Tkac J., Gemeiner P., Svitel J., Benikovsky T., Sturdik E., Vala V., Petrus L., Hrabarova E. // *Analytica Chimica Acta*. — 2000. — Vol. 420. — P. 1–7.
4. Tkac J., Vostiar I., Gemeiner P., Sturdik E. // *Bioelectrochemistry*. — 2002. — Vol. 56. — P. 23–25.
5. Tkac J., Vostiar I., Gemeiner P., Sturdik E. // *Bioelectrochemistry*. — 2002. — Vol. 56. — P. 127–129.
6. Tkac J., Vostiar I., Gemeiner P., Sturdik E. // *Bioelectrochemistry*. — 2002. — Vol. 55. — P. 149–151.
7. Tkac J., Vostiar I., Gorton L., Gemeiner P., Sturdik E. // *Biosens. Bioelectron.* — 2003. — Vol. 18. — P. 1125–1134.
8. Ikeda T., Kano K. // *Biochim Biophys Acta*. — 2003. — Vol. 1647. — P. 121–126.
9. Ikeda T., Kato K., Tatsumi H., Kano K. // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. — 1997. — Vol. 440. — P. 265–269.
10. Ikeda T., Kurosaki T., Takayama K., Kano K., Miki K. // *Anal. Chem.* — 1996. — Vol. 68. — P. 192–198.

11. Ikeda T., Matsuyama K., Kobayashi D., Matsushita F. // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1992. – Vol. 56. – P. 1359–1360.
12. Решетилов А.Н., Ефремов Д.А., Ильясов П.В., Кукушкин Н.И., Гришин Р., Леазерс Т., Боронин А.М. // Доклады Академии Наук. – 1998. – Т. 358. – С. 833–835.
13. Tkac J., Vostiar I., Sturdik E., Gemeiner P., Mastihuba V., Annus J. // Analytica Chimica Acta. – 2001. – Vol. 439. – P. 39–46.
14. Smolander M., Buchert J., Viikari L. // J. Biotechnol. – 1993. – Vol. 29. – P. 287–297.

## MICHAELIS CONSTANTS OF MICROBIAL ELECTRODE FOR CONDITIONS OF ELECTROCATALYTIC SUBSTRATE OXIDATION UNDER TWO WAYS OF BACTERIAL IMMOBILIZATION

E.V. CHUBAROVA<sup>1</sup>, O.N. PONAMOREVA<sup>1</sup>, T.N. KUVITCHKINA<sup>2</sup>,  
V.A. BOGDANOVSKAYA<sup>3</sup>, A.N. RESHETILOV<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tula State University, Tula;

<sup>2</sup>G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino;

<sup>3</sup>A. N. Frumkin Institute of Electrochemistry RAS, Moscow

For creation of biosensor analyzers and biofuel elements, it seems important to study characteristics of systems containing immobilized cells. The work addressed the parameters of electrocatalytic glucose oxidation by immobilized bacterial cells of *Gluconobacter oxydans* sbsp. *industrius* B-1280. The 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) was used as an electron transport mediator. The parameters of glucose oxidation have been comparatively assessed for two methods of bacterial immobilization: on acetate cellulose membrane (AC) and on membrane obtained from Nafion polymerization. At oxidation of saturating glucose concentration (25 mM), the Michaelis constants for mediator were found to be 2.2 mM for Nafion and AC membranes. At variation of glucose concentration (DCPIP concentration 0.9 mM), the Michaelis constants for glucose were 2.0 and 1.7 mM for Nafion and AC membranes, respectively, whereas AC membrane gave higher values of maximal reaction rates, which made it preferable for experiments of this type.

**Keywords:** bacteria, mediators, current generation, immobilization, biosensors, biofuel cells.

## ЗАВИСИМОСТЬ АКТИВНОСТИ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ *GlaI* ОТ КОЛИЧЕСТВА И ПОЛОЖЕНИЯ МЕТИЛИРОВАННЫХ ЦИТОЗИНОВ В УЗНАВАЕМОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ 5'-GCGC-3'

Ю.Э. ТОМИЛОВА\*, В.А. ЧЕРНУХИН, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

*НПО «СибЭнзим», Новосибирск*

Изучена зависимость активности сайт-специфической эндонуклеазы *GlaI*, узнающей и гидролизующей только метилированную последовательность ДНК 5'-GCGC-3'/3'-CGCG-5', от количества и положения метилированных по 5-му положению цитозинового остатков в последовательности узнавания. Существенный гидролиз ДНК происходит только в том случае, если в сайте узнавания модифицировано от двух до четырех оснований, причем в первом случае оба метилцитозина должны быть внутренними. Эффективность расщепления субстрата возрастает с увеличением количества метилированных оснований и максимальна, когда в сайте узнавания модифицированы все четыре цитозина.

*Ключевые слова:* сайт-специфическая ДНК-эндонуклеаза, метилирование ДНК.

Большинство известных до сих пор сайт-специфических ДНК-эндонуклеаз микроорганизмов являются эндонуклеазами рестрикции, то есть входят в состав так называемых систем рестрикции-модификации (R-M) и дополняются в бактериальной клетке ДНК-метилтрансферазой той же специфичности. Предполагается, что эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) защищают клетку от проникновения чужеродной (например, фаговой) ДНК, а метилазы, модифицируя тот же сайт узнавания, защищают хозяйскую ДНК от расщепления собственной рестриктазой. При этом само название этих ферментов «эндонуклеаза рестрикции» («рестриктаза») произошло от наблюдаемого экспериментально явления ограничения («рестрикции») размножения фага в бактериальной клетке [1]. Однако обнаруженные в последнее время сайт-специфические эндонуклеазы, гидролизующие только метилированную ДНК [2, 3], не входят в состав R-M систем, хотя в предложенной недавно классификации они отнесены к эндонуклеазам рестрикции II типа, к подгруппе IIM, то есть узнающим только метилированную ДНК [4].

В настоящее время описаны эндонуклеазы подтипа IIM только трех специфичностей. Первыми были описаны фермент *DpnI* и его изошизомеры, узнающие последовательность ДНК, в которой метилирован аденин — 5'-G(m6A)<sup>^</sup>TC-3' [5]. Две других эндонуклеазы не имеют изошизомеров и гидролизуют ДНК, метилированную по цитозинового основания в положении C5: *BisI* узнает и гидролизует последовательность 5'-G(m5C)<sup>^</sup>NGC-3' [2], *GlaI* — последовательность 5'-G(m5C)<sup>^</sup>GC-3' [3]. Нетрудно видеть, что в отличие от классических рестриктаз, последовательность узнавания у двух последних IIM эндонуклеаз содержит сразу несколько цитозинов и активность этих ферментов может зависеть от количества и положения модифицированных оснований в сайте.

Целью данной работы явилось изучение эффективности расщепления ДНК эндонуклеазой *GlaI* в зависимости от метилирования цитозинов в сайте узнавания 5'-GCGC-3'.

### Материалы и методы

В работе использовались реактивы производства «Хеликон» (Россия). Для экспериментов брали эндонуклеазы рестрикции, T4 полинуклеотидкиназу, и буферные растворы производства «СибЭнзим» (Россия). Олигонуклеотиды следующего состава, служившие субстратом для эндонуклеазы *GlaI*, были синтезированы в НПО «СибЭнзим» (Россия):

\* Автор для переписки:

© 2006 г. Томилова Юлия Эдуардовна, мл.н.с.  
НПО «СибЭнзим»  
630117 Новосибирск, ул. Акад. Тимакова, 2/12  
Тел./факс: 8-383-333-6853  
E-mail: JTom@sibenzyme.ru

G1: 5'-СТАТГААСГТТТТСССГТГАССГАССГТАТС-3'  
 G2: 5'-GATACGGTCCGTCAGССGAAACGTTTCATAG-3'  
 G3: 5'-СТАТГААСГТТТТСС(m5C)GCTGACGGACCGTATC-3'  
 G4: 5'-GATACGGTCCGTCAG(m5C)GCGAAACGTTTCATAG-3'  
 G5: 5'-СТАТГААСГТТТТСС(m5C)TGACGGACCGTATC-3'  
 G6: 5'-GATACGGTCCGTCAGС(m5C)GAAACGTTTCATAG-3'  
 G7: 5'-СТАТГААСГТТТТСС(m5C)G(m5C)TGACGGACCGTATC-3'  
 G8: 5'-GATACGGTCCGTCAG(m5C)G(m5C)GAAACGTTTCATAG-3'  
 G9: 5'-СТАТГААСГТТТТСС(m4C)G(m4C)TGACGGACCGTATC-3'  
 G10: 5'-GATACGGTCCGTCAG(m4C)G(m4C)GAAACGTTTCATAG-3'

Олигонуклеотиды с четным номером комплементарны олигонуклеотидам с нечетным номером. Все олигонуклеотидные дуплексы имеют одинаковую первичную структуру и отличаются друг от друга наличием или отсутствием метилцитозина в последовательности GCGC (сайт GCGC, узнаваемый GlaI, подчеркнут).

Выделение плазмидной ДНК рHspAI осуществляли с использованием набора «QIAGEN GmbH» (Германия) согласно протоколу производителя.

Приготовление субстрата для эндонуклеазы GlaI. Для регистрации гидролиза одну из цепей олигонуклеотидного дуплекса модифицировали по 5'-концу с помощью Т4-полинуклеотидкиназы и  $\gamma$ [<sup>32</sup>P]АТФ. После очистки олигонуклеотида от побочных продуктов реакции к нему добавляли комплементарный немеченый олигонуклеотид и пробирку прогревали 5 минут при 95 °С с последующим охлаждением до комнатной температуры на рабочем столе.

Гидролиз олигонуклеотидных дуплексов эндонуклеазой GlaI. Реакцию гидролиза проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей SE-буфер «Y» (33 mM Tris ацетат рН 7,9 (при 25 °С), 10 mM MgAc, 66 mM KAc, 1 mM DTT) и олигонуклеотидный дуплекс в концентрации 62,5 нМ при температура 37 °С в течение 1 часа. За единицу активности фермента принимали такое его минимальное количество, которого достаточно для полного гидролиза олигонуклеотидного дуплекса G7\*/G8.

Определение степени гидролиза олигонуклеотидных дуплексов. Электрофорез продуктов гидролиза проводили в денатурирующем 20%-ном растворе ПААГ с 7 М мочевиной в трис-боратном буфере. Радиоавтографию геля проводили с помощью прибора Cyclone Storage System (Packard Instrument Co., USA). Для каждого меченого продукта определялась величина DLU (Digital Light Units), которая пропорциональна интенсивности излучения изотопом [<sup>32</sup>P], за вычетом фона. Процент гидролиза определяли как отношение DLU для полу-

ченного продукта реакции к сумме DLU, приходящихся на исходную ДНК и полученный фрагмент ДНК. Обработку данных осуществляли с помощью программы OptiQuant V. 0.3.00 (Packard Instrument Co., USA).

Гидролиз плазмидной ДНК эндонуклеазой GlaI. Реакцию проводили в 80 мкл реакционной смеси, содержащей SE-буфер «Y» (33 mM Tris ацетат рН 7,9 (при 25 °С), 10 mM MgAc, 66 mM KAc, 1 mM DTT) и 0,8 мкг ДНК плазмиды рHspAI [3] при температуре 37 °С в течение 1 часа. Продукты гидролиза разделяли в 1,2% агарозном геле в трис-боратном буфере.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Origin 7,0. Для графического отображения результатов применяли Microsoft Office Excel 2003.

## Результаты и обсуждение

Ранее [3] нами была обнаружена новая сайт-специфическая эндонуклеаза GlaI, которая не расщепляет ДНК ни одного из широко используемых субстратов (ДНК фага лямбда и Т7, аденовирусную ДНК, плазмиды рUC19, рBR322) и гидролизует только плазмидную ДНК, содержащую ген ДНК-метилазы HspAI. Фермент M.HspAI метилирует по 5-му положению внутренние цитозины в последовательности GCGC [3], что позволило предположить, а затем и доказать, что сайт-специфическая эндонуклеаза GlaI расщепляет последовательность 5'-G(m5C)GC-3'/3'-CG(m5C)G-5'. Однако неясным оставался вопрос о влиянии метилирования остальных цитозинов в узнаваемой последовательности 5'-GCGC-3' на активность фермента GlaI. В данной работе проводилось изучение эффективности действия эндонуклеазы GlaI в зависимости от количества и положения метилированных цитозинов в сайте узнавания фермента 5'-GCGC-3'. В отличие от всех известных эндонуклеаз рестрикции, получение ДНК-субстратов для GlaI в виде плазмидных, фаговых или других при-



родных ДНК, имеющих в разной степени метилированные сайты узнавания, не представляется возможным. В связи с этим для изучения свойств эндонуклеазы *GlaI* мы использовали химически синтезированные олигонуклеотидные дуплексы, содержащие метилцитозин в различных положениях узнаваемой последовательности 5'-GCCG-3'/3'-CGCG-5'.

На рисунке 1 приведены результаты расщепления олигонуклеотидного дуплекса (одна из цепей которого мечена  $^{32}P$ ) с полностью метилированной последовательностью узнавания 5'-G(m5C)G(m5C)-3'/3'-(m5C)G(m5C)G-5' различными эндонуклеазами. Как видно из рисунка, данный олигонуклеотид гидролизуется эндонуклеазами рестрикции *AclI* (дор. 3) и *Rsr2I* (дор. 4), имеющими сайты узнавания AA<sup>^</sup>CGTT и CG<sup>^</sup>GWCCG, соответственно, а также ферментом *GlaI* (дор. 5,6), и не расщепляется рестриктазой *HspAI* (дор. 2), которая не активна по отношению к собственному сайту узнавания 5'-GCCG-3' при его полном метилировании. Эти данные показывают, что помимо субстратов с двумя С5-метилированными цитозинами [3], фермент *GlaI* способен расщеплять олигонуклеотид, содержащий все четыре метилированных цитозина в сайте узнавания 5'-GCCG-3'/3'-CGCG-5'.

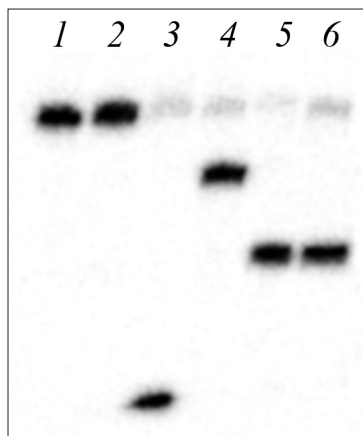


Рис. 1. Расщепление олигонуклеотидного дуплекса G7\*/G8 различными эндонуклеазами. Дорожки: 1 – ДНК-дуплекс без фермента, 2 – гидролиз рестриктазой *HspAI*; 3 – гидролиз рестриктазой *AclI*; 4 – гидролиз рестриктазой *Rsr2I*, 5,6 – гидролиз эндонуклеазой *GlaI* (10 и 2 ед. акт., соответственно).

Для изучения зависимости активности фермента *GlaI* от количества и положения модифицированных цитозинов в последовательности узнавания мы проводили сравнительное изучение эффективности гидролиза различных метилированных олигонуклеотидов. Всего

в обеих цепях сайта узнавания эндонуклеазы *GlaI* находится четыре цитозина, каждый из которых может быть метилирован. Два из них являются внутренними, образующими центральный динуклеотид CG, и два внешних. Как известно, последовательность узнавания 5'-GCCG-3'/3'-CGCG-5' обладает палиндромной симметрией, то есть повторяет себя при повороте на 180 градусов вокруг центральной оси. Расположение метилированных цитозинов в сайте узнавания также может образовывать палиндром и быть симметричным. В таблице 1 представлена структура сайта узнавания *GlaI* в олигонуклеотидных дуплексах, используемых в данной работе, и дано их краткое обозначение.

На рисунке 2 приведен радиоавтограф геля после электрофоретического разделения продуктов гидролиза олигонуклеотидных дуплексов G7\*/G8, G7\*/G4, G7\*/G6, G3\*/G8, G5\*/G8, G3\*/G4 различными количествами эндонуклеазы *GlaI*.

Экспериментальные данные обрабатывались, как указано в «Материалах и методах», и полученные численные значения для дуплексов G7\*/G8, G3\*/G8, G7\*/G4, G8\*/G7, G8\*/G3 и G4\*/G7 представлены на рисунке 3, а для дуплексов G7\*/G6, G6\*/G7, G8\*/G5 и G5\*/G8 – на рисунке 4, в виде зависимости доли гидролизованного олигонуклеотидного дуплекса (в процентах) от количества добавленного фермента *GlaI*. Аналогичные результаты для дуплексов G3\*/G4, G4\*/G3 и G7\*/G2 представлены на рисунке 5. На рисунке 4 также, для удобства сравнительного анализа, представлены данные по расщеплению олигонуклеотидов G3\*/G8 и G4\*/G7.

Как видно из рисунка 3, наибольшая активность фермента наблюдается при наличии в сайте узнавания четырех 5-метилцитозинов (полностью симметричный дуплекс G7\*/G8). Существенно меньшая эффективность гидролиза наблюдается для несимметричного сайта с тремя метилированными цитозинами, из которых два являются внутренними. В этих дуплексах (G3\*/G8 и G4\*/G7) скорости расщепления цепи ДНК с двумя метильными группами отличаются незначительно. При этом гидролиз комплементарной цепи ДНК с одной метильной группой ферментом *GlaI* происходит с меньшей, но также практически равной активностью для обоих олигонуклеотидов.

Из данных, приведенных на рисунке 4, видно, что значительно более низкая эффективность гидролиза наблюдается для несимметричных олигонуклеотидных дуплексов с тремя метилцитозинами, из которых два являются внешними (G7\*/G6, G6\*/G7, G8\*/G5 и

Структура олигонуклеотидных дуплексов

Олигонуклеотидные дуплексы	Расположение С5-метилированных цитозинов в сайте узнавания GlcI	Обозначение дуплекса
G1*/G2, G2*/G1	5'-GCGC-3' 3'-CGCG-5'	—
G1*/G4, G2*/G3	5'-GC G C-3' 3'-CG(m5C)G-5'	—┐
G3*/G2, G4*/G1	5'-G(m5C)GC-3' 3'-C G CG-5'	┐—
G1*/G6, G2*/G5	5'- G CGC-3' 3'-(m5C)GCG-5'	┐—
G5*/G2, G6*/G1	5'-GCG(m5C)-3' 3'-CGC G -5'	—┐
G1*/G8, G2*/G7	5'- G C G C-3' 3'-(m5C)G(m5C)G-5'	┐┐
G7*/G2, G8*/G1	5'-G(m5C)G(m5C)-3' 3'-C G C G -5'	┐┐
G3*/G4, G4*/G3	5'-G(m5C) G C-3' 3'-C G (m5C)G-5'	┐┐
G5*/G6, G6*/G5	5'- G CG(m5C)-3' 3'-(m5C)GC G -5'	┐┐
G3*/G6, G4*/G5	5'- G (m5C)GC-3' 3'-(m5C) G CG-5'	┐┐
G5*/G4, G6*/G3	5'-GC G (m5C)-3' 3'-CG(m5C) G -5'	—┐┐
G3*/G8, G4*/G7	5'- G (m5C) G C-3' 3'-(m5C) G (m5C)G-5'	┐┐┐
G7*/G4, G8*/G3	5'-G(m5C) G (m5C)-3' 3'-C G (m5C) G -5'	┐┐┐
G5*/G8, G6*/G7	5'- G C G (m5C)-3' 3'-(m5C)G(m5C) G -5'	┐┐┐
G7*/G6, G8*/G5	5'- G (m5C)G(m5C)-3' 3'-(m5C) G C G -5'	┐┐┐
G7*/G8, G8*/G7	5'- G (m5C) G (m5C)-3' 3'-(m5C) G (m5C) G -5'	┐┐┐

G5\*/G8). Однако в этом случае скорости расщепления всех цепей ДНК в этих дуплексах близки между собой. И, наконец, еще меньшая активность фермента наблюдается при расщеплении симметричного олиго-

нуклеотидного дуплекса, содержащего два внутренних метилированных цитозина — дуплекс G3\*/G4 (рис. 5). Олигонуклеотиды с двумя метилцитозинами в одной цепи являются плохими субстратами и расщепляются

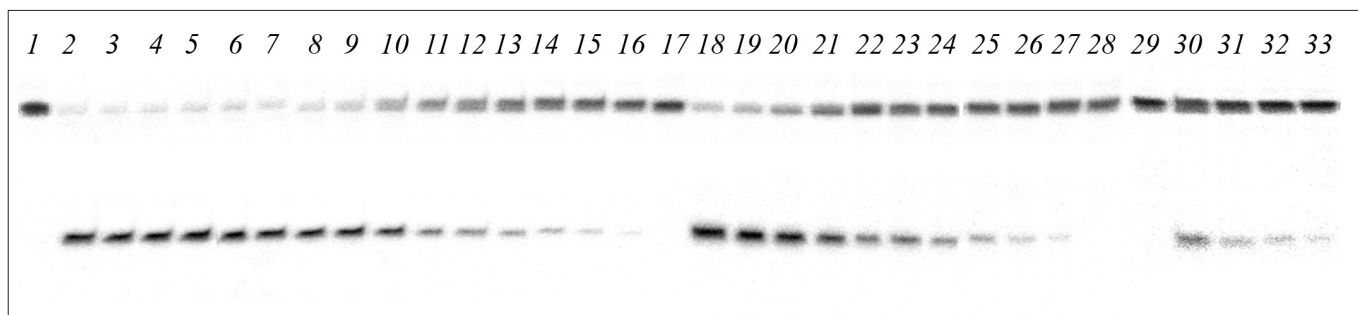


Рис.2. Расщепление олигонуклеотидных дуплексов эндонуклеазой GlaI.

Дорожки: 1–6 – дуплекс G7\*/G8, 7–11 – дуплекс G7\*/G4, 12–16 – дуплекс G7\*/G6, 17 – 22 – дуплекс G3\*/G8, 23–28 – дуплекс G5\*/G8, 29–33 – дуплекс G3\*/G4. GlaI, 8 ед. акт. – 2, 7, 12, 18, 23, 30. GlaI, 4 ед. акт. – 3, 8, 13, 19, 24, 31. GlaI, 2 ед. акт. – 4, 9, 14, 20, 25, 32. GlaI, 1 ед. акт. – 5, 10, 15, 21, 26, 33. GlaI, 0,5 ед. акт. – 6, 11, 16, 22, 27

только при очень высоких концентрациях GlaI (G7\*/G2 на рис. 5С и рис. 7). Для дуплексов с двумя внешними 5-метилцитозинами, одним внешним и один внутренним 5-метилцитозинами в разных цепях и дуплексов с одним 5-метилцитозином сколько-нибудь заметного гидролиза мы не наблюдали (данные не приводятся).

Для сравнения эффективности расщепления различных олигонуклеотидов мы определяли количество

единиц активности фермента, необходимое для достижения гидролиза половины исходного дуплекса (уровень гидролиза 1) и его четверти (уровень гидролиза 2). В первом случае для проведения сравнения использовался рисунок 3. Во втором случае использовались данные, представленные на рисунках 4 и 5. В таблице 2 собраны полученные таким образом результаты.

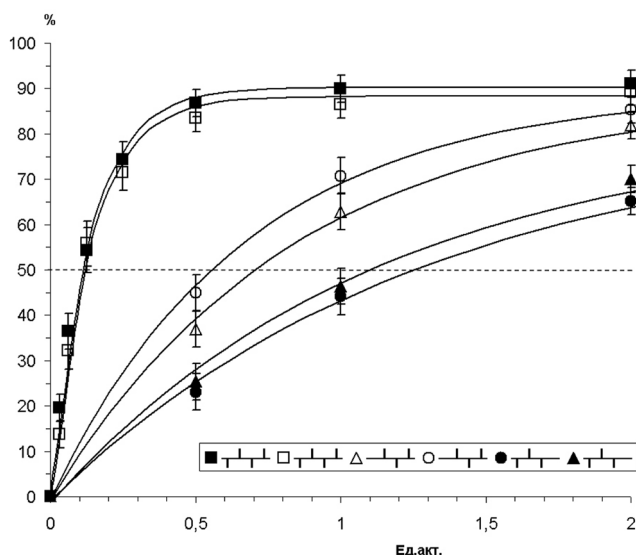


Рис. 3. Зависимость доли гидролизованых дуплексов в % (ось Y) от количества добавленной в реакционную смесь эндонуклеазы GlaI в ед. акт.(ось X). ■ – дуплекс G7\*/G8, □ – дуплекс G8\*/G7, ● – дуплекс G3\*/G8, ○ – дуплекс G8\*/G3, ▲ – дуплекс G4\*/G7, △ – дуплекс G7\*/G4

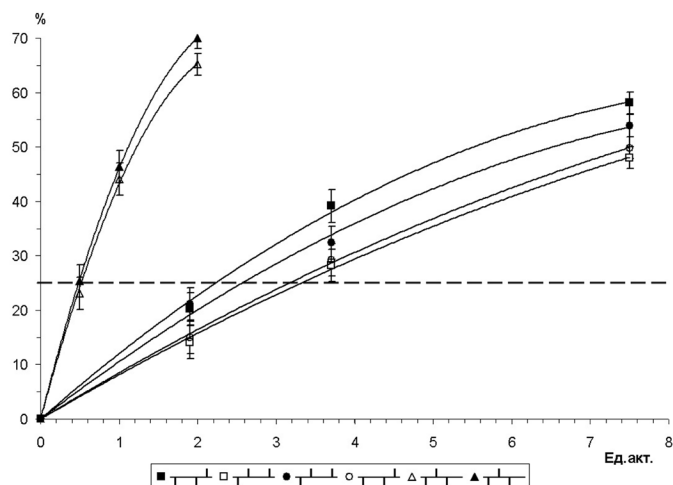








Рис. 4. Зависимость доли гидролизованых дуплексов в % (ось Y) от количества добавленной в реакционную смесь эндонуклеазы GlaI в ед. акт.(ось X). ▲ – дуплекс G4\*/G7, △ – дуплекс G3\*/G8, ■ – дуплекс G5\*/G8, □ – дуплекс G8\*/G5, ● – дуплекс G7\*/G6, ○ – дуплекс G6\*/G7

Таблица 2

Количество единиц активности фермента, необходимых для достижения 25%- и 50%-ного уровней гидролиза олигонуклеотидного дуплекса концентрацией 62,5 нМ в 10 микролитрах реакционной смеси

Олигонуклеотидный дуплекс	Обозначение дуплекса	Количество единиц активности фермента, необходимых для 25%-ного гидролиза	Количество единиц активности фермента, необходимых для 50%-ного гидролиза
G7*/G8 G8*/G7			0,12 0,12
G3*/G8 G8*/G3		0,43	1,25 0,57
G4*/G7 G7*/G4		0,41	1,11 0,72
G5*/G8 G8*/G5		2,2 3,3	
G7*/G6 G6*/G7		2,5 3,1	
G4*/G3 G3*/G4		11,2 10,3	

Из таблицы 2 видно, что минимальное количество фермента, необходимое для расщепления половины олигонуклеотидного субстрата, требуется при гидролизе дуплекса с четырьмя метилцитозинами (G7\*/G8). Если в сайте 5'-GCCG-3'/3'-CGCG-5' остается неметилированным один внешний цитозин (G3\*/G8, G4\*/G7), то, по сравнению с гидролизом дуплекса G7\*/G8, требуется в 5 раз больше фермента для расщепления полностью метилированной цепи и в 10 раз больше для гидролиза второй цепи дуплекса. Таким образом, несимметричные дуплексы G3\*/G8 и G4\*/G7 в целом расщепляются в 10 раз хуже дуплекса G7\*/G8. Эффективность расщепления дуплексов G6\*/G7, G5\*/G8, в которых метилированы два внешних и один внутренний цитозин, еще в 6–8 раз меньше.

Поскольку в бактериальных штаммах обнаружена ДНК-метилтрансфераза, способная метилировать внутренние цитозины в положении С5 в последовательности GCCG, особый интерес представляет сравнение эффективности гидролиза симметрично метилированных олигонуклеотидных дуплексов G3\*/G4 и G7\*/G8. Из рисунка 5 видно, что количество фермента, необходимого для достижения 50%-ного гидролиза в дуплексе, содержащем все четыре метилированных цитозина (G7\*/G8),

приблизительно в 200 раз меньше, чем для дуплекса, содержащем только два внутренних метилированных цитозина (G3\*/G4).

При этом, как видно из результатов расщепления различных субстратов на рисунках 3–5, практически отсутствует влияние окружения сайта на эффективность расщепления олигонуклеотидного дуплекса. В самом деле, хотя в G3 и других нечетных номерах олигонуклеотидов, последовательности узнавания предшествует кластер пиримидинов, тогда как в G4 и других четных номерах олигонуклеотидов перед узнаваемой последовательностью находится блок пуринов, различий в активности фермента по расщеплению четных и нечетных цепей в одинаково метилированных олигонуклеотидах не обнаруживается.

Как следует из полученных результатов, эффективность расщепления олигонуклеотидных дуплексов ферментом Glal зависит от следующих факторов:

1. Количество метильных групп в сайте узнавания. Чем больше метильных групп в сайте узнавания, тем выше скорость гидролиза. Из приведенных выше данных видно, что гидролизуются только те сайты, которые содержат от двух до четырех метилированных цитозинов. Причем, в первом случае,

заметный уровень гидролиза наблюдается только в случае метилирования внутренних цитозинов. Максимальная же скорость гидролиза наблюдается при наличии четырех 5-метилцитозинов в сайте узнавания.

2. Метилирование внутренних цитозинов в сайте является более важным для эффективности гидролиза, чем метилирование внешних. В пользу этого утверждения говорит, во-первых, тот факт, что

при одном и том же количестве метильных групп сайт, в котором модифицированы два внутренних цитозина и один внешний, гидролизуется лучше сайта, в котором метилированы два внешних и один внутренний цитозин. Кроме того, если в сайте метилированы два внешних цитозина, то гидролиз отсутствует, тогда как, если метилированы два внутренних основания, то гидролиз происходит.

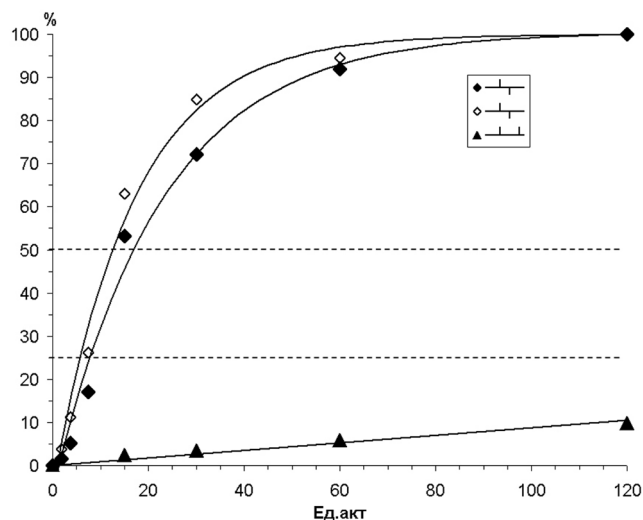
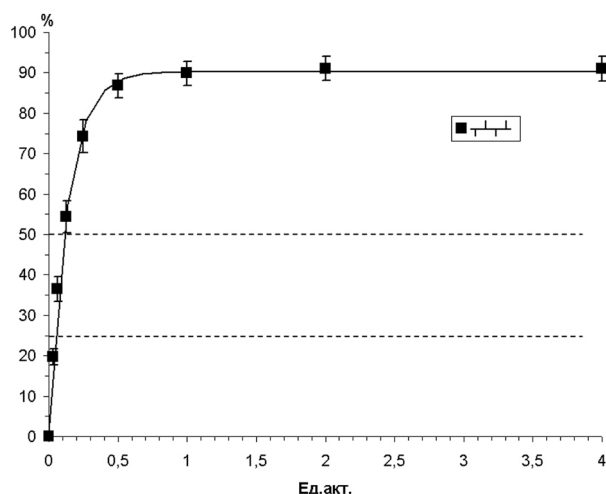
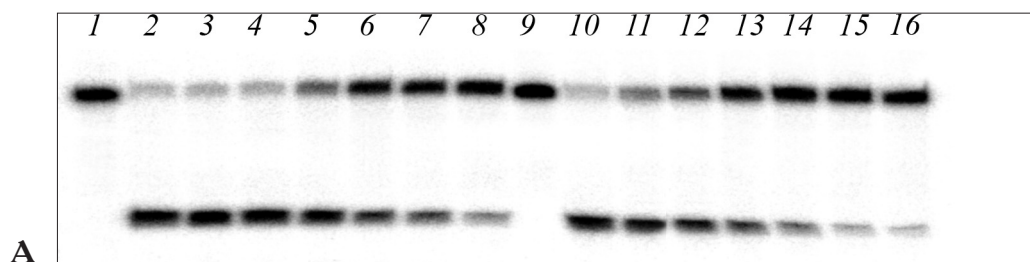


Рис. 5. Сравнение скоростей гидролиза олигонуклеотидных дуплексов с метилированием всех четырех цитозинов (дуплекс G7\*/G8) и двух внутренних цитозинов (дуплекс G3\*/G4) в сайте GCGC.

А: Электрофореграмма. Дорожки: 1–8 – дуплекс G7\*/G8 (контроль, 2,5, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,06, 0,03 ед. акт. GluI, соответственно), 9–16 – дуплекс G3\*/G4 (контроль, 120, 60, 30, 15, 7,5, 3,75, 2 ед. акт. GluI, соответственно).

В, С: Зависимость доли гидролизованных дуплексов в % (ось Y) от количества добавленной в реакционную смесь эндонуклеазы GluI в ед. акт. (ось X). ◆ – дуплекс G3\*/G4, ◇ – дуплекс G4\*/G3, ▲ – дуплекс G7\*/G2, ■ – дуплекс G7\*/G8

Ранее мы изучали расщепление ферментом GluI плазмиды pHspAI, содержащей ген ДНК-метилазы HspAI, узнающей и модифицирующей последовательность 5'-GCGC-3'/3'-CGCG-5' с образованием двух внутренних метилированных цитозинов [3]. Представляет интерес сравнить активность фермента GluI при расщеплении плазмидной ДНК и олигонуклеотидных субстратов. На рисунке 6 показана зависимость рас-

щепления плазмиды pHspAI различными количествами фермента. Сравнение полученных экспериментальных данных с расчетной картиной гидролиза [3] показывает, что практически полный гидролиз наблюдается при добавлении в реакционную смесь 120 единиц активности фермента.

Как видно из данных, приведенных на рисунке 5, для случая олигонуклеотидного дуплекса G3\*/G4, при концен-

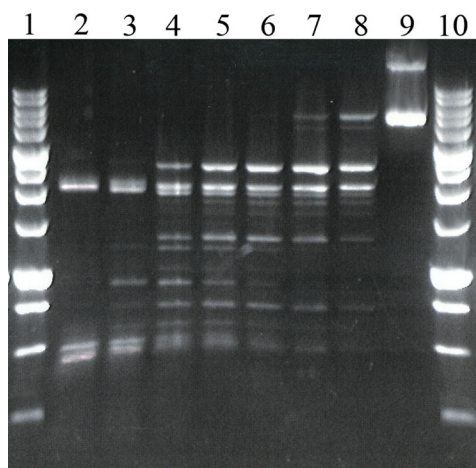


Рис. 6. Гидролиз плазмиды рHspAI различными количествами GlaI. Концентрация сайтов 5'-G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G-5' – 58,7 нМ. Дорожки: 1, 10 – маркер 1 kb, 2–8 – плаزمида рHspAI, обработанная GlaI (2 – 120 ед. акт., 3 – 60 ед. акт., 4 – 30 ед. акт., 5 – 15 ед. акт., 6 – 7,5 ед. акт., 7 – 3,75 ед. акт., 8 – 1,875 ед. акт.), 9 – исходная плазмида рHspAI

трации сайтов 5'-G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G-5' 62,5 нМ, существенный гидролиз субстрата достигается также при добавлении 120 и более единиц активности фермента. Из сравнения этих результатов следует, что эффективности гидролиза ферментом GlaI сайтов 5'-G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G-5', расположенных на олигонуклеотидном дуплексе и в плазмидной ДНК, практически совпадают.

Как известно, модификация цитозина в составе ДНК в бактериальных клетках происходит с образованием как 5-метилцитозина, так и N4-метилцитозина [6, 7]. Нами была проверена возможность гидролиза ДНК, у которой последовательность 5'-GCCG-3' метилирована в положении C4. Для этой цели мы использовали дуплекс G9\*/G10, который отличается от дуплекса G7\*/G8 только тем, что в сайте 5'-GCCG-3' все четыре цитозина метилированы по положению NC4, а не C5.

Как видно из рисунка 7, GlaI не гидролизует дуплекс G9\*/G10, содержащий сайт 5'-G(m4C)G(m4C)-3'/3'-(m4C)G(m4C)G-5'. При этом присутствие цитозина, метилированного в положении NC4 наряду с C5, по-видимому, не влияет на расщепление ДНК: скорость гидролиза дуплекса G7\*/G10, в котором два цитозина в одной цепи ДНК метилированы в положении C5, а два цитозина в другой цепи – в положении NC4, не отличается от скорости расщепления дуплекса G7\*/G2, в котором присутствуют лишь два 5-метилцитозина в одной из цепей.

Остается неясным вопрос о роли эндонуклеаз III в функционировании бактериальной клетки. Одна из возможных функций ферментов этого типа – защита от вторжения чужеродной метилированной фаговой ДНК [2, 3]. И если для ферментов DpnI и BisI такая роль вполне возможна, то в случае GlaI функция защиты от такой ДНК представляется маловероятной. Известные на сегодня бактериальные и фаговые метилазы, которые модифицируют последовательность 5'-GCCG-3', мети-

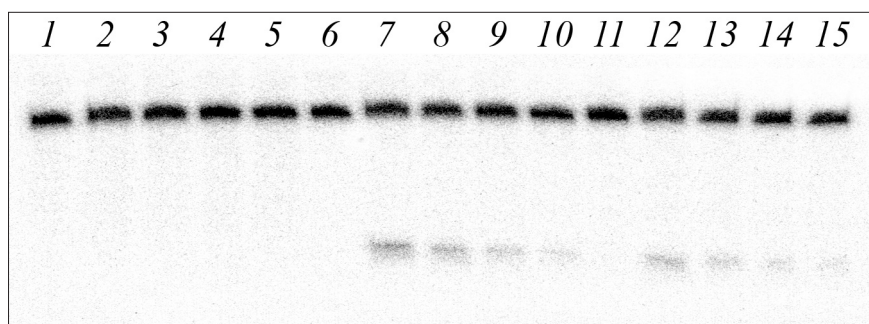


Рис. 7. Влияние C4-модификации сайта 5'-GCCG-3' на способность GlaI гидролизовать ДНК.

Дорожки:

1 – дуплекс G9\*/G10;

2–5 – дуплекс G9\*/G10, обработанный GlaI (120, 60, 30, 15 ед. акт., соответственно);

6 – дуплекс G7\*/G10;

7–10 – дуплекс G7\*/G10, обработанный GlaI (120, 60, 30, 15 ед. акт., соответственно);

11 – дуплекс G7\*/G2;

12–15 – дуплекс G7\*/G2, обработанный GlaI (120, 60, 30, 15 ед. акт., соответственно)

лируют только внутренний цитозин в сайте узнавания [8]. В результате этой модификации образуется сайт 5'-G(m5C)GC-3'/3-GCG(m5C)G-5', скорость гидролиза которого ферментом *GlaI* более чем на два порядка хуже, чем сайта с четырьмя метильными группами. Поэтому остаются открытыми два следующих вопроса:

1. Играет ли какую-то биологическую роль высокая эффективность гидролиза рестриктазой *GlaI* сайтов GCGC с тремя или четырьмя метильными группами?
2. Возможна ли в бактериальной клетке модификация сайта GCGC, при которой метилируются три или четыре цитозина в сайте узнавания?

Следует отметить, что в эукариотических организмах выявлены метилазы, модифицирующие цитозин в положении C5 в сайте 5'-CG-3'. Как показано выше, *GlaI* способен гидролизовать ДНК, модифицированную такими ДНК-метилтрансферазами, что может сделать его важным инструментом в определении статуса метилирования эукариотической ДНК.

В настоящее время основным методом определения статуса метилирования небольших участков эукариотической ДНК (не больше нескольких десятков нуклеотидов) является метод метилспецифического ПЦР [9]. Несомненными достоинствами этого метода являются, во-первых, возможность выявить метилирование в очень небольшом участке эукариотической хромосомной ДНК, а, во-вторых, возможность использования для анализа статуса метилирования очень небольших количеств ДНК. По сравнению с методом метилспецифичного ПЦР применение эндонуклеазы *GlaI* позволяет оценивать статус метилирования сразу всей хромосомной ДНК той или иной ткани.

Специфичность эндонуклеаз рестрикции характеризуется двумя параметрами — сайтом узнавания и местом расщепления ДНК. Как показано выше, в случае ПМ эндонуклеаз существенную роль при определении специфичности и активности фермента играют также количество и распределение 5-метилцитозинов в сайте узнавания. Таким образом, при описании последовательности узнавания сайт-специфических эндонуклеаз ПМ типа необходимо указывать три параметра, ее определяющие: собственно нуклеотидная последовательность, место расщепления ДНК и положение 5-метилцитозинов в сайте узнавания.

## Литература

1. *Arber W., Linn S.* DNA modification and restriction // *Annual Review of Biochemistry.* — 1969. — Vol. 38. — P. 467–500.
2. *Чмуж Е.В., Каширина Ю.Г., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Гончар Д.А., Абдурашитов М.М., Дегтярев С.Х.* Новая эндонуклеаза рестрикции *Bis I* из *Bacillus subtilis* Т30 узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(m5C)NGC-3' // *Биотехнология.* — 2005. — 3. — С. 22–26.
3. *Чернухин В.А., Наякшина Т.Н., Абдурашитов М.А., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Михненкова Н.А., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х.* Новая эндонуклеаза рестрикции *GlaI* узнает метилированную последовательность 5'-G(m5C)<sup>^</sup>GC-3' // *Биотехнология.* — 2006. — № 4. — С. 23–28.
3. *Pingoud A., Jeltsch A.* Structure and function of type II restriction endonucleases // *Nucleic Acids Research.* — 2001. — Vol. 29. — P. 3705–3727.
4. *Lack S., Greenberg B.* A deoxyribonuclease of *Diplococcus pneumoniae* specific for methylated DNA // *J. Biol. Chem.* — 1975. — Vol. 250. — P. 4060–4066.
5. *Malone T., Blumenthal R.M., Cheng X.* Structure-guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-methyltransferases, and suggests a catalytic mechanism for these enzymes // *J. Mol. Biol.* — 1995. — Vol. 253. — P. 618–632.
6. *Dryden D.T.* Bacterial DNA Methyltransferases // In: *S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases: structures and functions* / Eds. Cheng X., Blumenthal R.M. — Singapore: World Scientific, 1999. — P. 283–340.
7. *Roberts R.J., Vincze T., Posfai J., Macelis D.* REBASE: restriction enzymes and methyltransferases // *Nucleic Acids Res.* — 2003. — Vol. 31. — P. 418–420.
8. *Herman J.G., Graff J.R., Myohanen S., Nelkin B.D., Baylin S.B.* Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1996. — Vol. 93. — P. 9821–9826.

Принятые сокращения:

\* — меченный <sup>32</sup>P олигонуклеотид,  
ед. акт. — единица активности.

**DEPENDENCE OF SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE *GlaI* ACTIVITY ON QUANTITY AND LOCATION OF METHYLCYTOSINES IN RECOGNITION SEQUENCE 5'-GCGC-3'.**

J.E. TOMILOVA, V.A. CHERNUKHIN, S.Kh. DEGTYAREV

*SibEnzyme Ltd., Novosibirsk*

The activity dependence of site-specific endonuclease *GlaI* that hydrolyzes only methylated DNA sequence 5'-GCGC-3' on quantity and location of 5-methylcytosines in enzyme's recognition sequence have been studied. A significant DNA cleavage has been observed for oligonucleotides duplexes containing four and three 5-methylcytosines or two internal modified bases. The cleavage efficiency is maximal for DNA duplex with four 5-methylcytosine and decreases when a number of methylated bases are lower.

*Keywords:* site-specific DNA-endonuclease, DNA metylation.



## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ RAPD И SEMI-RAPD ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКИРОВАНИЯ РЕДИСА (*RAPHANUS SATIVUS L.*)

Т. В. МАТВЕЕВА\*

*Санкт-Петербургский государственный университет*

На линиях генетической коллекции редиса проведено сравнение двух методов молекулярного маркирования: 1) ПЦР со случайными 10-членными праймерами — RAPD; 2) ПЦР с полуслучайными 12- и 15-членными праймерами — semi-RAPD. Показано, что по количеству генерируемых ДНК-маркеров линий редиса метод semi-RAPD с полуслучайными 15-членными праймерами достоверно превосходит другие исследованные методы. Процент полиморфных молекулярных маркеров при использовании длинных полуслучайных праймеров выше, чем при использовании коротких полуслучайных праймеров, но не отличается от такого показателя для RAPD маркеров. Таким образом, по комплексу проанализированных характеристик метод semi-RAPD с использованием 15-членных праймеров показал себя наилучшим образом для молекулярного маркирования линий редиса.

*Ключевые слова:* редис, RAPD, semi-RAPD.

Построение генетических карт является важной проблемой как в фундаментальной генетике, так и в прикладных отраслях биологической науки. В последние годы список маркеров для картирования был заметно увеличен благодаря привлечению молекулярных маркеров (ММ). ММ, основанные на применении ПЦР, являются наиболее активно используемыми в силу простоты и дешевизны метода. Одним из наиболее распространенных из них является RAPD (random amplified polymorphic DNA — случайная амплификация полиморфной ДНК). Метод не требует знаний последовательности ДНК-мишени. RAPD-маркеры генерируются амплификацией случайных сегментов ДНК при использовании одиночных праймеров любой последовательности [1]. Образующиеся ПЦР-продукты являются генотип-специфичными и могут быть легко разделены в агарозном геле. Этот метод нерадиоактивный, требует наногаммы ДНК и применим к широкому спектру видов. Как правило, в работе используют десятинуклеотидные праймеры, содержащие более 50% GC. Однако можно использовать

и более протяженные праймеры, но при этом температура их отжига должна быть значительно ниже оптимальной. Для увеличения количества комбинаций ПЦР можно использовать не отдельные праймеры, а комбинировать их в пары. «Двупраймерный» RAPD дает больше мелких фрагментов, чем стандартная методика; при этом больше половины синтезированных продуктов отличаются от «однопраймерного» RAPD [2,3].

Менее распространенным на данный момент является метод, основанный на использовании праймеров, содержащих консервативную и случайную части (рис. 1). В качестве консервативных частей используют последовательности ДНК двух (левой и правой) интрон-экзонных границ. В работах Пржетакевич и соавт. [4] и Гавел и соавт. [5], консервативные части праймеров составляли в длину 7 и 9 нуклеотидов, а их последовательности были следующими: AGCAGGT и АСТТАССТG. В различных источниках, говоря о данном методе, используют термины «полуспецифичные праймеры» (semi-specific primers) или «полуслучайные маркеры» (semi-random markers) [4–5]. Нам кажется логичным обозначить метод как semi-RAPD, поскольку он имеет много общих черт с RAPD, но отличается от него полуслучайной последовательностью праймеров, а, следовательно, и частично предопределенным местом их отжига. Метод хорошо себя зарекомендовал при картировании пшеницы, тритикале и картофеля. Однако остается неясным, насколько универсальна выявленная закономерность.

\* Автор для переписки:

© 2006 г. Матвеева Татьяна Валерьевна, к.б.н.,  
научный сотрудник лаборатории геномной и клеточной инженерии  
растений Биологического НИИ Санкт-Петербургского  
государственного университета.

192289 С.-Петербург, ул. Бухарестская, 152, корп. 1, кв. 77

Факс: (812) 428-77-33

E-mail: radishlet@yahoo.com

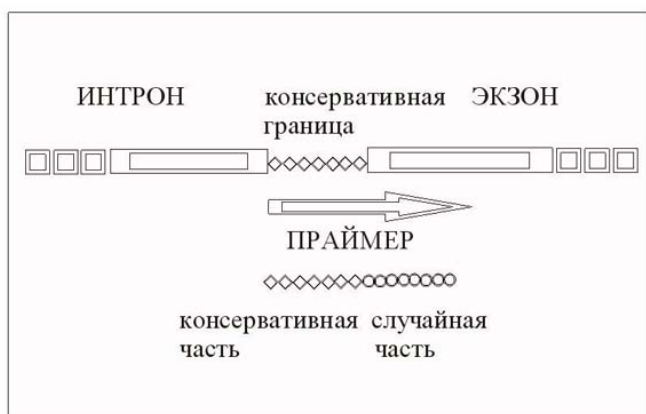


Рис. 1. Схема полуслучайного праймера

Целью данной работы было сравнение методов RAPD и semi-RAPD для молекулярного маркирования редиса.

Линии редиса, использованные в работе, различаются по целому ряду морфологических признаков (табл. 1), что позволяет ожидать выявление достаточно высокого полиморфизма и на уровне ДНК.

**Таблица 1**  
**Характеристика линий редиса, использованных в работе**

Признак	Проявление признака	
	у линии 8	у линии 16
Окраска корнеплода	Красная	Белая с фиолетовыми пятнами
Окраска венчика	Ярко-розовая	Белая с фиолетовыми пятнами
Размер венчика	Крупный	Средний
Антоциановая пигментация стебля	Есть	Нет
Форма стебля	С утолщениями типа кольраби	Без утолщений
Форма листа	Рассеченный, гл. доля нормальная	Рассеченный, гл. доля обрубленная
Ломкость стебля и листьев	Низкая	Высокая
Нарушения геотропизма	Нет	Есть
Способность к опухлеобразованию на корнеплоде	Нет	Есть
Фертильность	Средняя	Очень низкая

В конкретные задачи работы входило:

- оценить количество генерируемых ММ линий редиса и долю полиморфных среди них при использовании методов:
  - RAPD с одиночными 10-членными праймерами и их двупраймерными комбинациями;
  - semi-RAPD с одиночными 12-членными праймерами и их двупраймерными комбинациями;
  - semi-RAPD с одиночными 15-членными праймерами и их двупраймерными комбинациями;
- выявить метод, при котором генерируется наибольшее количество ММ, сопоставить долю полиморфных ММ, полученных данным методом, с таким показателем для других исследуемых методов.

## Материалы и методы

В работе использованы линии 8 и 16 редиса *Raphanus sativus*, созданные в лаборатории генетики растений Биологического НИИ СПбГУ. Характеристика линий представлена в таблице 1.

ДНК выделяли по модифицированной нами ранее методике Дрейера и Скотта [6].

ПЦР проводили в объеме 50 мкл с использованием амплификатора Терцик («ДНК технологии»). Реакционная смесь содержала 10 нг ДНК, 10 пкМ праймера (ов), 2,5 U Taq полимеразы (Силекс М), буфер, предложенный фирмой-производителем фермента (концентрация  $Mg^{2+}$  в 1x буфере Силекс М составляет 2,5 мМ) и 200 мкМ каждого dNTP. Для RAPD анализа использовано 10 случайных 10-членных праймеров (A1–A10, ROTH) и все их двупраймерные комбинации. Последовательности праймеров представлены в таблице 2.

Semi-RAPD анализ был проведен в двух вариантах: с использованием 12- и 15-членных праймеров, последовательности которых приведены в таблице 3. Праймеры синтезированы фирмой «Синтол». Для каждого варианта использовано по 10 праймеров. Кроме того, проведены ПЦР со всеми возможными их двупраймерными комбинациями.

ПЦР с использованием 10- и 12-членных праймеров проводили по программе: 5 мин. – 93 °С, 33 цикла (17 сек. – 93 °С, 40 сек. – 37 °С, 40 сек. – 72 °С), далее 5 мин. – 72 °С.

ПЦР с использованием 15-членных праймеров проводили по следующей программе: 5 мин. – 93 °С,

Таблица 2

**Последовательности случайных праймеров, использованных в работе  
(Roth Random Primer Kit A)**

Название праймера	Последовательность 5'-3'
A1	CAGGCCCTTC
A2	TGCCGAGCTG
A3	AGTCAGCCAC
A4	AATCGGGCTG
A5	AGGGGTCTTG
A6	GGTCCCTGAC
A7	GAAACGGGTG
A8	GTGACGTAGG
A9	GGGTAACGCC
A10	GTGATCGCAG

Таблица 3

**Последовательности полуслучайных праймеров**

12-членные праймеры		15-членные праймеры	
Название	Последовательность 5'-3'	Название	Последовательность 5'-3'
SR1	AGCAGGTCAGGC	SR11	ACTTACCTGCCCTTC
SR2	AGCAGGTTGCCG	SR12	ACTTACCTGGAGCTG
SR3	AGCAGGTAGTCA	SR13	ACTTACCTGAGCCAC
SR4	AGCAGGTAATCG	SR14	ACTTACCTGCGCCGT
SR5	AGCAGGTAGGTC	SR15	ACTTACCTGGTCTTG
SR6	AGCAGGTGGTCC	SR16	ACTTACCTGCCTGAC
SR7	AGCAGGTGAACG	SR17	ACTTACCTGCGGGTG
SR8	AGCAGGTGTGAC	SR18	ACTTACCTGCGTAGG
SR9	AGCAGGTGGGTA	SR19	ACTTACCTGAACGCC
SR10	AGCAGGTGTGAT	SR20	ACTTACCTGTGCGCAG

7 циклов (17 сек. – 93 °С, 40 сек. – 46 °С, 40 сек. – 72 °С), 26 циклов (17 сек. – 93 °С, 40 сек. – 48 °С, 40 сек. – 72 °С), далее 5 мин. – 72 °С.

Данные температурные условия реакций были выбраны на основании предварительных экспериментов как дающие наиболее стабильные и воспроизводимые результаты.

Фрагменты разгоняли в 1%-ном агарозном геле на 1-кратном буфере ТВЭ. В качестве маркера молекулярных весов использовали 100 bp+1,5 kb ladder («Сибэнзим»), или 1 kb ladder («Медиген»).

В случае наблюдения межлинейных различий среди продуктов реакций проводили повторные ПЦР для оценки воспроизводимости результатов.

Документацию результатов осуществляли с использованием системы ввода и анализа изображения («Силекс М»).

*Статистическая обработка данных.* Для каждого варианта опыта высчитывали среднее количество ММ для конкретного праймера, или дупраймерной комбинации, его ошибку. Сравнение методов по количеству генерируемых ММ проводили с использованием

t-критерия Стьюдента. Кроме того, высчитывали процент полиморфных ММ для каждого варианта опыта и его ошибку [7].

### Результаты

В результате ПЦР как со случайными, так и с полуслучайными праймерами наблюдали образование продуктов размером от 100 до 2000 нп. Количество продуктов варьировало от 1 до 7. На рисунке 2 представлены в качестве примера результаты электрофоретического разделения фрагментов нескольких таких реакций.

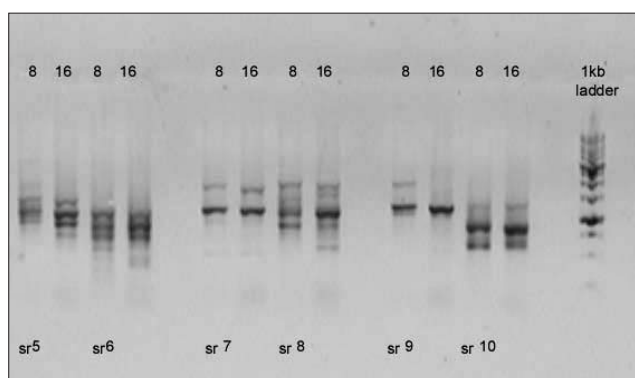


Рис. 2. Результаты ПЦР на ДНК линий 8 и 16 с некоторыми полуслучайными праймерами. Названия праймеров указаны под соответствующими им дорожками, номера линий — над соответствующими им дорожками

На фото видно, что:

- при использовании праймеров sr7 и sr10 между исследуемыми линиями нет различий по количеству и размерам амплифицируемых продуктов;
- при использовании праймера sr8 амплифицируется 4 четких фрагмента ДНК, один из которых (размером около 0,9 kb) присутствует только у линии 8, то есть является полиморфным;
- при использовании праймера sr9 амплифицируется 2 фрагмента ДНК, один из которых (размером около 2 kb) присутствует только у линии 8, то есть также является полиморфным.

Всего при использовании 30 праймеров и 135 двупраймерных комбинаций нами было получено 482 ММ, среди которых 99 были полиморфными.

В случае использования 10-членных случайных праймеров и 12-членных полуслучайных праймеров, а также их двупраймерных комбинаций нами было показано отсутствие достоверных различий ( $p=95\%$ ) по

количеству молекулярных маркеров на реакцию. Средние количества ММ на реакцию составили для RAPD  $2,69 \pm 0,14$ , для semi-RAPD —  $2,85 \pm 0,16$ . Среднее количество ММ на реакцию в случае 15-членных праймеров было достоверно ( $p=95\%$ ) выше и составило в среднем  $3,93 \pm 0,20$  (рис. 3).

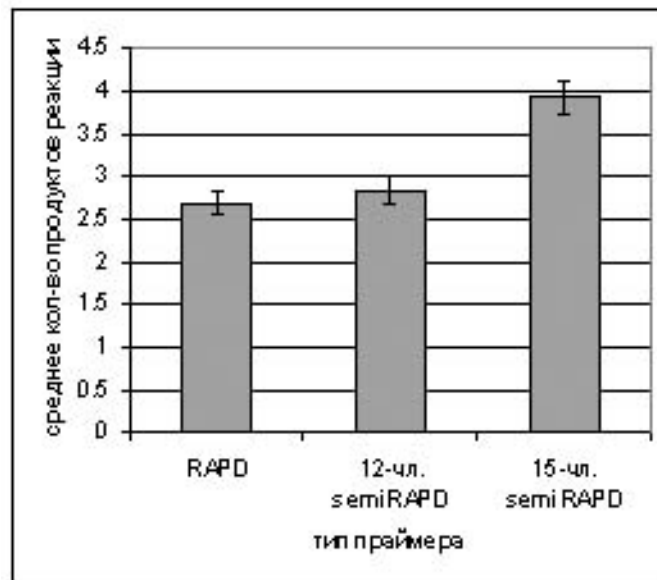


Рис. 3. Среднее количество продуктов ПЦР линий 8 и 16 редиса при использовании различных праймеров

Проценты полиморфных локусов среди RAPD и semi-RAPD маркеров представлены в виде диаграмм на рисунке 4.

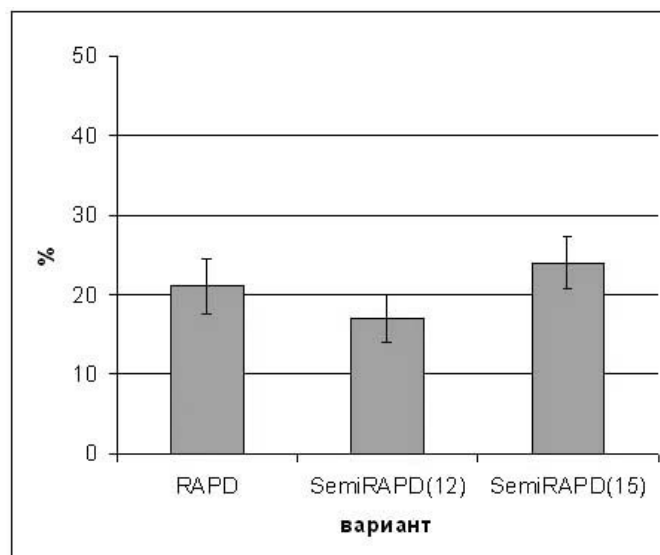


Рис. 4. Процент полиморфных ММ в различных вариантах ПЦР линий 8 и 16 редиса

Показано, что процент полиморфных ММ линий 8 и 16 при использовании длинных полуслучайных

праймеров составляют  $24 \pm 3,2\%$ . Он является более высоким, чем при использовании коротких полуслучайных праймеров, но достоверно не отличается от такового показателя для RAPD маркеров.

Следует отметить, что данные численные характеристики отражают только особенности конкретных линий редиса, однако такая тенденция сохраняется и для других линий [8].

### Обсуждение

Полученные нами данные частично согласуются с результатами Пржетакевича с соавторами и Гавел с соавторами [4, 5]. Они показали, что при картировании картофеля, пшеницы и тритикале оба типа полуслучайных праймеров дают больше ММ, чем RAPD-праймеры. То, что нами данная тенденция отмечена лишь для более длинных полуслучайных праймеров, может объясняться спецификой объекта исследования. У диплоидного редиса со сравнительно небольшим геномом в результате одной реакции было возможно получить в среднем меньшее количество фрагментов, чем у полиплоидных пшеницы и тритикале. У данных видов в результате одной реакции получали до 28 ММ. Диплоидные линии картофеля тоже характеризовались большим количеством ММ, полученных в одной ПЦР. Вероятно, различия обусловлены большим размером генома картофеля. Следовательно, при сопоставимых количествах реакций количества молекулярных маркеров, полученных у тритикале, пшеницы и картофеля, превышали таковой показатель для редиса. Возможно, это обстоятельство позволило увеличить значимость различий между отдельными вариантами опыта до статистически достоверного уровня. Кроме того, помимо количественных различий, такую картину могли вызвать качественные различия геномов данных объектов.

### Заключение

Таким образом, среднее количество фрагментов ПЦР с 15-членными полуслучайными праймерами у редиса было выше, чем данный показатель для 10-членных RAPD праймеров и 12-членных полуслучайных праймеров. Доли полиморфных ММ, полученных при ПЦР с 15-членными полуслучайными праймерами и 10-членными RAPD праймерами, достоверно не различались, но были выше данного показателя для 12-членных полуслучайных праймеров. Учитывая все вышесказанное, становится понятно, что абсолютное количество поли-

морфных ММ было выше в случае ПЦР с 15-членными полуслучайными праймерами. То есть, в нашей работе по комплексу проанализированных характеристик метод semi-RAPD с использованием 15-членных праймеров показал себя наилучшим образом для молекулярного маркирования линий редиса.

*Данная работа осуществлена при финансовой поддержке Министерства образования РФ (грант PD02-1.4-142). Автор благодарит профессора Л.А. Лутова за содействие в выполнении работы.*

### Литература

1. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // NAR. — 1990. — Vol. 18. — P. 6531–6535.
2. Welsh J., McClelland. Genomic fingerprinting genomes using arbitrary primed PCR and matrix of pairwise combinations of primers // NAR. — 1991. — Vol. 19. — N 19. — P. 5275–5279.
3. Hu J., van Eysden J., Quiros C.F. Generation of DNA-based markers in specific genome regions by two-primer RAPD reactions // PCR Methods Appl. — 1995. — Vol. 4. — P. 346–351.
4. Gaweł M., Wisniewska I., Rafalski A. Semi-specific PCR for the evaluation of diversity among cultivars of wheat and triticale // Cellular and Molecular Biology Letters. — 2002. — Vol. 7. — P. 577–582.
5. Przetakewicz J., Nadolska-Orczyk A., Orczyk W. The use of RAPD and semi-random markers to verify somatic hybrids between diploid lines of *Solanum tuberosum* L. // Cellular and Molecular Biology Letters. — 2002. — Vol. 7. — P. 671–676.
6. Матвеева Т.В., Додуева И.Е., Вуд Д. и др. Изучение роли фитогормонов в опухолеобразовании у редиса // Генетика — 2000. — Т. 36. — № 2. — С. 203–208.
7. Терентьев П. В., Ростова Н.С. Практикум по биометрии. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1979. — С. 151.
8. Матвеева Т.В., Богомаз Д.И., Лутова Л.А. Сравнительная характеристика методов RAPD и semi-RAPD для молекулярного картирования растительных геномов // Материалы 7-й Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология — наука XXI века». Москва, апрель 2003.

*Список сокращений*

ММ — молекулярные маркеры.

ПЦР — полимеразная цепная реакция.

RAPD — random amplified polymorphic DNA — случайная амплификация полиморфной ДНК.

Semi-RAPD — полуслучайная амплификация полиморфной ДНК (в отличие от RAPD, метод основан на использовании праймеров, у которых только часть последовательности является случайной).

## **COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF RAPD AND SEMI-RAPD METHODS FOR MOLECULAR MARKING OF RADISH (*RAPHANUS SATIVUS* L.)**

T.V. MATVEEVA

*St.-Petersburg State University*

Lines from genetic collection of radish were used to compare two methods of molecular marking: 1) PCR with random 10-mer primers — RAPD; 2) PCR with semi-specific 12- and 15-mer primers — semi-RAPD. It was shown, that amount of PCR fragments synthesized on radish DNA was higher in case of semi-RAPD with 15-mer primers. The percentage of polymorphic molecular markers was higher in case of usage of long semi-specific primers, comparing to the short ones; but does not statistically differ from this characteristic of RAPD. So, analysis of complex of these features indicates that semi-RAPD with 15-mer primers shows itself from the best side for the molecular mapping of radish lines.

*Keywords:* radish, RAPD, semi-RAPD.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛЮКОЗАМИНИЛМУРАМИЛДИПЕПТИДА В ГИДРОЛИЗАТАХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

М.В. ГАВРИЛИН\*, С.П. СЕНЧЕНКО

*Пятигорская государственная фармацевтическая академия*

Среди иммуностимулирующих лекарственных препаратов в последнее время стремительно развивается подгруппа иммуномодуляторов микробного происхождения (ИМП). Это связано, прежде всего, с высокой эффективностью и практически полной безвредностью подобных лекарственных средств. Их иммуностимулирующий эффект реализуется через воздействие нескольких видов химических структур, характерных для многих микроорганизмов, на клетки врожденной иммунной системы (мононуклеарные фагоциты, естественные киллеры В-лимфоциты, полиморфноядерные лейкоциты, эпителиальные и дендритные клетки). Эти структуры получили название «патоген-ассоциированные молекулярные образы», или РАРМ (pathogen-associated molecular patterns), а соответствующие им рецепторы врожденной иммунной системы — «образ-распознающих рецепторов», или РРР (pattern-recognition receptors) [7]. Наиболее известными РАРМ являются бактериальные гликопептиды. Данные структуры характеризуются выраженным иммуностимулирующим действием, а также отсутствием побочных эффектов при энтеральном введении [1].

Гликопептиды бактерий являются производными мурамилдипептида и образуются в ходе гидролиза пептидогликана клеточной стенки бактерий [5]. Доля пептидогликана в грам-отрицательных бактериях составляет около 10% от сухой массы клеточной стенки, в то время как в грам-положительных бактериях данный показатель достигает 70%, что является одним из приоритетов использования грам-положительных бактерий для получения микробных лизатов [3].

ИМП применяются как в виде самих лизатов микроорганизмов (бронхомунал, имудон, ИРС-19, постеризан), так и в виде минимальных биологически активных фрагментов (гликопептиды мурамилдипептидного ряда), полученных синтетическим путем, например, ликописид, ромуртид, мурабутид. Данный ряд лекарственных средств производится, как правило, иностранными фирмами.

Вместе с тем хотелось бы отметить, что ИМП на основе лизатов бактерий — это комплексные РАРМ-содержащие препараты, оказывающие влияние на врожденную иммунную систему преимущественно через сигнальные РРР. Однако, проанализировав компонентный состав большинства ИМП, можно сделать вывод, что данные препараты отличаются явной избыточностью. Это связано с тем, что в состав многих ИМП входят лизаты десятков родов и видов бактерий, в то время как РАРМ большинства из них — это одни и те же вещества. Известно, что каждый лишний компонент повышает стоимость препарата и создает дополнительный риск развития побочных эффектов [7]. Также сложно объяснить использование производителями ИМП патогенных штаммов бактерий ввиду того, что и лизаты бактерий, входящих в состав нормофлоры человека, имеют в своем составе РАРМ. Например, глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП), который выпускается в нашей стране ЗАО «Пептек» под торговым названием ликописид, был впервые выделен из гидролизата *Lactobacillus bulgaricus* [1].

Кроме того, накоплен значительный опыт культивирования лактобактерий для получения эубиотических лекарственных средств, что также снижает ценовой поря-док ИМП на основе лизатов данных бактерий, например, в сравнении с синтетическими аналогами.

Поэтому представляется актуальной разработка препарата на основе лизата лактобактерий, который рас-

\* Автор для переписки:

© 2006 г. Гаврилин М.В.

Пятигорская государственная  
фармацевтическая академия

ширил бы отечественный ряд подобных лекарственных средств и являлся бы конкурентоспособным аналогом зарубежных препаратов. При создании подобного лекарственного средства необходимо контролировать количественное содержание гликопептидов, образующихся в ходе лизиса бактериальной массы.

В связи с этим целью данного исследования является разработка методики количественного определения ГМДП в лизатах молочнокислых бактерий. Для этого в лабораторных условиях были получены 5 образцов лизатов молочнокислых бактерий штамма *Lactobacillus acidophilus B 2505*, зарегистрированного Всероссийской коллекцией промышленных микроорганизмов (депозитор — НИИ комплексного использования молочного сырья, г. Ставрополь).

Гидролиз бактериальной массы проводили ферментативным способом. Постоянными условиями были рН и температура опыта, значения которых были в пределах оптимума действия фермента. Переменным же условием было время (от 1 до 5 часов). В ходе эксперимента были получены 5 различных гидролизатов при одинаковых соотношениях бактериальной массы, воды и фермента, а также процедурах их очистки.

Для количественного определения веществ пептидной природы в мировой практике обычно используются хроматографические и электрофоретические методы. Например, для анализа ГМДП в таблетках применяется высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Однако, к сожалению, данный метод не дает возможности количественно определить его в гидролизатах. Это связано с тем, что ВЭЖХ в обращенно-фазовом варианте имеет относительно низкую эффективность при анализе сорбатов с высокой полярностью, которая не позволяет разделить ГМДП с другими пептидами и аминокислотами, образующимися в ходе гидролиза.

Поэтому для анализа ГМДП в гидролизатах нами был использован метод капиллярного электрофореза, имеющего, по сравнению с ВЭЖХ, гораздо более высокую эффективность [6]. За основу была взята методика выполнения измерений массовой доли аминокислот методом капиллярного электрофореза. По данной методике аминокислоты определяют после модифицирования с помощью фенилизотиоцианата в форме фенилизотиокарбамильных производных. Для анализа использовали капилляр с рабочей длиной 65 см и диаметром 50 мкм, разделение вели в фосфатном и боратном электролитах, регистрация электрофореграмм проходила при длине волны 254 нм.

Первым этапом исследования был выбор оптимального по составу электролита. Для этого использовали буферные растворы различного состава: фосфатный (10 мг/мл) с рН=7,7 и боратный (10 мг/мл) с рН=9,2. Анализ производного ГМДП вели в модельной смеси с производными аминокислот, входящих в состав гидролизатов. В ходе анализа было установлено, что в фосфатном электролите (10 мг/мл) пик ГМДП накладывается на пик пролина, в то время как боратный буферный раствор (10 мг/мл) позволяет разделить производное ГМДП от соответствующих производных всех аминокислот, находящихся в модельной смеси.

Следующим этапом работы стало определение данного вещества в гидролизатах. Однако при анализе гидролизатов в боратном электролите (10 мг/мл) было установлено, что пик ГМДП не является однородным. В связи с этим повышали ионную силу электролита, что приводит к снижению электроосмотического потока и соответственно увеличивает коэффициент разделения пиков [6]. Для этого концентрацию электролита (в данном случае натрия тетрабората десятиводного) повышали до 50 мг/мл. Показано, что с увеличением концентрации электролита эффективность разделения улучшается, однако пик ГМДП все равно остается неоднородным. Дальнейшее повышение концентрации ведущего электролита не приводило к улучшению разделения.

В мировой практике для улучшения разделения компонентов в пробе используют добавку макроциклических реагентов, например  $\beta$ -циклодекстрина [6, 2]. Нами установлено в гидролизате, полученном в боратном буфере (50 мг/мл) с добавкой  $\beta$ -циклодекстрина, что добавление макроциклического реагента заметно увеличивает разделение компонентов пробы, однако такое разделение позволяет только качественно определять ГМДП в гидролизатах. Для количественного же определения этого не достаточно.

Поэтому на заключительном этапе выбора условий количественного определения ГМДП в гидролизатах был использован мицеллярный вариант электрофореза, когда в состав ведущего электролита вводится додецилсульфат натрия в концентрации превышающей критическую концентрацию мицеллообразования [6]. Мицеллярный электрофорез позволяет изменить время выхода нейтральных компонентов пробы, которые возможно могли мешать количественному определению ГМДП в гидролизатах. В гидролизате, полученном в боратном буферном растворе (50 мг/мл) с добавкой додецилсульфата натрия, было обнаружено, что пик ГМДП полностью разделен с пиками сопутствующих компонентов пробы.



Характеристики пика ГМДП в разработанных условиях были следующими: эффективность порядка 220 тысяч, асимметрия 1,28, коэффициент разделения 1,2, что позволяет использовать данные условия анализа для количественной оценки содержания ГМДП в гидролизатах молочнокислых бактерий.

Разработанная методика была валидирована согласно рекомендациям Международной конференции по гармонизации (International Conference on Harmonization – ICH) [4] по следующим показателям: линейность, прецизионность, специфичность и точность. В ходе определения линейности было установлено, что график зависимости площади пика от концентрации ГМДП имеет линейный характер в широком диапазоне.

Вторым этапом валидационной оценки было установление прецизионности на уровне сходимости параллельных определений. Для этого вычисляли величину стандартного отклонения результатов 6 параллельных определений. В результате исследований установлено, что данная величина не превышала 2%, что соответствует требованиям ICH.

Следующим этапом исследований было определение специфичности данной методики. Для этого методом добавок было установлено, что площадь пика ГМДП увеличивается пропорционально количеству добавленного стандарта; в то же время асимметрия пика остается на прежнем уровне, что служит еще одним подтверждением того, что данный пик принадлежит ГМДП.

Наконец, заключительным этапом валидационной оценки разработанной методики было установление точности полученных определений. Для этого готовили 9 модельных смесей растворов ГМДП с аминокислотами на 3 уровнях концентраций ГМДП и подвергали их анализу по разработанной методике. В качестве критерия точности использовали открываемость. В результате граничные значения открываемости были в пределах от 98 до 102%, что, согласно рекомендациям ICH, достаточно для анализа лекарственных препаратов.

С использованием данной методики были проанализированы полученные гидролизаты. Результаты исследования свидетельствуют, что наибольшее количество ГМДП накапливается через 3 часа гидролиза, что делает перспективным дальнейшее изучение гидролизатов, полученных указанным способом.

Таким образом, разработана методика количественного определения ГМДП в гидролизатах молочнокислых бактерий. Данная методика была валидирована согласно рекомендациям ICH по 4 основным показателям. Использование разработанной методики позволило выбрать оптимальные условия ферментативного гидролиза.

## Литература

1. *Иммунomodулятор ликопид в комплексном лечении заболеваний: Сб. науч. ст.: в 2 ч.* / ЗАО «Пептек». – М.: ООО «Тактик-Студио», 2004. – Ч. I. – 112 с.
2. *Система капиллярного электрофореза. Основы метода. Аппаратура. Примеры использования систем капиллярного электрофореза «Капель-103, -104, -105».* / Р.М. Ануфриева [и др.]. – СПб.: «Издательство «Петрополис», 2001. – 65 с.
3. *Медицинская микробиология* / Гл. ред. В.И. Покровский, О.К. Поздеев. – М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1998. – 1200 с.: ил.
4. *Validation of analytical procedures: methodology Q2B* / International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. – Geneva: ICH Secretariat, 1996. – 8 p..
5. *Овчинников Ю.А.* Биоорганическая химия: учеб. пособие. – М.: Просвещение, 1987. – 815 с.
6. *Новый справочник химика и технолога. Аналитическая химия. Ч. I.* – СПб.: АНО НПО «Мир и Семья», 2002. – 964 с.
7. *Козлов И.Г.* Лекарственные воздействия через рецепторы врожденного иммунитета [Электрон. Ресурс]. Электрон. дан. (1 файл). – М., 2004. – Режим доступа: <http://www.peptek.ru>.

## ГЕНЫ И БЕЛКИ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ ДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК ПРОКАРИОТ

И.Е. ВИШНЯКОВ, С.Н. БОРХСЕНИУС\*

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург*

Процесс деления, в случае бактерий называемый иногда септацией, происходит после того, как закончилась репликация ДНК и сегрегация нуклеоида. Цитокинез бактериальной клетки и удвоение органелл внутри эукариотной клетки начинаются с образования перегородки (септы). Очевидно, что процесс деления клетки должен быть хорошо скоординирован в пространстве (локализация сайта деления) и времени (инициация деления наступает строго после сегрегации двух дочерних хромосом), а также в количественном и в качественном соотношениях компонентов, необходимых для его осуществления.

Функции основных компонентов аппарата деления бактерий и органелл эукариотных клеток принципиально сходны. Процесс септации направляется так называемым Z-кольцом, кольцом сжатия, которое формируется в области сайта деления, обычно посередине клетки. Главной структурной и функциональной единицей кольца является нуклеотид-связывающий белок, способный к полимеризации-деполимеризации. В аппарате деления большинства прокариот, всех пластид, а также митохондрий некоторых примитивных эукариот таким белком является FtsZ [7, 46, 57]. Кольцо из полимеризовавшегося белка FtsZ закоривается на цитоплазматической мембране клетки при помощи «вспомогательных» белков, после чего начинает сжиматься.

Белок FtsZ в значительной части гомологичен тубулину, из которого состоят микротрубочки эукариот, и считается эволюционным предшественником тубулина. Семейство белков FtsZ широко распространено среди прокариот и растений, где эти белки используются для деления хлоропластов. Но белок FtsZ или его гомологи определено отсутствуют у одной из трех групп архей, некоторых бактерий и у митохондрий большинства

эукариот. Предполагается, что в названных случаях действуют совершенно иные механизмы деления, при которых FtsZ не используется [18].

У пластид (хлоропластов) помимо гомологов прокариотных FtsZ, известны еще два типа белков деления: динамины и белки PD, а у митохондрий — специфический белок MD. Однако у ряда микроорганизмов, геномы которых полностью секвенированы, гены белков деления ни одного из этих трех типов не обнаружены. Среди них — патогенная микоплазма *Ureaplasma urealyticum (parvum)*.

Целью предлагаемого обзора является рассмотрение существующих представлений о молекулярных механизмах деления прокариот в сравнительном аспекте, включая органеллы (пластиды и митохондрии) эукариот, и обобщение данных о структуре и функциях основных белков деления — главных игроков в этом важнейшем процессе.

### Деление прокариотных клеток

Наиболее полно процесс клеточного деления исследован у *E. coli*. Большинство генов и белков деления этой бактерии было идентифицировано при исследовании клеток с условно летальными мутациями. Группа мутаций, приводящих к формированию длинных полинуклеотидных тяжей, состоящих из клеток, не разделившихся при непермиссивных температурах, была названа мутациями fts (filamentous temperature sensitive). При этом блокировка деления мутантных клеток не влияла на процессы репликации и сегрегации ДНК [26].

В геноме *E. coli* выявлено как минимум 16 генов клеточного деления. Многие гены деления и пептидогликанового синтеза расположены на хромосоме компактно и объединены в так называемый кластер dcw (division and cell wall). Кластер не транскрибируется как целая молекула РНК. Промоторы в этом кластере часто локализованы внутри последовательностей близлежащих структурных генов. Так, ген ftsZ транскрибируется с ряда промоторов, расположенных в пределах генов ddlB, ftsQ и ftsA кластера dcw [58]. Вероятно, это необходимо

\* Автор для переписки:

© 2006 г. Борхсениус Сергей Николаевич, д.б.н., профессор, зав. лаб. структурной организации генома Института цитологии РАН  
194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр-т, 4  
E-mail: borch@mail.cytspb.rssi.ru

для увеличения надежности синтеза белка FtsZ. В клеточном цикле максимальный уровень транскрипции *ftsZ* соответствует началу образования септы.

Предполагается, что FtsZ — первый белок, который появляется на месте будущего макромолекулярного комплекса — дивисомы [10]. На основании рентгеноструктурного анализа выявлено значительное сходство третичных структур FtsZ и мономеров  $\alpha/\beta$ -тубулина, несмотря на сравнительно слабую гомологию первичных последовательностей [32]. Предсказанная вторичная структура белка FtsZ и тубулинов имеет удивительное сходство на участках, расположенных в районе глицин-богатой петли. В аминокислотных последовательностях как тубулинов, так и белка FtsZ отсутствуют три участка, образующих ГТФ-связывающие мотивы семейства мембранных G-белков. В то же время анализ трехмерной структуры этих белков позволил обнаружить высокое сходство между ГТФ-связывающими доменами G-белков, белка FtsZ и тубулинов [17]. Функциональное сходство тубулинов и FtsZ проявляется в способности к связыванию и гидролизу ГТФ, а также в способности образовывать линейные неветвящиеся полимеры (протофиламенты) *in vitro*. К началу деления белок FtsZ составляет основу структуры, известной как Z-кольцо. В эволюционном плане филаменты Z-кольца считают предшественниками микротрубочек эукариот [19].

Участие белка, кодируемого геном *ftsZ*, в клеточном делении впервые было выявлено на *E. coli* [35]. FtsZ *E. coli* —  $Mg^{2+}$ -зависимая ГТФаза. В неделящихся клетках насчитывается от 5 до 20 тысяч молекул FtsZ, которые распределены по всей цитоплазме. Однако к моменту инициации процесса деления они формируют Z-кольцо посередине клетки. При последующем «вращении» пептидогликановой стенки внутрь клетки диаметр кольца постепенно уменьшается, и к моменту окончания сборки перегородки (септы) кольцо исчезает [10]. Позже белок FtsZ был выявлен у большинства основных групп бактерий, в эуриархеальной ветви Archaea, а также в органеллах растений, имеющих эндосимбионтное происхождение — хлоропластов и некоторых митохондрий. Всего на данный момент выявлено 225 полноразмерных гомологов FtsZ среди бактерий, архей и эндосимбионтных органелл эукариот. Кроме того, известны FtsZ-подобные белки, сходные с FtsZ по структуре, но не способные связывать и гидролизовать ГТФ [57].

**Строение молекулы FtsZ.** Кристаллографический анализ структуры FtsZ был выполнен для белка из термофильной бактерии *Thermotoga maritima*, причем были выявлены четыре домена [32]. Сравнение извест-

ных аминокислотных последовательностей гомологов FtsZ позволило установить, что подобная четырехдоменная структура характерна для FtsZ большинства прокариот: переменный N-концевой сегмент, высококонсервативная коровая область, переменный спейсер и консервативный C-концевой пептид [57].

*N-концевой сегмент.* Для белков FtsZ характерно наличие на N-конце аминокислотной последовательности, которой нет у тубулинов. Исключениями являются лишь семь гомологов из семейства FtsZ3 архей. В N-концевой области FtsZ1 *Methanococcus jannaschii* формируются  $\alpha$ -спираль и петля, которые выдаются из ядра молекулы [32]. N-концевой сегмент не является консервативным ни по длине, ни по аминокислотной последовательности. Единственное предположение о вероятной функции N-концевого сегмента касается FtsZ плазмид и митохондрий, которые содержат в этой области сигнальный пептид, отвечающий за транслокацию белка внутрь органелл [46].

*Коровый домен.* Этот участок молекулы протяженностью примерно в 300 аминокислот содержит все остатки, требуемые для связывания и гидролиза ГТФ [16]. Начало домена распознают по наличию в молекуле FtsZ консервативного изолейцина (лишь 14 случаев замен среди 225 гомологов). Окончание области корового домена молекулы приходится на консервативную аминокислотную последовательность LVITG [57]. Третичная структура корового домена в белках FtsZ практически совпадает с двумя областями третичной структуры  $\alpha/\beta$ -тубулинов. Коровый домен молекулы FtsZ состоит из двух независимо сворачивающихся N-концевого и C-концевого сегментов, образующих субдомены Nt и Ct, соответственно [45]. Субдомен Nt содержит область, ответственную за связывание и гидролиз ГТФ, и способен присоединять нижнюю часть соседнего мономера в протофиламенте. Субдомен Ct связывает верхнюю часть соседнего мономера. Коровая область всех белков FtsZ содержит последовательность, гомологичную высококонсервативному мотиву тубулинов: для этого «тубулинового мотива» в белках FtsZ установлен консенсус GGGTGTG [16].

Обнаружено интересное с биохимической точки зрения свойство молекулы FtsZ: точечная мутация, следствием которой является замена первого глицина консенсуса GGGTGTG на серин в 105 позиции в белке FtsZ *E. coli*, приводит к тому, что мутантный белок вместо ГТФазной активности проявляет  $Mg^{2+}$ -зависимую АТФазную активность *in vitro* [48]. Белок FtsZ обладает структурным сходством с другими АТФазами: аденилат-

киназой, миозинами и F-АТФазы. При этом замена всего одной аминокислоты в характерном тубулиновом мотиве превращает FtsZ из ГТФазы в АТФазу.

Спейсер весьма вариабелен по длине (от 2 до 330 аминокислот). Так, у FtsZ1 *M. jannaschii* этот участок состоит из 16 аминокислот, формирующих два  $\beta$ -стренда, разделенных петлей из 9 аминокислот, не образующих упорядоченной структуры [32]. Показано, что спейсер не является необходимым для образования протофиламентов FtsZ. С-концевой пептид обнаружен лишь в 153 гомологах FtsZ из 225 исследованных. Этот участок молекулы также не нужен для полимеризации, но необходим для взаимодействия с двумя другими белками — FtsA и ZipA, которые, в свою очередь, реагируют с клеточной мембраной [36].

**Семейство белков FtsZ и FtsZ-подобные белки.** Так как гомологи FtsZ не были обнаружены у ряда прокариот с полностью секвенированными геномами, возникает вопрос: делятся ли эти организмы без участия FtsZ, либо в аминокислотной последовательности гомологов белка деления FtsZ в процессе эволюции произошли значительные изменения. В связи с этим, последовательности гомологов белка FtsZ, экстремально разошедшиеся в процессе эволюции, наиболее интересны со структурной и функциональной точек зрения. Среди них — FtsZ микоплазм *Mycoplasma pneumoniae* и *M. genitalium*, FtsZ2  $\gamma$ -протеобактерии *Colwellia psychrerythraea*, FtsZ плесневого гриба *Dictyostelium discoideum*, а также известные белки FtsZ3 архей типа *Euryarchaeota*. Все эти белки (за исключением FtsZ микоплазм) обнаружены у организмов, обладающих несколькими копиями ftsZ на геном, поэтому предполагается, что одна из копий кодирует белок FtsZ, участвующий в делении, а другая, образовавшаяся в результате дупликации, может кодировать FtsZ-подобные белки, выполняющие иные функции, не связанные с цитокинезом [57].

Среди FtsZ микроорганизмов, принадлежащих классу *Mollicutes* (микоплазмы), были выявлены два наиболее сильно дивергировавших гомолога белка FtsZ. Аминокислотные последовательности белков FtsZ *M. pneumoniae* и *M. genitalium* совпадают только на 53%, но с другими FtsZ микоплазм, включая FtsZ *M. pulmonis*, *M. penetrans* и *M. hominis*, сходство составляет лишь 17% и 21%, соответственно. Сравнительный анализ позволил выявить очень маленькое сходство аминокислотного состава FtsZ *M. pneumoniae* и *M. genitalium* с остальными гомологами FtsZ, начиная с области, расположенной сразу за характерным ГТФ-связывающим мотивом [1, 16].

Область С-конца корового домена слабо консервативна, что приводит к затруднениям при попытке разграничить четыре домена, описанные для большинства гомологов FtsZ. Гомологи FtsZ из разных организмов часто не способны замещать функцию собственного FtsZ в клетках *E. coli*, что может быть связано с различиями в структуре С-концевого пептида [36]. Однако на нескольких штаммах *E. coli*, трансформированных рекомбинантными плазмидами с геном ftsZ *M. hominis*, была продемонстрирована возможность экспрессии микоплазменного гена и показан эффект комплементации между собственным белком FtsZ *E. coli* и FtsZ *M. hominis*, экспрессируемым с рекомбинантной плазмиды [3, 42]. Таким образом, не смотря на значительные различия в аминокислотной последовательности, в функциональном смысле эти белки оказываются взаимозаменяемыми.

Помимо известных на сегодняшний день 225 гомологов FtsZ, выявлено еще 10 открытых рамок считывания, предполагаемые продукты которых обозначены как «FtsZ-подобные белки». Эти белки можно условно разделить на два типа. Для белков первого типа характерен низкий уровень подобия аминокислотных последовательностей белкам FtsZ. Белки второго типа весьма сходны по первичной структуре с большинством гомологов FtsZ, но при этом имеют замены в области корового домена. FtsZ-подобные белки не объединяют в отдельное семейство, но все они неспособны связывать и гидролизовать ГТФ [57].

Обнаружена открытая рамка считывания в составе плазмиды  $\rho$ XO1 *Bacillus anthracis*, отвечающей за вирулентность бацилл, несущая характерный тубулиновый мотив, но в целом белок, кодируемый этой рамкой, имеет лишь 17% сходство с хромосомным гомологом FtsZ. Предполагается, что этот белок важен для инфицирования бациллами организма-хозяина [44]. В геноме *Clostridium acetobutylicum* выявлены как полноценный гомолог белка FtsZ, так и FtsZ-подобный белок, обладающий лишь 14% сходством с функционально активной копией. Этот белок имеет характерный тубулиновый мотив, однако некоторые аминокислоты, отвечающие в белке FtsZ *E. coli* за связывание и гидролиз ГТФ, в FtsZ-подобном белке *C. acetobutylicum* отсутствуют. Одним из наиболее интересных можно назвать FtsZ-подобный белок *Magnetospirillum magnetotacticum*, имеющий неконсервативную замену аминокислоты D $\rightarrow$ N, эквивалентной D212 FtsZ *E. coli*. Несмотря на замену, FtsZ-подобный белок способен принимать участие в образовании гетерополимеров с исходными мономерами. Подобная замена аминокислоты имеет место в  $\beta$ -тубулине эукариот, по

сравнению с  $\alpha$ -тубулином. У анаэробного ветвящегося фототрофа *Chloroflexus aurantiacus* помимо полно-размерной копии гена *ftsZ* обнаружена *ftsZ*-подобная последовательность, потерявшая треть гена с N-конца. При этом в структуре белка *C. aurantiacus*, как и у белков архей, можно четко выделить характерный тубулиновый мотив. Два *FtsZ*-подобных белка *Methanopyrus kandleri*, помимо того, что обладают минимальным сходством с остальными белками *FtsZ*, еще и значительно короче всех известных гомологов *FtsZ* [57].

Все *FtsZ*-подобные белки, известные на сегодняшний день, утратили способность связывать и гидролизовать нуклеотиды. Некоторые *FtsZ*-подобные белки, по-видимому, являются формами *FtsZ*, претерпевшими в процессе эволюции значительные изменения в первичной структуре молекул, и вследствие этого могут выполнять в клетке другие функции, не связанные с клеточным делением. Одной из предполагаемых функций *FtsZ*-подобных белков в клетке может быть маркировка сайта деления. В этом случае сжатие осуществляют либо функционально активные гомологи *FtsZ*, либо существует иной способ передачи силы сжатия на мембрану бактериальной клетки, который не основывается на *FtsZ*. Например, у некоторых представителей *Mollicutes* в результате редуцированной эволюции, а также наличия в клетках микоплазм уникальных внутренних цитоскелетных структур, могли развиться механизмы клеточного деления, которые либо в меньшей степени зависят от *FtsZ*, либо вовсе обходятся без участия этого белка.

**Деление прокариот без *FtsZ*.** При полном прочтении геномов десяти видов бактерий, относящихся к типу *Chlamydiae*, гены, гомологичные *ftsZ*, обнаружить не удалось. Эти бактерии являются облигатными паразитами эпителиальных клеток. Существует вероятность того, что хламидии могут использовать для своего цитокинеза аппарат образования везикул хозяйской клетки, в том числе динамин в качестве ключевого белка деления [12].

Микроорганизм *Prostheco bacter de j ongeii*, в геноме которого *ftsZ* отсутствует, таксономически относят к слабоизученному типу *Verrucomicrobia*. Большинство представителей этого типа являются эктосимбионтами инфузорий. В клетке *P. de j ongeii* обнаружены тубулярные структуры, похожие на микротрубочки эукариот. Было показано, что белки, входящие в состав таких структур, взаимодействуют с антителами к тубулину инфузорий [28]. *P. de j ongeii* — свободноживущая бактерия, однако содержит два гена, *btuba* и *btubb*, продукты которых по аминокислотной последовательности ближе к эукариот-

ным тубулинам, чем к *FtsZ* прокариот. Уровень сходства аминокислотных последовательностей бактериальных тубулинов *VtubA* и *VtubB* с эукариотными  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулинами составляет 31–35% и 34–37%, соответственно. С представителями других семейств эукариотных тубулинов сходство первичных структур этих белковых молекул значительно меньше, а с прокариотными *FtsZ* у белков *VtubA* и *VtubB* — только 8–11% [28].

Первичные структуры бактериальных тубулинов *P. de j ongeii* заметно отличаются от аминокислотных последовательностей эукариотных тубулинов. Ничего не известно и по поводу функциональной значимости тубулинов *P. de j ongeii*, но недавно было показано, что они могут образовывать протофиламенты и способны связывать и гидролизовать нуклеотиды [53]. Авторы предполагают, что гены, кодирующие эти белки, были приобретены предковой формой *P. de j ongeii* путем горизонтального переноса. В пользу этой точки зрения служит то, что у других видов микроорганизмов типа *Verrucomicrobia* гены тубулиноподобных белков не обнаружены.

До сих пор не известно, как делятся прокариотные организмы *U. parvum*, *M. mobile*, а также археи, относящиеся к типу *Crenarchaeota*. При полном прочтении геномов у них не было обнаружено никаких генов, которые могли бы кодировать белки, гомологичные тубулинам эукариот, либо бактериальным тубулинам, белкам *FtsZ*, а также эукариотным динаминам.

**Формирование Z-кольца.** Очищенный белок *FtsZ*, так же, как и тубулины, обладает способностью к связыванию и гидролизу ГТФ. Связывание ГТФ обеспечивает образование протофиламентов, представляющих собой линейные полимеры *FtsZ*, где молекулы ключевого белка деления располагаются голова-к-хвосту. Кроме линейных полимеров *FtsZ*, *in vitro* образуется некоторое количество миникольц [19]. Известно, что  $\alpha/\beta$ -тубулин, кроме самих протофиламентов и миникольца, способен образовывать микротрубочки, состоящие из 13 протофиламентов. В отличие от тубулиновых, протофиламенты *FtsZ* не складываются в трубочки, но способны формировать листы, соединяясь друг с другом боковыми поверхностями [33].

При ГТФ-зависимой сборке протофиламентов *FtsZ in vitro* между двумя ассоциировавшими мономерами формируется активный сайт гидролиза ГТФ, наподобие такового в тубулиновых микротрубочках [52]. Однако циклы сборки-разборки протофиламентов, состоящих из димеров *FtsZ*, и протофиламентов, состоящих из гетеродимеров  $\alpha/\beta$ -тубулина, существенно различаются. Условием разборки протофиламентов *FtsZ*

является гидролиз связанного ГТФ. Было показано, что при истощении пула свободного ГТФ и гидролизе связанного ГТФ протофиламенты FtsZ распадаются. В цитоплазме клетки, которая богата ГТФ, протофиламенты FtsZ устойчивы, деполимеризации не происходит [50]. В отличие от протофиламентов FtsZ, микротрубочки эукариот состоят из субъединиц тубулина, связанных с ГДФ, и лишь концевые субъединицы (кэп) несут ГТФ. Гидролиз концевого ГТФ приводит к быстрой деполимеризации микротрубочек [15]. В процессе полимеризации FtsZ сборка протофиламентов является кооперативной, то есть аффинность субъединиц по отношению друг к другу возрастает при увеличении концентрации белковых молекул [49]. В начале процесса белок FtsZ образует димеры, которые, связывая ГТФ, собираются в протофиламенты. В эксперименте замена ГТФ на ГДФ также приводила к полимеризации FtsZ, однако в этом случае наблюдали образование изогнутых протофиламентов [34]. По достижении определенной длины концы протофиламента способны вступать в контакт друг с другом. Образующиеся при этом протофиламентные кольца, диаметром в несколько сотен нанометров, были выявлены при помощи электронной микроскопии [24]. В клетках штаммов дикого типа *E. coli* и *B. subtilis* недавно были обнаружены длинные спиральные протофиламенты FtsZ, названные Z-спиралями [8, 55]. В вегетативных клетках *B. subtilis*, как и в клетках *E. coli*, Z-спирали выявлены по всей поверхности клетки, они располагаются и над нуклеоидом. Предполагается, что Z-кольцо формируется в результате сборки этих спиралей в пучок посередине клетки [40].

После сборки, но перед тем, как начинается процесс сжатия, Z-кольцо представляется стабильным, то есть форма его остается неизменной. Однако было показано, что *in vivo* Z-кольцо высоко динамично на протяжении всего своего существования: субъединицы кольца быстро обмениваются со свободными субъединицами FtsZ. Это установлено при изучении динамики сборки Z-кольца у *B. subtilis* и *E. coli*. В состав кольца входит только около 30% суммарного FtsZ клетки. Таким образом, Z-кольцо представляет собой пучок или связку протофиламентов, которые находятся в состоянии постоянного обмена с пулом мономеров FtsZ, образующихся в цитоплазме. При этом высокий уровень оборота мономеров не связан с функциональной активностью кольца [6].

**Регуляция сборки Z-кольца.** Общее количество молекул FtsZ в клетке значительно превышает концентрацию, необходимую для формирования Z-кольца. Это указывает на существование ингибиторов, взаимодей-

ствующих с белком и препятствующих полимеризации FtsZ и сборке аппарата деления в произвольной области. Один из возможных способов пространственной регуляции формирования органеллы деления связан с состоянием нуклеоида. В бактериальной клетке есть только три области, где ДНК либо отсутствует совсем, либо присутствует в малых концентрациях. Одна из таких областей образуется к началу цитокинеза между сегрегированными хромосомами посередине клетки, другие две лежат на полюсах клетки. Предполагается, что область возможной сборки Z-кольца топологически ограничена. Недавно были выявлены белки, обладающие множественными сайтами связывания с хромосомной ДНК — SlmA (*E. coli*) и Noc (*B. subtilis*), которым приписывается функция таких топологических ограничителей [9, 60]. Эти белки, вероятно, не препятствуют полимеризации FtsZ, по крайней мере, у *B. subtilis*. Показано, что белок FtsZ *B. subtilis* способен полимеризоваться и образовывать протофиламенты, опоясывающие всю бактериальную клетку по спирали. Но при этом формирование Z-кольца во время деления происходит строго посередине клетки, между двумя разошедшимися хромосомами [40]. Хотя механизм «нуклеоидной преграды» до сих пор не ясен, весьма вероятно, что белки SlmA и Noc предотвращают реорганизацию длинных спиральных протофиламентов FtsZ в кольцевую структуру над нуклеоидом. Поэтому вероятность сборки Z-кольца посередине клетки, где концентрация ДНК оказывается наименьшей, после сегрегации хромосом увеличивается.

На полюсах клетки концентрация ДНК понижена. Поэтому полюса рассматривают как потенциальные сайты будущих делений. У *E. coli* имеется специальная система, блокирующая образование дивисомы на полюсах. Эта система ингибиторов включает белки MinC, MinD и MinE. Обозначение min было введено потому, что мутанты по данной системе дают начало миниклеткам, при этом на клеточных полюсах происходит нечто подобное почкованию [14]. Схема возможного действия этой системы подробно описана в обзорах [2, 20].

Область с пониженной концентрацией ДНК посередине клетки образуется только в конце цикла репликации ДНК, поэтому состояние нуклеоида может служить не только пространственным, но и временным сигналом для деления. Образование дивисомы происходит строго после сегрегации нуклеоида, когда точки начала репликации ДНК оказываются расположенными в районе полюсов клетки [54]. *In vitro* показано, что белок FtsZ *E. coli* взаимодействует с N-концевым участком белка сегрегации MukB, содержащим нуклеотид-связывающий

домен, в присутствии ГТФ. N-концевая область молекулы MukB напоминает по структуре динамин, тогда как роль C-конца не выяснена. Белок MukB образует димеры и взаимодействует с ДНК [31].

Известно еще несколько белков, влияющих на процессы полимеризации-деполимеризации FtsZ. Среди них — белок SOS-ответа SulA, взаимодействующий с FtsZ-ГТФ. Он блокирует образование кольца сжатия в области борозды деления до тех пор, пока не будут осуществлены репарация ДНК, дупликация хромосомы и нормальная сегрегация нуклеоидов. Белок ZipA, идентифицированный у многих микроорганизмов, включая *E. coli*, обеспечивает стабилизацию FtsZ-филаментов, сшивая их между собой. Белок-шаперон ClpX *B. subtilis* ингибирует формирование Z-кольца. Возможные функции названных белков и других белков-регуляторов сборки Z-кольца, обсуждаются в недавно опубликованном обзоре [37].

**Дивисома *E. coli*.** С Z-кольцом у *E. coli* оказываются так или иначе связанными не менее десятка белков, которые участвуют в цитокинезе (рис.1). Их вовлечение в процесс происходит последовательно, начиная с ZipA и FtsA, которые требуются для дальнейшей ассоциации всех остальных белков деления. Белки ZipA и FtsA нужны для закрепления FtsZ на мембране, причем основная роль АТФ-связывающего белка FtsA, вероятно, состоит в стабилизации Z-кольца. FtsA способен образовывать димеры, сшивая протофиламенты FtsZ между собой. Наличие FtsA не существенно для формирования полноценного кольца деления, но в отсутствие этого белка Z-кольцо не обладает способностью к сжатию [21, 36].

Белки ZipA и FtsA могут взаимодействовать с одной и той же областью молекулы FtsZ. При помощи своей N-концевой последовательности ZipA закрепляется на мембране. C-концевой участок ZipA взаимодействует с C-концевым консервативным доменом FtsZ, обеспечивая жесткое закрепление Z-кольца на мембране и передачу ей в процессе деления клетки силы сжатия [36].

Несмотря на интенсивные исследования компонентов цитокинетического аппарата, биохимические функции хорошо изучены только для двух белков. Первый из них — FtsZ, обнаруженный не только у прокариот, но также принимающий участие в процессе деления многих эукариотных органелл [46]. Второй — FtsI, называемый также РВРЗ (penicillin-binding protein) из-за его способности специфически связывать пенициллин. FtsI необходим для синтеза материала клеточной стенки на вновь образующихся полюсах у бактерий с пептидогли-

кановой оболочкой. FtsI обладает трансгликозилазной и транспептидазной активностью. У грамотрицательных бактерий в процессе деления клетки этот белок действует в составе мультипротеинового пептидогликан-синтезирующего комплекса [27].

Остальные белки дивисомы, обозначенные на рисунке 1, также вовлечены в «мозаику» белок-белковых взаимодействий. Они, вероятно, обеспечивают координацию процессов синтеза компонентов септы с процессами инвагинации клеточной стенки и цитоплазматической мембраны.

**Сжатие Z-кольца.** При том, что необходимость FtsZ для процесса цитокинеза установлена, не ясно, служит Z-кольцо непосредственно для активного механического сжатия мембраны, или роль его более пассивна, например, состоит в «привлечении» ферментов, синтезирующих компоненты клеточной стенки. Не исключено, что Z-кольцо играет обе эти роли. Недавние данные указывают на то, что значительная часть белка FtsZ не связана с кольцом, и что этот белок может иметь и другие функции, не связанные с цитокинезом, например, участвовать в поддержании формы клетки. У *E. coli* синхронная инактивация белков FtsZ и FtsI (РВР5) приводит к ветвлению клеток или к спиральному росту на полюсах [56]. Возможно, что отдельные спиральные протофиламенты FtsZ, не образующие замкнутого кольца, определенным образом взаимодействуют с клеточной стенкой, обуславливая подобное изменение формы клетки.

Предложено несколько моделей сжатия Z-кольца. Две из них подробно описаны в обзоре 1997 года [13]. Первая модель основывалась на скольжении протофиламентов FtsZ относительно друг друга с помощью некоего моторного белка, наподобие миозина. Она в последние годы не обсуждается. По второй модели, предполагается постепенная деполимеризация Z-кольца, которое жестко закреплено на мембране при помощи других, вспомогательных белков, что приводит к его сжатию и передаче механической силы на мембрану. Возможные детали этой модели сжатия обсуждает еще одна группа авторов в связи с новыми наблюдениями [55]. Сжатие Z-кольца сопровождается потерей димеров FtsZ, отдельных протофиламентов и их частей. В процессе деления клетки от сужающегося кольца отделяются индивидуальные протофиламенты FtsZ, имеющие изогнутую, иногда спиралевидную форму. Эти структуры остаются в дочерних клетках на цитоплазматической мембране и после завершения процесса, когда Z-кольца больше нет. Согласно третьей модели, сжатие осуществляется

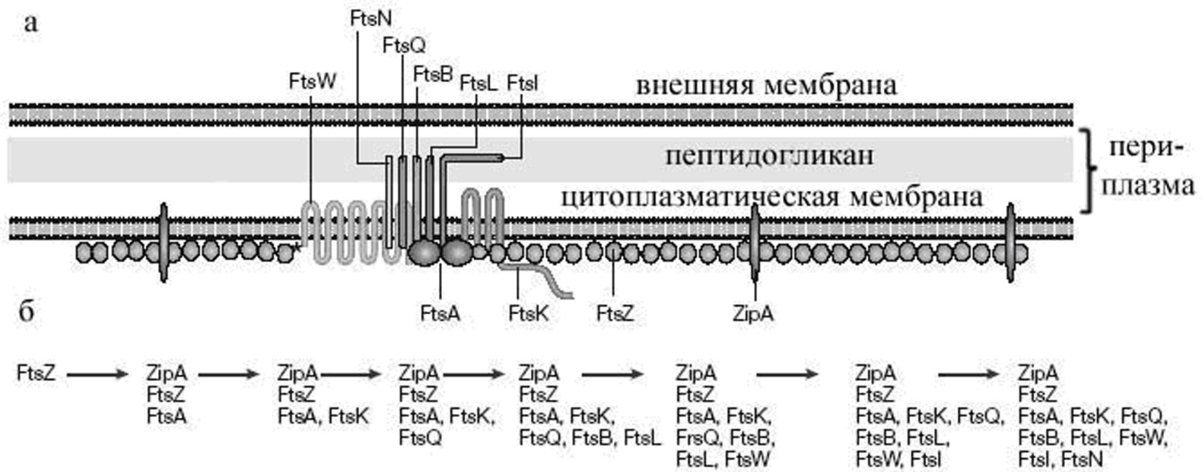


Рис. 1. Дивисома *E. coli* (по: Margolin, 2005, модифицировано). а — схема аппарата деления клетки — срез через мембрану поперек кольца сжатия, примерное взаиморасположение основных белков; б — порядок сборки дивисомы.

FtsZ — ключевой белок деления, образующий протофиламенты. Пучок латерально связанных протофиламентов составляет основу Z-кольца. Белок ZipA требуется для закрепления FtsZ на мембране. FtsA — АТФ-связывающий белок, способный к образованию димеров; он участвует в стабилизации Z-кольца и взаимодействует с FtsI. FtsK — белок большого размера, на его N-конце расположены четыре трансмембранных домена, С-концевой домен обеспечивает АТФ-зависимую транслокацию белка вдоль хромосомы, большой цитоплазматический домен участвует в сегрегации хромосом. Белки FtsQ, FtsN, FtsL и FtsI состоят из двух доменов: трансмембранного и периплазматического. FtsB входит в состав дивисомы в комплексе с трансмембранными белками FtsN, FtsL и FtsQ. FtsL — трансмембранный белок малого размера, образует димеры. Молекула белка FtsW содержит 10 трансмембранных участков. Его предполагаемая функция — транслокация предшественников пептидогликанового синтеза, связанных с липидами. FtsI (РВР3) — пенициллин-связывающий белок, необходимый для синтеза материала клеточной стенки на вновь образующихся полюсах. Молекула FtsN содержит N-концевой трансмембранный сегмент, направляющий транслокацию большого С-концевого домена на периплазматическую сторону мембраны; вероятно, он участвует в гидролизе клеточной стенки при инициации цитокинеза. Белки дивисомы *E. coli* подробно описываются в обзорах [20, 37].

благодаря изменению кривизны пучка протофиламентов FtsZ вследствие конформационных переходов, которые происходят при гидролизе ГТФ до ГДФ, либо при высвобождении неорганического фосфата [34]. Наряду с названными моделями обсуждается альтернативная возможность — пассивное сжатие Z-кольца, при том что активную роль в инвагинации стенки септы играют процессы ее синтеза, которые обеспечиваются транспептидазой FtsI и несколькими другими белками [37]. В этом случае FtsZ следует рассматривать не в качестве ключевого белка деления, а лишь маркерного белка, определяющего борозду деления клетки и «вовлекающего» остальные белки деления в процесс цитокинеза. Однако наличие белка FtsZ у большинства микоплазм, организмов, у которых клеточная стенка отсутствует и не найдены многие другие белки деления, включая FtsI,

может служить аргументом в пользу представления о первичной, активной роли FtsZ в делении прокариот.

### Деление эндосимбионтных органелл

В настоящее время общепринятой является гипотеза о происхождении митохондрий и пластид в результате эндосимбиоза. Предполагается, что эти органеллы являются потомками прокариот, живших свободно [38]. Пластиды и митохондрии имеют собственный нуклеоид, рибосомы, и не синтезируются *de novo*. Постоянство присутствия митохондрий и пластид в эукариотных клетках обеспечивается их делением и последующим распределением по дочерним клеткам во время цитокинеза. Считается, что общий предок пластид водорослей и высших растений был представителем цианобактерий.



Митохондрии, вероятно, произошли от  $\alpha$ -протеобактерий [25].

Некоторая часть генетической информации, изначально присущей эндосимбионтам, в результате горизонтального переноса оказалась в составе ядерного генома растительной клетки. Гены белков, обеспечивающих эти функции, приобрели последовательности, кодирующие так называемые транзитные пептиды, благодаря которым продукты этих генов, синтезируемые в цитоплазме растительной клетки, могут попадать в хлоропласт. В частности, гомолог белка FtsZ кодируется в ядерном геноме *Arabidopsis thaliana*, синтезируется в цитоплазме растительной клетки и затем переносится внутрь хлоропласта [46].

В процессе деления хлоропластов и митохондрий примитивных водорослей используются разные гомологи FtsZ. Деление митохондрий этих водорослей направляется белками FtsZ, близкими  $\alpha$ -протеобактериальным гомологам, тогда как в делении хлоропластов принимают участие белки FtsZ, родственные цианобактериальным FtsZ [47].

**Деление пластид.** Наличие пластид — одна из главных особенностей, отличающая клетки растений от других эукариотных клеток. От пластид зависит жизнеспособность растения, они обеспечивают фотосинтетическую ассимиляцию углерода, синтез липидов и аминокислот. Хлоропласты — наиболее исследованный тип пластид.

Деление хлоропластов, очевидно, является не менее сложным процессом, чем цитокинез бактерий, так как существует необходимость скоординированной инвагинации и последующего слияния нескольких мембран. Белковый аппарат деления хлоропластов, в отличие от такового бактерий, можно рассмотреть на электронных микрофотографиях тонких срезов: он состоит, как минимум, из трех слоев. Внутреннее кольцо состоит из протофиламентов белка FtsZ и располагается в процессе деления на стромальной (внутренней) стороне внутренней мембраны органеллы. При негативном контрастировании становится различимым PD-кольцо (plastid-dividing), белковый состав которого до сих пор не определен [41]. Внешнее кольцо, состоящее из динамин-подобного белка, относящегося к группе белков DRP (dynamin-related proteins), обнаруживается на цитозольной стороне внешней мембраны [22]. Взаимное расположение этих колец схематически представлено на рисунке 2.

Известно, что гены, кодирующие FtsZ, присутствуют в ядерных геномах зеленых растений, и большинство из них оказываются сходными с цианобактериаль-

ными гомологами. В первом полностью секвенированном ядерном геноме зеленого растения (*A.thaliana*) выявлены три гомолога ftsZ. Продукты этих генов принимают участие в делении пластид и близки по структуре цианобактериальным FtsZ [59].

Белки FtsZ пластид высших растений сгруппированы в два семейства, FtsZ1 и FtsZ2. Одно из главных отличий между растительными FtsZ1 и FtsZ2 — отсутствие у первых консервативного C-концевого мотива [47]. Чаще всего в одном и том же организме встречаются представители обоих семейств. Однако число ортологов может различаться между организмами. Так, *A. thaliana* имеет один ортолог FtsZ1 и два ортолога FtsZ2, тогда как *Nicotiana tabacum* имеет три ортолога FtsZ1, и только один FtsZ2 [57]. Подавление экспрессии генов ftsZ влияет на деление и морфологию пластид, приводя к образованию одного или нескольких гигантских хлоропластов, тогда как в нормальном состоянии в клетке содержится до 120 хлоропластов небольшого размера [47].

Все гомологи FtsZ растений с известными аминокислотными последовательностями синтезируются в цитоплазме в виде предшественников, а затем попадают в хлоропласт, благодаря наличию так называемого транзитного пептида. При помощи иммунофлюоресцентной микроскопии удалось выявить, что белки FtsZ1 и FtsZ2 образуют кольца по центру пластиды. В экспериментах с мечеными экспрессируемыми последовательностями показано, что оба семейства генов ftsZ представлены у двудольных растений так же хорошо, как и у однодольных. Белки FtsZ1 и FtsZ2, вероятно, существенны для деления пластид всех представителей покрытосеменных [46, 59]. Кроме того, гены, гомологичные ftsZ, обнаружены в ядерных геномах более примитивных фотосинтезирующих эукариот, включая водоросли *Cyanidium caldarium* и *Cyanidioshyzon merolae*, *Mallomonas splendens* и *Guillardia theta*. Геном мха *Physcomitrella patens* содержит два гена FtsZ, один из которых необходим для деления пластид [46].

Белки FtsZ пластид, вероятно, способны образовывать цитоскелетоподобные структуры в виде разветвленных пространственных сетей [29]. У мха *Physcomitrella patens* молекулы FtsZ могут быть локализованы в виде колец как в борозде деления хлоропластов (при наличии сигнального пептида на N-конце белка), так и на мембране эукариотной клетки в области борозды деления (если сигнальный пептид отщепляется сразу после того, как белок синтезирован). Это указывает на возможную роль FtsZ в делении эукариотной клетки мха.

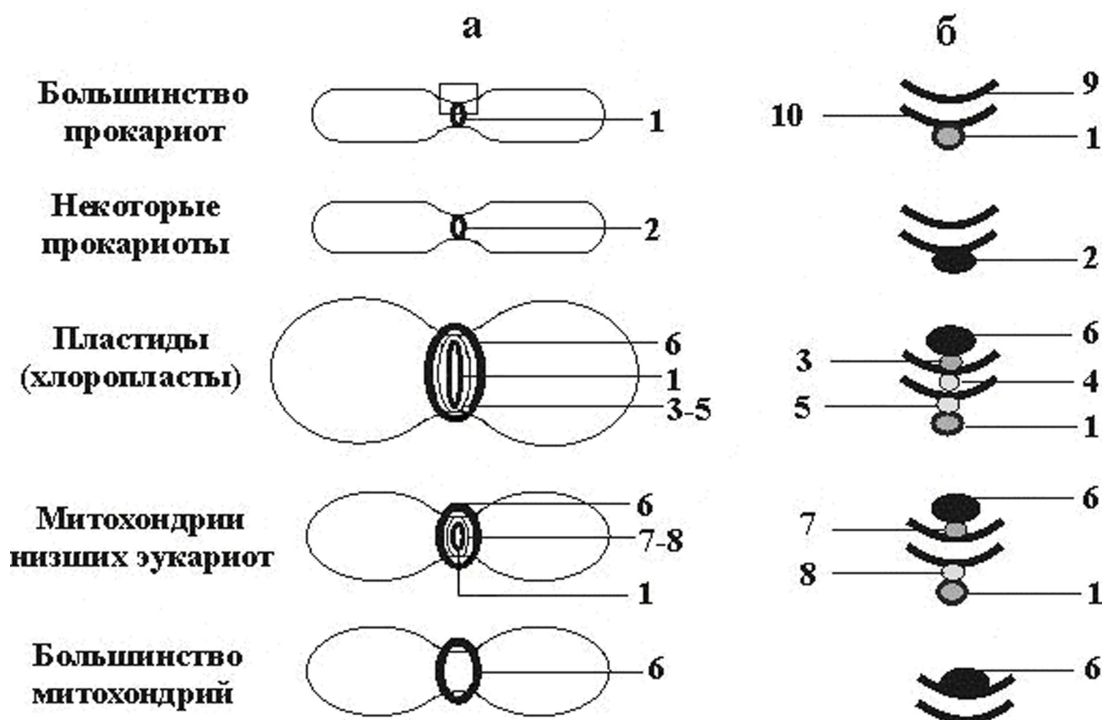


Рис. 2. Кольца сжатия прокариот и эндосимбионтных органелл. а – Схема взаимного расположения колец. б – «Срез» через мембрану поперек колец. Область среза обозначена прямоугольником на рис. 2а.

1 – Z-кольцо (белок FtsZ); 2 – кольцо из белка, выполняющего функцию FtsZ; 3 – внешнее PD-кольцо (plastid-dividing); 4 – срединное PD-кольцо (встречается в пластидах только некоторых эукариот); 5 – внутреннее PD-кольцо; 6 – кольцо из динаминоподобного белка; 7 – внешнее MD-кольцо (mitochondrial-dividing); 8 – внутреннее MD-кольцо; 9 – внешняя, цитозольная мембрана; 10 – цитоплазматическая, стромальная мембрана.

В пластидах одноклеточных водорослей и зеленых растений, помимо Z-кольца, обнаружены два дополнительных кольца деления – стромальное и цитозольное. Такие структуры получили название внутреннего и внешнего PD-колец (plastid-dividing), соответственно. В хлоропласте красной водоросли *S. merolae*, кроме того, выявлено срединное PD-кольцо в межмембранном пространстве [41]. PD-кольца становятся различимыми в период инвагинации «мембранного конверта» по центру хлоропласта, имеющего к этому моменту форму гантели (рис. 2). Внешнее кольцо собирается на наружной мембране, когда внутреннее уже собрано. Кроме Z- и PD-колец, процесс цитокинеза пластид зависит от функционирования дополнительного, внешнего кольца деления, состоящего из филаментов, образованных динамин-подобными белками, которые также как FtsZ являются ГТФазами [22]. В эукариотной клетке динамины выполняют множество сходных между собой функций: рецептор-опосредованный эндоцитоз, везикулярный транспорт, деление митохондрий. Кроме того, в некоторых случаях эти белки участвуют в цитокинезе

самых растительных и животных клеток. Динаминоподобные белки эукариот не имеют структурной гомологии с бактериальными белками FtsZ, и у прокариот гомологи динамина вообще не найдены [43].

Недавно было показано, что для процесса деления хлоропластов *A. thaliana* необходим динаминоподобный белок ARC5. При повреждении гена, кодирующего этот белок, происходила задержка деления хлоропластов. ARC5 локализуется в кольце, посередине хлоропласта, на цитозольной стороне внешней мембраны. Обнаружен высокий уровень гомологии между ARC5 и другими динаминоподобными белками растений и зеленых водорослей [22].

В целом, аппарат деления пластид формируется в следующем порядке: (1) Z-кольцо, (2) внутреннее, (3) срединное (если оно есть) и (4) внешнее PD-кольца, (5) кольцо из динамин-подобного белка. Таким образом, в делящемся хлоропласте может быть до 5 колец (рис.2). В процессе цитокинеза первым исчезает Z-кольцо, затем диссоциируют внутреннее и срединное PD-кольца; внешнее PD-кольцо и филаменты динаминоподобного

белка сохраняются в цитоплазме клетки и разрушаются только по завершении процесса деления органеллы. Деление хлоропластов обеспечивается сложным набором белков, образующих комплексы, расположенные по обе стороны мембраны. Можно сказать, что аппарат деления хлоропластов — это эволюционный гибрид, совмещающий структурные особенности процесса цитокинеза прокариот (кольцо из белка FtsZ) и эукариот (РD-кольца и динамины).

**Деление митохондрий.** Аппарат деления митохондрий примитивных эукариот сходен с таковым хлоропластов и состоит из внутреннего FtsZ-кольца, внешнего DRP-кольца, и MD-колец, располагающихся между ними. Эти четыре кольца митохондрий низших эукариот схематически показаны на рисунке 2. Кольца действуют на разных фазах деления митохондрии. Кодированный в ядерном геноме белок FtsZ гомологичен бактериальному. Этот белок сохранился в митохондриях некоторых примитивных эукариот, и его можно рассматривать, как потерянное звено в эволюции механизма митохондриального деления. Ядерные гены *ftsZ*, родственные  $\alpha$ -протеобактериальным, были идентифицированы у одноклеточных водорослей *C. merolae* [43] и *M. splendens* [7].

Рассмотрим процесс деления митохондрии на примере *C. merolae*. В первой фазе MD-кольцо опоясывает органеллу посередине и сначала не сжимается; во второй фазе MD-кольцо начинает сжиматься; в третьей фазе MD-кольцо становится значительно шире, после чего митохондрия делится. Z-кольцо появляется рано, в первой фазе митохондриального деления. Кольцо из динаминоподобного белка функционирует на поздних стадиях деления. Этот белок находится в цитоплазме во время второй фазы митохондриального деления до тех пор, пока митохондрия не приобретет гантелеобразную форму. В финальной фазе деления динаминоподобный белок аккумулируется на кольце, в области борозды деления. Таким образом, у *C. merolae* FtsZ и динамин действуют на разных стадиях деления митохондрии. Возможно, что в данном случае процесс деления обеспечивают либо оба белка одновременно, либо FtsZ выполняет какую-либо иную роль. Японские авторы предполагают, что FtsZ-кольцо служит для маркировки сайта деления, а MD- и динаминовое кольца — для сжатия митохондрии и финального раздвоения, соответственно [43].

В делении митохондрий *D. discoideum* также участвует белок FtsZ. Оба его гомолога — FszA и FszB — эволюционно родственны белкам FtsZ  $\alpha$ -протеобак-

терий, которые считаются предками митохондрий. Показано, что обе формы FtsZ существенны для процесса деления. Однако молекулы FszA формируют подобие пояса и концентрируются в области борозды деления, тогда как FszB локализуется на полюсах органеллы. Такая локализация отличается от локализации пластидных гомологов FtsZ и может быть указанием на то, что FszA и FszB выполняют в процессе деления митохондрий разные функции [23].

Деление митохондрий большинства грибов, животных и растений происходит без участия FtsZ. У дрожжей (*S. cerevisiae*) и плоского червя (*C. elegans*) деление митохондрий осуществляется при помощи динаминоподобных белков Drp1 и Dnm1, соответственно. In vitro эти белки могут формировать кольца и спирали, похожие на те, что образуют FtsZ и тубулины. In vivo было показано, что белки Drp-1 и Dnm1p образуют кольца или «воротнички» на цитозольной стороне внешней мембраны [11, 30]. Предковая митохондрия делилась, вероятно, при участии FtsZ  $\alpha$ -протеобактериального типа, а также других компонентов бактериального клеточного деления. Предполагается, у высших эукариот FtsZ был замещен динамином [18], но нельзя исключить, что динаминовые кольца в процессе эволюции цитокинетического аппарата стали играть роль вспомогательного механизма, не заменяющего функцию FtsZ [39]. Эти авторы предполагают, что влияние динаминовых колец на процесс деления органелл могло стать существенным в результате утери эндосимбионтными органеллами пептидогликановой клеточной оболочки, которая, вырастая, способствовала разделению клетки.

На вопрос о том, где на филогенетическом древе расположена точка потери митохондриальной формы FtsZ, и когда предположительно произошло приобретение динаминоподобными белками функции обеспечения митохондриального деления, пока нет ответа. Считается, что красные водоросли имели общего предка с зелеными растениями, а линия животных и грибов развивалась отдельно. Образование динаминоподобных белков могло произойти у общего предка животных, грибов и растений. Это предположение основывается на высокой степени сходства между различными представителями динаминоподобных белков — Dnm1, Drp1 и ADL2b. Потеря митохондриального FtsZ могла произойти не у общего предка животных, грибов и растений, а позже, так как некоторые красные водоросли содержат в своем геноме *ftsZ*. Гомолог FtsZ, принимавший участие в делении митохондрий, мог быть утрачен независимо как в линии

животных и грибов, так и в линии высших зеленых растений, вероятно, после их расхождения с *Rhodophyta* [5].

### Заключение

1. Деление бактериальной клетки начинается с образования так называемой дивисомы, основу которой составляет кольцо сжатия, или Z-кольцо, опоясывающее клетку примерно посередине. Z-кольцо представляет собой пучок латерально связанных протофиламентов, образующихся в результате полимеризации белка FtsZ. Z-кольцо жестко связано с мембраной при участии FtsA, ZipA, FtsW и многих других «вспомогательных» белков деления, входящих в состав дивисомы [37]. Белки дивисомы и их приблизительное взаиморасположение представлены на рисунке 1. Полный состав макромолекул, из которых формируется Z-кольцо, пока не известен.

2. Сборка Z-кольца начинается только после расхождения дочерних нуклеоидов. В эволюционном плане фибриллы Z-кольца считают предшественниками микротрубочек эукариот [19]. Сжатие кольца сопровождается постепенной деполимеризацией протофиламентов и приводит к разделению двух дочерних клеток. По окончании деления Z-кольцо как морфологическое образование исчезает. До начала процесса сжатия Z-кольцо представляется стабильным. Однако только треть суммарного FtsZ клетки входит в состав протофиламентов кольца, которые находятся в состоянии постоянного обмена с пулом мономеров и олигомеров FtsZ, образующихся в цитоплазме. Другие две трети молекул FtsZ, находящиеся вне кольца также частично в форме протофиламентов, распределены по клетке не случайным образом, но быстро и волнообразно перемещаются от полюса к полюсу, огибая клетку по спиральному маршруту. Предполагается, что помимо установленной ранее роли в цитокинезе, протофиламенты FtsZ участвуют в становлении и поддержании формы бактериальной клетки [55, 56].

3. Подобно тубулинам эукариот, белки FtsZ большинства прокариот весьма сходны между собой. По первичной структуре семейство прокариотных FtsZ значительно отличается от эукариотных тубулинов, за исключением области сайта связывания ГТФ, по которой они в высокой степени гомологичны. По данным рентгеноструктурного анализа имеется значительное сходство третичных структур мономеров FtsZ и мономеров  $\alpha/\beta$ -тубулина, несмотря на сравнительно слабую гомологию первичных последовательностей [32]. Биохимические свойства FtsZ тоже напоминают тубулин, включая способность полимеризоваться с образованием

протофиламентов, связывать и гидролизовать ГТФ. Однако в отличие от тубулинов, белки FtsZ не образуют микротрубочек.

4. К настоящему времени прочтены более 220 генов, кодирующих гомологи FtsZ. Кроме того, в геномах прокариотных и эукариотных организмов выявлены еще 10 рамок, предполагаемые продукты которых были обозначены как FtsZ-подобные белки [57]. Многие из этих белков должны быть близки основному семейству FtsZ по первичной структуре, но не способны гидролизовать ГТФ, так как несут мутации, связанные с заменами аминокислотных остатков в областях, которые важны для проявления этой функции. В процессе эволюции такие «испорченные» копии могли приобрести другие функции.

5. Деление хлоропластов и митохондрий, очевидно, является не менее сложным процессом, чем цитокинез бактерий, так как существует необходимость скоординированной инвагинации и последующего слияния нескольких мембран. В процессе деления митохондрий и хлоропластов примитивных водорослей используются разные гомологи FtsZ. Деление митохондрий этих водорослей направляется белками FtsZ, близкими  $\alpha$ -протеобактериальным гомологам, тогда как в делении хлоропластов принимают участие белки FtsZ, родственные цианобактериальным FtsZ [46].

6. Аппарат деления пластид (хлоропластов) высших растений обеспечивается сложным набором белков, образующих комплексы, располагающиеся по разные стороны мембран, и формируется в следующем порядке: (1) Z-кольцо, (2) внутреннее, (3) срединное (если оно есть) и (4) внешнее PD-кольца, (5) кольцо из динаминоподобного белка (рис. 2). Такой аппарат деления можно представить себе как своеобразный гибрид, совмещающий структурные особенности прокариот (кольцо из белка FtsZ) и эукариот (кольца-PD и динаминовые).

7. Деление митохондрий большинства грибов, животных и растений происходит без участия FtsZ. Роль белков деления, формирующих кольцо, выполняют динаминоподобные белки. Белки этого семейства также являются ГТФазами и способны к образованию протофиламентов, но они не найдены у прокариот и не имеют структурной гомологии с бактериальным FtsZ [43].

8. У ряда прокариотных организмов, геном которых к настоящему времени полностью секвенирован, вообще не обнаружены гены белков деления — ни FtsZ-подобных, ни динаминоподобных, ни тубулиноподобных, ни подобных специфическим белкам деления пластид или митохондрий. Среди таких организмов 2 вида

микоплазм (*Ureaplasma parvum* и *Mycoplasma mobile*, *mun Firmicutes*), 10 видов хламидий (тип *Chlamydiae*) и 5 видов архей (тип *Crenarchaeota*). Можно предположить, что в процессе эволюции эти микроорганизмы выработали какие-то особенные механизмы деления, природу которых пока не удается представить, либо белками деления в названных случаях все-таки является нечто подобное уже известным белкам, выполняющим сходную функцию.

9. Функция белковой молекулы в значительной мере определяется ее пространственной структурой. Поэтому для выяснения функции белка, кодируемого новопрочтенной открытой рамкой считывания, важен сравнительный анализ не только первичных аминокислотных последовательностей, но, главным образом, анализ возможных вторичных (третичных) структур. Новый метод анализа полипептидных цепей на основе дублетного кода [4, 51] при компьютерном выравнивании аминокислотных последовательностей может оказаться полезным для выявления сходства участков вторичной структуры возможных функциональных гомологов.

## Литература

1. Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вонский М.С. Микоплазмы. — СПб.: Наука, 2002. — 319 с.
2. Кукекова А.В., Борхсениус С.Н. Гены и белки деления бактериальных клеток // Цитология. — 2000. — Т. 42. — С. 519–529.
3. Момыналиев К.Т., Смирнова О.В., Лазарев В.Н., Акопьян Т.А., Челышева В.В., Говорун В.М., Айала Х.А., Симанкова А.Н., Борхсениус С.Н. Клонирование и экспрессия гена, кодирующего белок деления микоплазмы (*ftsZ*, *Mycoplasma hominis*) // Генетика. — 2003. — Т. 39. — С. 318–325.
4. Шестопалов Б.В. Предсказание вторичной структуры белка по методу дублетного кода // Мол. биол. — 1990. — Т. 24. — № 4. — С. 1117–1125.
5. Arimura S-i, Tsutsumi N. A dynamin-like protein (ADL2b), rather than FtsZ, is involved in Arabidopsis mitochondrial division // PNAS. — 2002. — Vol. 99. — P. 5727–5731.
6. Anderson D.E., Gueiros-Filho F.J., Erickson H.P. Assembly dynamics of FtsZ rings in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* and effects of FtsZ-regulating proteins // J. Bacteriol. — 2004. — Vol. 186. — P. 5775–5781.
7. Beech P.L., Nheu T., Schultz T., Herbert S., Lithgow T., Gilson P.R., McFadden G.I. Mitochondrial FtsZ in a chromophyte alga // Science. — 2000. — Vol. 287. — P. 1276–1279.
8. Ben-Yehuda S., Losick R. Asymmetric cell division in *B. subtilis* involves a spiral-like intermediate of the cytokinetic protein FtsZ // Cell. — 2002. — Vol. 109. — P. 257–266.
9. Bernardt T.G., de Boer P.A.J. SlmA, a nucleoid associated, FtsZ-binding protein required for blocking septal ring assembly over chromosomes in *E. coli* // Mol. Cell. — 2005. — Vol. 18. — P. 555–564.
10. Bi E., Lutkenhaus J. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli* // Nature. — 1991. — Vol. 354. — P. 161–164.
11. Bleazard W., McCaffery J.M., King E.J., Bale S., Mozdy A., Tieu K., Nunnari J., Shaw J.M. The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast // Nat. Cell Biol. — 1999. — Vol. 1. — P. 298–304.
12. Boleti H., Benmerah A., Ojcius D.M., Cerf-Bensussan N., Dautry-Varsat A. Chlamydia infection of epithelial cells expressing dynamin and Eps15 mutants: clathrin-independent entry into cells and dynamin-dependent productive growth // J. Cell Sci. — 1999. — Vol. 112. — P. 1487–1496.
13. Bramhill D. Bacterial cell division // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. — 1997. — Vol. 13. — P. 395–424.
14. de Boer P.A.J., Crossley R., Rothfield L. The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase // Nature. — 1992. — Vol. 359. — P. 254–256.
15. Desai A., Mitchison T.J. Microtubule polymerization dynamics // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. — 1997. — Vol. 13. — P. 83–117.
16. Erickson H.P. FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin? // Cell. — 1995. — Vol. 80. — P. 367–370.
17. Erickson H.P. Atomic structures of tubulin and FtsZ // Trends Cell Biol. — 1998. — Vol. 8. — P. 133–137.
18. Erickson H.P. Dynamin and FtsZ: missing links in mitochondrial and bacterial division // J. Cell Biol. — 2000. — Vol. 148. — P. 1103–1105.
19. Erickson H.P., Stoffler D. Protofilaments and rings, two conformations of the tubulin family conserved from bacterial FtsZ to  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  tubulin // J. Cell Biol. — 1996. — Vol. 135. — P. 5–8.
20. Errington J., Daniel R.A., Scheffers D.-J. Cytokinesis in bacteria // MMBR. — 2003. — Vol. 67. — P. 52–65.
21. Feucht A., Lucet I., Yudkin M.D., Errington J. Cytological and biochemical characterization of the FtsA cell division protein of *Bacillus subtilis* // Mol. Microbiol. — 2001. — Vol. 40. — P. 115–125.
22. Gao H., Kadirjan-Kalbach D., Froelich J.E., Osteryoung K.W. ARC5, a cytosolic dynamin-like protein from plants, is part of the chloroplast division machinery // PNAS. — 2003. — Vol. 100. — P. 4328–4333.
23. Gilson P., Yu X.-C., Hereld D., Barth C., Savage A., Kiefel B.R., Lay S., Fisher P.R., Margolin W., and Beech P.L. Two Dictyostelium orthologs of the prokaryotic cell division protein FtsZ localize to mitochondria and are required for

- the maintenance of normal mitochondrial morphology // *Eukaryotic Cell*. — 2003. — Vol. 2 — P. 1315–1326.
24. Gonzalez J.M., Velez M., Jimenez M., Alfonso G., Schuck P., Mingorance J., Vicente M., Minton A.P., Rivas G. Cooperative behavior of *Escherichia coli* cell-division protein FtsZ assembly involves the preferential cyclization of long single-stranded fibrils // *PNAS*. — 2005. — Vol. 102. — P. 1895–1900.
  25. Gray M.W. Evolution of organellar genomes // *Curr. Opin. Genet. Dev.* — 1999. — Vol. 9. — P. 678–687.
  26. Hirota Y., Ryter A., Jacob F. Thermosensitive mutants of *E. coli* affected in the process of DNA synthesis and cell division // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* — 1968. — Vol. 33. — P. 677–694.
  27. Holtje J.V. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 1998. — Vol. 62. — P. 181–203.
  28. Jenkins C., Samudrala R., Anderson L., Hedlund B.P., Petroni G., Michailova N., Pinel N., Overbeek R., Rosati G., Staley J.T. Genes for the cytoskeletal protein tubulin in the bacterial genus *Prostheco bacter* // *PNAS*. — 2002. — Vol. 99. — P. 17049–17054.
  29. Kiessling J., Martin A., Gremillon L., Rensing S.A., Nick P., Sarnighausen E., Decker E.L., Reski R. Dual targeting of plastid division protein FtsZ to chloroplasts and the cytoplasm // *EMBO reports*. — 2004. — Vol. 5. — P. 889–894.
  30. Labrousse A.M., Zappaterra M.D., Rube D.A., van der Blik A.M. *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane // *Mol. Cell* — 1999. — Vol. 4. — P. 815–826.
  31. Lockhart A., Kendrick-Jones J. Interaction of the N-terminal domain of MukB with the bacterial tubulin homologue FtsZ // *FEBS Lett.* — 1998. — Vol. 430. — P. 278–282.
  32. Loewe J., Amos L.A. Crystal structure of the bacterial cell division protein FtsZ // *Nature*. — 1998. — Vol. 391. — P. 203–206.
  33. Loewe J., Amos L.A. Tubulin-like protofilaments in Ca<sup>2+</sup>-induced FtsZ sheets // *EMBO J.* — 1999. — Vol. 18. — P. 2364–2371.
  34. Lu C., Reedy M., Erickson H.P. Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis // *J. Bacteriol.* — 2000. — Vol. 182. — P. 164–170.
  35. Lutkenhaus J.F., Wolf-Watz H., Donachie W.D. Organization of genes in the *ftsA-envA* region of the *Escherichia coli* genetic map and identification of a new *fts* locus (*ftsZ*) // *J. Bacteriol.* — 1980. — Vol. 142. — P. 615–620.
  36. Ma X., Margolin W. Genetic and functional analyses of the conserved C-terminal core domain of *Escherichia coli* FtsZ // *J. Bacteriol.* — 1999. — Vol. 181. — P. 7531–7544.
  37. Margolin W. FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles // *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* — 2005. — Vol. 6. — P. 862–871.
  38. Margulis L. Origin of eucaryotic cells. — New Haven, CT: Yale University Press, 1970.
  39. McFadden G.I., Ralph S.A. Dynamin: the endosymbiosis ring of power? // *PNAS*. — 2003. — Vol. 100. — P. 3557–3559.
  40. Michie K.A., Monahan L.G., Beech P.L., Harry E.J. Trapping of a spiral-like intermediate of the bacterial cytokinetic protein FtsZ // *J. Bacteriol.* — 2006. — Vol. 188. — P. 1680–1690.
  41. Miyagishima S-ya, Takahara M., Mori T., Kuroiwa H., Higashiyama T., Kuroiwa T. Plastid division is driven by a complex mechanism that involves differential transition of the bacterial and eukaryotic division rings // *The Plant Cell*. — 2001. — Vol. 13. — P. 2257–2268.
  42. Momyaliev K.T., Smirnova O.V., Lazarev V.N., Akopian T.A., Chelysheva V.V., Ayala J.A., Simankova A.N., Borchsenius S.N., and Govorun V.M. Characterization of the *Mycoplasma hominis ftsZ* gene and its sequence variability in *Mycoplasma* clinical isolates // *BBRC*. — 2002. — Vol. 293. — P. 155–162.
  43. Nishida K., Takahara M., Miyagishima S., Kuroiwa H., Matsuzaki M., Kuroiwa T. Dynamic recruitment of dynamin for final mitochondrial severance in a primitive red alga // *PNAS*. — 2003. — Vol. 100. — P. 2146–2151.
  44. Okinaka R.T., Cloud K., Hampton O., Hoffmaster A.R., Hill K.K., Keim P., Koehler T.M., Lamke G., Kumano S., Mahillon J., Manter D., Martinez Y., Ricke D., Svensson R., Jackson P.J. Sequence and organization of P<sub>XO1</sub>, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes // *J. Bacteriol.* — 1999. — Vol. 181. — P. 6509–6515.
  45. Oliva M.A., Cordell S.C., Loewe J. Structural insights into FtsZ protofilament formation // *Nature Struct. Mol. Biol.* — 2004. — Vol. 11. — P. 1243–1250.
  46. Osteryoung K.W. Organelle fission. Crossing the Evolutionary Divide // *Plant Physiology*. — 2000. — Vol. 123. — P. 1213–1216.
  47. Osteryoung K.W., McAndrew R.S. The plastid division machine // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* — 2001. — Vol. 52. — P. 315–333.
  48. RayChaudhuri D., Park J.T. A point mutation converts *Escherichia coli* FtsZ septation GTPase to an ATPase // *J. Biol. Chem.* — 1994. — Vol. 269. — P. 22941–22944.
  49. Romberg L., Simon M., Erickson H.P. Polymerization of FtsZ, a bacterial homolog of tubulin: is assembly cooperative? // *J. Biol. Chem.* — 2001. — Vol. 276. — P. 11743–11753.
  50. Romberg L., Levin P.A. Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FtsZ: poised at the edge of stability // *Annu. Rev. Microbiol.* — 2003. — Vol. 57. — P. 125–154.
  51. Shestopalov B.V. Amino acid code of protein secondary structure // *Цитология [публ. на англ. яз. с русским резюме]*. — 2003. — Т. 45. — С. 702–706.

52. Scheffers D.J., de Vit J.G., den Blaauwen T., Driessen A.J. GTP hydrolysis of cell division protein FtsZ: evidence that the active site is formed by the association of monomers // *Biochemistry*. – 2002. – Vol. 41. – P. 521–529.
53. Sontag C.A., Staley J.T., Erickson H.P. In vitro assembly and GTP hydrolysis by bacterial tubulins BtubA and BtubB // *J. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 169. – P. 233–238.
54. Sun Q., Yu X.-C., Margolin W. Assembly of the FtsZ ring at the central division site in the absence of the chromosome // *Mol. Microbiol.* – 1998. – Vol. 29. – P. 491–503.
55. Thanedar S., Margolin W. FtsZ exhibits rapid movement and oscillation waves in helix-like patterns in *Escherichia coli* // *Curr. Biol.* – 2004. – Vol. 14. – P. 1167–1173.
56. Varma A., Young K.D. FtsZ collaborates with penicillin-binding proteins to generate bacterial cell shape in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 2004. – Vol. 186. – P. 6768–6774.
57. Vaughan S., Wickstead B., Gull K., Addinall S.G. Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of Archaea, Bacteria and Eukaryota // *J. Mol. Evol.* – 2004. – Vol. 58. – P. 19–39.
58. Vicente M., Errington J. Structure, function and controls in microbial division // *Mol. Microbiol.* – 1996. – Vol. 10. – P. 575–584.
59. Vitha S., McAndrew R.S., Osteryoung K.W. FtsZ ring formation at the chloroplast division site in plants // *J. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 153. – P. 111–119.
60. Wu L.J., Errington J. Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis* // *Cell*. – 2004. – Vol. 117. – P. 915–925.

## БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ДОСТУП К ГЕНЕТИЧЕСКИМ РЕСУРСАМ: АНАЛИЗ ПРОБЛЕМЫ И ПРОГНОЗ

Л.В. КАЛАКУЦКИЙ\*

*Пушкинский научный центр РАН*

Основными целями всемирной Конвенции о биоразнообразии являются сохранение разнообразия генов, видов, экосистем, устойчивое использование компонентов биоразнообразия, справедливое соучастие в выгодах от использования генетических ресурсов.

Важно иметь в виду основные дефиниции, которые приведены в Конвенции и которым необходимо следовать, потому что в литературе и устной речи царит удивительное разнообразие в применении терминов.

«**Генетические ресурсы**» означают генетический материал, представляющий фактическую или потенциальную ценность.

«**Генетический материал**» означает любой материал растительного, животного, микробного или иного происхождения, содержащий функциональные единицы наследственности.

«**Биологические ресурсы**» включают генетические ресурсы, организмы или их части, популяции или любые другие компоненты экосистем, имеющие фактическую или потенциальную ценность для человечества.

«**Страна происхождения**» генетических ресурсов означает страну, которая обладает этими генетическими ресурсами в условиях *in situ*.

Следует обратить внимание, что понятие «биологические ресурсы» более широкое, чем «генетические».

Не менее существенно и то, что пока еще не принят, но широко применяется на международном уровне ряд терминов. Среди них такие важные, как доступ к генетическим ресурсам (*access to genetic resources*), соучастие в выгодах (*benefit-sharing*), коммерциализация (*commercialization*), производные (*derivatives*), провайдер (*provider*), пользователь (*user*), соучастник (*stakeholder*),

коллекция *ex situ* (*ex situ collection*), добровольный характер (*voluntary nature*).

Среди перечисленных терминов два — доступ и соучастие — занимают первое место в связи с тем, что проблема биоразнообразия и биоресурсов в настоящее время оказалась на перекрестке разнообразных научных, правовых, этических и различных других полей. Это объясняется экономическим аспектом дела. Здесь вопросы биоразнообразия в теоретическом смысле отступают на второй план, а начинает идти речь о том, какие дополнительные средства могут быть использованы для сохранения биоразнообразия.

Кроме того, многие сферы международной деятельности, такие как устойчивое развитие, интеллектуальная собственность, право, этика, биобезопасность, международные таксономические инициативы, экономика, экология, в том или ином виде ощущают присутствие проблемы доступа и соучастия, причем это взаимодействие является взаимным.

Следует подчеркнуть, что если Конвенция и такие ее документы, как, например, «Боннские руководящие принципы ...», создают некие основы для международного режима в области доступа и соучастия, то для нашей страны все это имеет значение вдвойне, потому что мы находимся на этапе экономики переходного периода. Поэтому эти советы и рекомендации являются для нас интересными не только по соображениям гармонизации и интеграции России в мировое правовое поле, но и по наведению порядка в нашем собственном доме.

Определяющими моментами здесь являются вопросы собственности. Необходимо определить, прежде всего, владельца или провайдера (поставщика того или иного продукта или услуги). Это крайне сложный вопрос. Здесь потребуется учитывать суверенитет страны, происхождение генетических ресурсов, иметь предварительное информированное согласие сторон на заключение определенных соглашений, передачу технологий и т.д.

\* Автор для переписки:

© 2006 г. Калакуцкий Л.В., член-корреспондент РАН  
Пушкинский научный центр РАН  
142290 Пушкино Московской обл.



Общий смысл выражается краткой формулой: «Если есть доступ — может быть соучастие, нет доступа — нет и соучастия, нет соучастия — нет и доступа».

Ситуация усложняется тогда, когда возникают отношения между пользователем и провайдером, которые относятся к разным странам. Социально-экономические структуры этих стран, законы, обычаи могут не совпадать, в связи с чем необходимо искать какие-то консенсусы, которые порой даются очень непросто.

И вот тогда, когда определяются взаимоотношения между провайдером и пользователем, то существенное значение приобретают попытки понять, кто же является собственником каких-либо ресурсов.

Как обстоят дела с контролем над генетическими ресурсами в России. Таблица 1 дает представление о том, какие ведомства РФ курируют, то есть осуществляют контроль над конкретными категориями биологических ресурсов.

В соответствии с этим суперпрагматическим подходом все виды разделяются на «полезные» и «вредные». Кто, как и когда проводил экспертизу и какие виды еще могут быть в той или иной категории, из этих данных не ясно. Ведомств много, все они, кто лучше, кто хуже, курируют определенные секторы. Но проблема заключается в том, что все, что здесь показано, составляет ничтожную долю от присутствующего в окружающей среде биологического и генетического разнообразия. Ничтожную долю оно составляет по той причине, что изучать это разнообразие биологи, бактериологи, а затем и другие специалисты теперь могут, не только используя наблюдение или культивирование целых организмов, но и прямо извлекая информационные макромолекулы из среды, и таким образом получать представление о присутствующем в природе генетическом и биологическом разнообразии.

Эти общие представления о всех видах, обитающих на Земле, суммированы в таблице 2. Особенно обращает внимание информация о проценте известных видов. Если в числе позвоночных животных известно 90% и более, растений — 84% и более, то, например, прокариот — бактерий и архей — известно менее 0,5% существующих в природе. Все остальное — это и есть биоразнообразие, которое присутствует, но которое мы, пока в силу ограниченности технических средств, воображения и по другим причинам, до сих пор не научились выявлять. Уместно отметить, что значительная часть присутствующего в природе биоразнообразия, если говорить о генетических, биохимических и других аспектах, связана с микроорганизмами.

Таблица 1

**Основные группы растений, грибов и животных России, имеющие практическое значение, и ведомства, осуществляющие контроль над ресурсами (в скобках указано ориентировочное число видов)**

Группы объектов живой природы	Ведомство
<b>РАСТЕНИЯ И ГРИБЫ</b>	
<b>«Полезные» виды</b>	
Древесинные и целлюлозно-бумажные виды (20–30)	МПР России
Пищевые виды (плодовые, ягодные, орехоплодные, салатно-овощные виды, грибы и т.п.) (более 400)	МПР России
Медоносные виды (300–400)	Минсельхоз России
Кормовые виды (80–100)	Минсельхоз России
Лекарственные виды (200–300)	?
Виды, имеющие декоративное значение (250–350)	?
<b>«Вредные» виды</b>	
Сорняки (80–120)	Минсельхоз России
Карантинные виды (60–80)	Минсельхоз России
<b>ЖИВОТНЫЕ</b>	
<b>«Полезные» виды</b>	
Охотничьи виды (60 — млекопитающие, 70 — птицы)	Минсельхоз России
Рыбы (200–250), водные беспозвоночные (40–50)	Госкомрыболовства России
Виды, используемые для защиты лесных растений от вредителей (80–120)	МПР России
Виды, используемые для защиты сельскохозяйственных растений от вредителей (150–230)	Минсельхоз России
Виды, используемые в традиционной медицине (50–80)	?
<b>«Вредные» виды</b>	
Виды, имеющие эпидемиологическое значение (200–300)	Минздрав России
Виды — вредители сельскохозяйственных растений (200–300)	Минсельхоз России
Виды — вредители лесных растений (150–200)	МПР России

Методический прогресс и возможность составлять определенные картины окружающего мира, ориентируясь не на наблюдения в микроскоп или бинокль, а на анализ молекулярно-биологических основ, привели к радикальной ревизии и пересмотру прежних представлений о существующем биоразнообразии и созданию схемы единого древа жизни в его вариантах.

Одно из следствий прогресса методов выявления и использования биоразнообразия заключается в том, что последнее отмечается не там, где имеются наиболее «горячие точки» биоразнообразия, а там, где имеются наиболее квалифицированные специалисты. К сожалению, распределение этих точек и специалистов пока сильно не совпадают друг с другом.

Таблица 2

## Вероятное число видов, обитающих на земле

Группы организмов	Число законно описанных видов (x1000)	Вероятное число существующих (x1000)	% известных
<b>Микроорганизмы</b>			
Прокариоты	5	> 1000	< 0,5
Грибы	72	1500	4,8
Протозоа	40	200	20
Водоросли	40	400	10
<b>Растения</b>	270	320	84
<b>Животные</b>			
Нематоды	25	400	6
Ракообразные	40	150	26
Насекомые	950	8000	12
Позвоночные	45	50	90

«Боннские руководящие принципы по обеспечению доступа к генетическим ресурсам и использования на справедливой и равноправной основе выгод от их применения» (приняты в Гааге на VI Конференции Сторон Конвенции о биоразнообразии 7–19 апреля 2002 г.) намечают основные элементы, как действовать в этой области доступа и соучастия. Здесь определяются два пути: контрактные соглашения и система регуляторных установлений.

Если взять последнюю (систему регуляторных установлений), то здесь — примат законов, норм и т.д. В данном случае есть свои достоинства — обязательность для всех реальных и потенциальных участников процесса. Имеются и недостатки — в условиях действующей систе-

мы беспомощность большей части правил связана с тем, что они не вписаны в общую стратегию, а просто функционируют в автономном режиме, отражая, в основном, ведомственные перспективы. К тому же неоднозначность дефиниций полностью торпедирует систему законодательных установлений, так как открывает очередную черную дыру, куда устремляется вся коррупция.

Контрактные соглашения имеют свои достоинства, потому что позволяют четче подойти к конкретному процессу. Они обычно рентабельны (начальные затраты могут быть невелики), а самое главное, ориентированы на активные пары, имеющие взаимный интерес — уже сложившийся или могущий сложиться, — и действуют в интересах складывающихся конкретных партнерств.

Как известно, на рынке могут быть ситуации либо конкуренции «всех против всех», когда все участники воздерживаются от каких-либо серьезных вложений в развитие процесса, но могут возникать и ситуации партнерства, и тогда все стороны начинают искать возможности продолжения каких-то отношений, с тем чтобы эти партнерские отношения совершенствовались ко взаимной выгоде. Здесь есть тоже недостатки, потому что может исключаться часть потенциальных участников, отсутствует и третейский мониторинг. Трудно проследить, что делает твой партнер, особенно если он находится в другом государстве.

Тем не менее основанная на контрактных соглашениях система уже работает. В целом система доступа и соучастия предполагает использование пакета элементарных мер, таких как национальная стратегия, работающие законы, руководства, модели различных видов соглашений (контрактов), индикаторы, механизмы разрешения споров, регистры удачных соглашений, меры по повышению потенциала. Имеются рекомендации экспертов о том, что в стране должен функционировать один национальный информационный орган по вопросам доступа и соучастия и один или несколько национальных компетентных органов. Гибкость системы повышает ее эффективность и может достигаться использованием сочетаний и комбинаций мер.

Существенным моментом является вопрос о собственности. Как известно, понятие «суверенитет» не является эквивалентом понятия «обладатель права собственности». Если говорить об осязаемой, физической собственности, в отличие от неосязаемой, интеллектуальной собственности, то такая собственность на генетический материал рассматривается как возможная. Организм хорошо известен, территория (акватория) обычно известны, и поэтому здесь может быть прослежена определенная связь территория — организм — генетический материал. Что касается интеллектуальной собственности, тут положение другое, однако вопрос этот требует специального обсуждения.

Гражданский кодекс, действующий в Российской Федерации, имеет ряд интересных положений, касающихся обращения в собственность различных «общедоступных вещей». В случаях, когда в соответствии с законом, общим разрешением, данным собственником, или в соответствии с местным обычаем в лесах, водоемах или на другой территории допускается сбор ягод, лов рыбы, сбор или добыча других «общедоступных вещей» и животных, право собственности на соответствующие вещи приобретает лицо, осуществившее их сбор или

добычу. Крайне интересное положение, особенно для микробиологов, потому что, если изъять из экосистемы зубра, то это одно действие по своим последствиям для стабильности системы, а если взять полграмма почвы — это действие другое. О какой-либо неустойчивости, возникающей с изъятием образца в системе в последнем случае, нет речи. Естественно, что последний случай может рассматриваться в категории «общедоступных для сбора вещей».

Интересны формулировки Гражданского кодекса РФ, касающиеся того, что называется «бесхозная вещь». Сюда попадают, скажем, безнадзорные животные и т.д. Право собственности на бесхозные вещи может быть приобретено в силу приобретательной давности. Здесь — огромная область, которая потребует гармонизации правовых понятий, поскольку вопрос собственности трактуется в разных странах очень различно.

Важными являются моменты, которые касаются правовых отношений в случае договоров или контрактов. Извлечения из Закона о науке (ст. 8) говорят о том, что основной правовой формой отношений между научной организацией, заказчиком и иными потребителями научной и (или) научно-технической продукции, в том числе министерствами и иными федеральными органами исполнительной власти, являются договоры (контракты) на создание, передачу и использование научной и (или) научно-технической продукции, оказание научных, научно-технических, инженерно-консультационных и иных услуг, а также другие договоры, в том числе договоры о совместной научной и (или) научно-технической деятельности и распределении прибыли.

Передача образца не обязательно означает изменения формы собственности. Например, Роспатент предлагает варианты конкретных соглашений о передаче материала (то, что в англоязычной литературе называется «material transfer agreement»), использует следующие формулировки, особо подчеркивая, что при передаче на оговариваемых условиях вопрос о собственности вообще не поднимается. Собственность остается за передающей стороной. Этот вопрос в наших аудиториях вызывает значительные сложности.

Необходимо разобрать вопрос об определении стоимости генетических ресурсов. Биологические и генетические ресурсы могут включать: «торгуемые» категории (зерно, лес, рыба, лечебные растения и т.п.) и «неторгуемые» категории («эволюционный потенциал», перспектива создания востребованных продуктов биотехнологии, экологические, эстетические и этические соображения). Договорная цена на генетические и биоло-

гические ресурсы не есть эквивалент их общей ценности. Определение общей ценности требует очень глубокого научного анализа, который по каждому случаю не проводится. Это важный вопрос, потому что, когда стороны вступают в какие-либо соглашения, то первое, о чем идет речь, — это о том, чтобы стороны были примерно одинаково информированы о предмете переговоров. Если одна сторона хорошо информирована, а другая — кроме общих благих пожеланий ничего сообщить не может, то ни о каком исходном равенстве сторон в этом процессе речь не идет.

В случае «неторгуемых» категорий возможна переуступка прав пользования объектами или системами на оговариваемых конкретно условиях (сроки, эксклюзивность, цели и характер использования, виды компенсаций). В ходе скрининга тысяч образцов в отдельных случаях могут быть созданы продукты (лекарства и т.п.), обретающие торгуемую ценность. Такую перспективу стараются иметь в виду при заключении контрактов, соглашений о передаче материала и т.д. Целесообразно учитывать и возможность изменения характера образца в будущем. Корректные контракты, соглашения о передаче материалов на основе информированного согласия всех сторон заключаются таким образом, что предусматривается, что если цели и возможности использования материалов со временем меняются, то условия контракта должны быть изменены с учетом новых возможностей, которые открываются. На потенциальную ценность генетических ресурсов оказывают влияние: состояние и перспектива научно-технических разработок; состояние рынка (спрос/предложение, венчурный капитал и т.п.); состояние правового поля; общественное мнение.

Для примера можно рассмотреть простейшую схему движения разработок от «сырого» генетического ресурса до «торгуемого продукта». По мере углубления изучения идет непрерывное увеличение ценности конкретного образца, который является предметом рассмотрения. В английской литературе это называется «a value addition». Это происходит в связи с разными обстоятельствами. Это могут быть таксономическая характеристика, экологические особенности и т.д.

Ожидаемая доля соучастия от предоставления продукта может быть очень маленькая — в случае «сырых» образцов она может вырастать, когда речь идет, скажем, об одновременном предоставлении данных клинических испытаний и т.д.

Когда идет взаимный поиск партнеров, то действует целый ряд соображений, влияющих на критерий выбор. Это не только биологическое разнообразие в

регионе и стране, но и масса других соображений, в том числе — простота и прозрачность процесса получения разрешения; калибр ученых, участвующих в контракте; наличие действенной системы защиты интеллектуальной собственности и т.д.

Эти обстоятельства интересны, так как контрактная передача, в отличие от совершенствования законодательных регулирующих положений, которые совершенствуются весьма медленно, — процесс, идущий активно. Если его осуществлять в цивилизованных рамках, то он может способствовать притоку инвестиций, а также тому, что выгоды будут получать обе стороны. Можно сказать, что если у провайдера есть интерес к тому, чтобы добавлять стоимость продукта параллельно совершенствованию технологий, то интересные параллели этому можно найти в том, что называется «делегирование разработок» в странах или компаниях, использующих ресурсы. В английской литературе это называется «outsourcing», когда компания делегирует часть своей деятельности другим компаниям, университетам или даже в другие страны. Например, успешно действующая российская компания «ХимРар» действует точно по этой схеме; только там речь идет о добавлении стоимости к простейшим химическим соединениям и превращении их в нечто более полезное, приближении разработок к рангу востребованных продуктов.

Что касается совершенствования отечественной системы доступа и соучастия, то она должна быть усовершенствована так, чтобы иметь, с одной стороны, национальный информационный, с другой стороны, — национальный компетентный органы. С помощью информационного органа потребитель и провайдер находят друг друга, обсуждают проект соглашения, который и визирует национальный компетентный орган, имеющий административную и консультационную части. В сущности, по близкой схеме оперирует известная Международная организация по всемирной торговле грозящими исчезновением видами флоры и фауны (СИТЕС: CITES — Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora).

Процессы эволюции регулятивов в сфере доступа и соучастия достаточно сложны и, если говорить о несистематизированных сектор-специфических правилах, то они могут существовать, но не помогать или даже мешать. Развитые страны в настоящее время осуществляют регулирование как сверху вниз, так и снизу вверх. Вопросы законодательные, международных соглашений — все это функции государства. А вот вопросы аудита, совершенствования контрактных соглашений и т.д. — все больше

делегируются вниз квалифицированным исполнителям, для повышения концентрации которых, в частности, и созданы биологические ресурсные центры в странах ОЭСР (Организация Экономического Сотрудничества и Развития), или OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development.

Биоресурсные центры инициируют решение вопросов в виде проектов, не только внутренних, но и проектов документов международного характера, на начальных этапах своего функционирования носящих добровольный характер. Хорошо известен Кодекс MOSAICC (Micro-Organisms Sustainable use and Access regulation International Code of Conduct), например. Он

разработан авторитетным бельгийским биоресурсным центром и близко соответствует как букве и духу Конвенции о биоразнообразии, так и, в особенности, «Боннским руководящим принципам по обеспечению доступа к генетическим ресурсам и использования на справедливой и равноправной основе выгод от их применения», а также другим документам по затронутым вопросам (он также доступен в Интернете).

*Данная статья представляет собой доклад, сделанный на III Съезде Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова 25 октября 2005 г.*

## ИЗ ИСТОРИИ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ: К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ А.Н. БЕЛОЗЕРСКОГО

В.С. ВОРОБЬЕВ\*

*Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Москва*



В № 2 настоящего журнала за прошлый год кратко приводились некоторые факты жизни и научные достижения выдающегося ученого, одного из основателей молекулярной биологии в нашей стране Андрея Николаевича Белозерского в связи с его 100-летним юбилеем со дня рождения. Безусловно, такая дата открывает возможность для более полного освещения его научной биографии.

Андрей Николаевич, к сожалению, не оставил своей развернутой автобиографии. Его жизнь пришлось на две жестокие мировые войны. Он рано потерял родителей, чудом спасся во время стихийного бедствия (алма-атинский сель 1921 г.). К тому же его отличали скромность и непритязательность. В случае отсутствия собственных жизнеописаний ученого эту миссию, как правило, берут на себя ученики или близкие. Известно,

что о И.П. Павлове прекрасно написал Л.А. Орбели, о С.И. Вавилове — И.М. Франк и т.д. Надо сказать, что одну из лучших биографий А.Н. Белозерского написал наиболее выдающийся его ученик академик РАН А.С. Спиринов. Благодаря его летописной точности и высоконаучному анализу имеется возможность предложить широкому читателю более подробные сведения, нежели скупые строки статей в энциклопедиях или кратких юбилейных статьях в журналах, а уж тем более в некрологах. Кроме того, интересный материал об ученом был представлен и известным историком химии А.Н. Шаминам (племянником Андрея Николаевича), а также А.С. Антоновым и другими учениками А.Н. Белозерского. Несомненно, свою роль в формировании более полной биографии ученого сыграл и, наверное, еще сыграет недавно вышедший к 100-летию юбилею в издательстве «Наука» сборник материалов о нем, где представлены многочисленные данные об его жизненном пути, личном характере и деятельности, включая и прекрасную иконографию из научных и семейных архивов.

А.Н. Белозерский родился 16 (29) августа 1905 г. в Ташкенте в семье юриста, происходившего из переселенцев в Среднюю Азию. Отец скончался в 1913 г., мать — в 1909 г. (она была преподавателем музыки). Андрей воспитывался в семье своей родной тети (по материнской линии) Татьяны Семеновны Лахтиной (Ивановой). В 1922—1927 гг. учился на физико-математическом факультете Среднеазиатского университета в Ташкенте. Будучи студентом, напечатал две научные статьи по физиологии растений (вместе со своим наставником профессором Андреем Васильевичем Благовещенским, известным биохимиком растений). В 1927 г. окончил университет, защитив дипломную работу «Расовые различия запасных белков *Phaseolus vulgaris*», и был оставлен в аспирантуре на кафедре физиологии растений у А.В. Благовещенского. Нужно особо отметить этот судьбоносный факт — начать свою научную жизнь Андрею Николаевичу посчастливилось под руководством

\* Автор для переписки:

© 2006 г. Воробьев В.С.,

к.м.н., член Центрального Правления ОБР

119296 Москва, Университетский пр-т, 9

E-mail: obr@biorosinfo.ru

столь выдающегося исследователя. Второй важный момент в эти молодые годы начинающего ученого — это встреча с А.Р. Кизелем (он приехал в 1927 г. в Ташкент на конференцию) и начало их совместной работы на московской базе: сначала в небольшой лаборатории в Политехническом музее, а затем последовало приглашение А.Р. Кизеля занять должность ассистента на вновь организованной в 1930 г. кафедре биохимии растений в МГУ. Александр Робертович Кизель был учеником К.А. Тимирязева, и вот почему по этой линии можно считать А.Н. Белозерского научным внуком великого русского естествоиспытателя. К сожалению, жизнь А.Р. Кизеля трагически оборвалась в связи с репрессиями начала 40-х годов, которым он подвергся как немец.

Отсюда, с кафедры Московского университета начинается прямое восхождение А.Н. Белозерского, как принято говорить, к вершинам настоящей, большой науки. Именно этой кафедре он обязан многими своими достижениями, и ей он сохранил верность до конца своих дней, с гордостью причисляя себя к «университетским ученым». Здесь он последовательно прошел все надлежащие ступени: 1930—1932 гг. — ассистент, с 1932 г. — доцент, с 1943 г. — профессор. Был и заведующим этой кафедрой (после ухода А.И. Опарина) — с 1960 по 1972 гг.

Интересно, что первые работы на кафедре были выполнены А.Н. Белозерским вместе с Р.А. Кизелем, в свое время стажировавшимся в ведущих германских химических лабораториях и вынесшим оттуда скрупулезность и почти аптекарскую дотошность в постановке опытов. Впоследствии и Андрей Николаевич требовал такой же аккуратности от всех, особенно начинающих, учеников. Вообще немецкая школа всегда была полезна для русских талантов (вспомним М.В. Ломоносова, Д.И. Менделеева, Н.Н. Зинина). Как увидим далее, это сыграло важную роль в дальнейшем творческом пути ученого.

В 1934 г. в Гоппе-Зейлеровском архиве на немецком языке была напечатана статья А.Н. Белозерского вместе с А.Р. Кизелем о наличии в проростках семян гороха тимонуклеиновой кислоты и выделении из них тимина — пиримидинового основания, характерного для ДНК. Затем в 1935 г. А.Н. Белозерским была выделена из проростков семян конского каштана и тимонуклеиновая кислота (ДНК) — то есть это было первое в мире описание присутствия ДНК у растений. По тем временам это была тонкая, филигранная биохимическая работа, требовавшая недель и месяцев кропотливого труда: препаративного — извлечение достаточного числа

проростков семян гороха, сои, фасоли, микроаналитического — применение чувствительных методов выявления малых количеств тимина и т.д. Андрею Николаевичу в период его зрелости и всеобщего признания нравилось, когда на Западе о нем говорили (со слов его учеников), что это тот, который «открыл ДНК у растений». Да, наверное, многие не возражали бы против такого авторства, но так было суждено, что первым это сделал А.Н. Белозерский.

Можно последовательно в историческом плане осветить научный вклад ученого. Но, на наш взгляд, лучше провести периодизацию его научной деятельности. Здесь выделяются примерно 10-летние циклы. Первый: 1925—1935 гг. — постижение методических основ биохимии растений, — завершившийся открытием ДНК в них. Второй: 1935—1945 гг. — исследования ДНК и РНК в растениях и бактериях; 1945—1955 гг. — целенаправленные исследования нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов (в том числе в контексте открытий Чаргаффа); изучение антибиотиков; 1955—1965 гг. — широкомасштабные работы по геносистематике; серии работ по неорганическим полифосфатам и тейхоевым кислотам. Последнее десятилетие неполное — всего 7 лет (1965—1972); это было подведение итогов и научно-организационная деятельность. Весьма знаменательно, что каждое десятилетие он завершал подытоживающей публикацией на иностранном языке в ведущих научных изданиях мира: 1934 г. — в «Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.», 1947 г. — в «Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.», 1958 г. — в «Nature». Только в 60-е годы он изменил себе, но, по всей видимости, неплохой заменой публикации за рубежом послужила его пленарная лекция на 2-м Всесоюзном биохимическом съезде в Ташкенте в 1969 г.

Если отметить главные вехи на научном пути А.Н. Белозерского, то выстраивается следующая цепь:

- открытие ДНК в растениях;
- доказательство универсальности распространения обеих нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) в живых организмах;
- установление факта связи между количеством нуклеиновых кислот в клетках и их синтетической активностью;
- выделение гистонов из растений; указание на их отсутствие у бактерий;
- обнаружение в ядрах негистоновых триптофансодержащих белков;
- инициация работ по эволюционной систематике живых организмов на основе сравнения структуры

- их нуклеиновых кислот, что привело к установлению единого плана химического строения ДНК животных, растений, грибов, микроорганизмов;
- первое свидетельство существования некодирующих РНК и первое указание на существование специальной фракции кодирующей — информационной РНК в клетках (то есть предсказание за 4 года до ее реального открытия).

Нередко в литературе об ученом несколько ступшевыается или даже не упоминается его вклад в изучение антибиотиков. Между тем ему в соавторстве с Г.Ф. Гаузе и др. принадлежат одни из первых в стране работ по изучению химической природы отечественного антибиотика грамицидина С. Проблемой антибиотиков он занимался в течение многих лет и в целом способствовал формированию данного научно-практического направления.

Надо подчеркнуть, что его научная жизнь не была сплошной чередой успехов. Многих биологов вывела из строя сессия ВАСХНИЛ 1948 г., а его, специалиста по нуклеиновым кислотам — в первую очередь и надолго, заставив отойти от базовой тематики. Однако он не отчаивался, не озлобился, а сумел постепенно восстановить ход своих основных научных занятий.

Есть еще один, крайне значимый аспект. Помимо сугубо личного вклада в преемственную сумму знаний универсальной науки, А.Н. Белозерский выполнил важнейшую миссию «скрытой, законспирированной» подготовки довольно большого числа квалифицированных кадров для нарождавшейся молекулярной биологии. И поэтому, когда после смещения Т.Д. Лысенко в 1964 г. период «антинауки» в биологии миновал и наступило время разума, не нужно было начинать с нуля: российские ученые могли практически паритетно выполнять исследования.

При историческом анализе вклада ученого существует возможность попасть под влияние ретроспективной оценки. Тем более это нежелательно в связи с информационной изоляцией СССР в 40–50-е годы и разгулом борьбы с вейсманизмом-морганизмом, когда А.Н. Белозерскому и его ученикам приходилось публично отрещиваться от термина «ген» и говорить только о нуклеиновых кислотах во избежание ненужной конфронтации с преобладавшими тогда в нашем отечестве неоламаркистами-мичуринцами (которые, к счастью, плохо разбирались в химии). Но надо сказать, что благодаря ключевым публикациям А.Н. Белозерского на иностранных языках и выездам за границу в 50-е годы на конференции его имя стало обладать фактическим, в режиме реального времени, а не ретроспективным, приоритетом, который

признавался и за рубежом. Кроме того, в те годы русские журналы читались иностранцами.

Следует в этой связи упомянуть международные контакты ученого. В 1952 г. он участвовал во II Международном биохимическом конгрессе во Франции (Париж), в 1955 г. — в III конгрессе (Бельгия, Брюссель), в 1958 г. — в IV конгрессе (Австрия, Вена). И, наконец, в 1961 г. он руководил секцией № 3 «Нуклеопротеиды и нуклеиновые кислоты» на V Конгрессе в Москве. А.Н. Белозерский был знаком со многими выдающимися биохимиками того времени: Э. Чаргаффом, С. Очоа, Ф. Сенгером и др. Он был редактором переводных книг известных молекулярных биологов. Интенсивные международные контакты он имел и по линии АН СССР.

А.Н. Белозерский обладал огромным научным и педагогическим авторитетом, который он приобрел в МГУ и в различных научно-исследовательских учреждениях. Кроме университета, он трудился в Институте биохимии им. А.Н. Баха АН СССР (у него там была лаборатория, которую он впоследствии передал своему ученику А.С. Спирину), в Институте микробиологии АН СССР. Он был также консультантом Института малярии и медицинской паразитологии АМН СССР, Института эпидемиологии и микробиологии АМН СССР.

Ясно, что его активная деятельность не осталась незамеченной. В 1958 г. он стал членом-корреспондентом, а в 1962 г. — академиком АН СССР. Далее последовали его работа в должности заместителя академика-секретаря Отделения биохимии, биофизики и химии физиологически активных соединений АН СССР с 1963 г., а в 1970 г. — избрание академиком-секретарем этого отделения. Наконец, в 1971 г. он был избран вице-президентом АН СССР и председателем Секции химико-технологических и биологических наук при Президиуме АН СССР и трудился на этом посту вплоть до своей смерти в декабре 1972 г.

Конечно, такой крупный ученый был удостоен государственных наград: Герой Социалистического Труда, 3 ордена Ленина и др.

Помимо формального признания, он оставил глубокий след в памяти многочисленных учеников. Его лекции нравились студентам, был популярен его учебник по биохимии растений, написанный вместе с Н.И. Проскуряковым. Он очень любил молодежь, это был прирожденный педагог, настоящий университетский профессор, которого все уважали и боготворили. Он обладал редкостной добродетелью — радоваться чужой радости, что в молодежной среде начинающих исследователей давало немедленный эффект, стимулировало к полезной



деятельности. Все его бывшие студенты и сотрудники отмечают доброту, такт и внутреннее благородство Андрея Николаевича. Он был знатоком истории, искусства, тонким коллекционером. Выдающийся ректор МГУ академик И.Г. Петровский мог выбрать в друзья многих университетских сослуживцев, но он все-таки выделял его, ценил его человеческие качества, был близок к нему, способствовал реализации его научно-педагогических планов. Одно из «утилитарных» последствий этой дружбы — постройка «молекулярного» корпуса МГУ (об этом будет сказано ниже).

То, что его обожали друзья и близкие, это само по себе не удивительно. Однако о выдающихся личностях часто судят и по отношению врагов. В случае Андрея Николаевича есть интересный факт — при его выдвижении в члены-корреспонденты АН СССР Ученый совет лысенковского Института генетики АН СССР единогласно (!) проголосовал за его кандидатуру. Это и есть признание профессионализма и высокого авторитета.

Надо подчеркнуть его отношение к научному воспитанию. По свидетельству его ученика Б.Ф. Ванюшина (ныне член-корреспондент РАН), он любил говорить молодежи: «Вы должны знать и уметь больше и лучше меня». Это сродни высказыванию Нильса Бора, который на встрече в МГУ в 50-х годах в ответ на вопрос, почему у него так много учеников, сказал: «Потому что я никогда не стеснялся признаться своим ученикам, что я дурак!». Другой пример, когда открывалась межфакультетская лаборатория в МГУ в 60-е годы, то он заявил молодым заведующим отделами, в их числе и будущему ее руководителю, сейчас академику РАН В.П. Скулачеву: «Я — старый и уже ничего не открою. Открывайте вы, а я буду помогать, чем смогу!». По-видимому, не случайно появилась школа А.Н. Белозерского, в рядах которой много известных биологов: академики РАН А.С. Спирин, Г.И. Абелев, И.Г. Атабеков, члены-корреспонденты РАН В.И. Агол, Ю.М. Васильев, Б.Ф. Ванюшин, И.С. Кулаев, Т.И. Тихоненко, профессор А.С. Антонов и др.

Могут добавить штрихи к портрету А.Н. Белозерского и личные воспоминания автора, который в 1971 г. присутствовал на заседании в Президиуме АН СССР, где обсуждался вопрос о правомерности теории Хидена — возможности закрепления следов долговременной памяти индивидуума с помощью РНК в нейронах. Инициаторами обсуждения был ряд крупных советских нейробиологов, большинство которых в те годы составляли электрофизиологи. Надо было видеть, как элегантно и тактично председательствовавший на этом заседании

по праву вице-президента АН СССР Андрей Николаевич отвел аргументы нейрофизиологов, решивших найти решения собственных проблем в чужих областях, точнее, в биохимии нуклеиновых кислот, которая переживала настоящий бум в 50–70-х годах прошлого века и, естественно, будоражила умы представителей смежных специальностей. В этом был солидарен с ним и присутствовавший в зале В.А. Энгельгардт.

В заключение необходимо рассказать об отдельной яркой главе в жизни и деятельности А.Н. Белозерского — создании в 1965 г. Межфакультетской проблемной лаборатории биоорганической химии. Это было providенциальным решением: впоследствии она стала одним из очагов развития отечественной молекулярной биологии, а в 1991 г. была преобразована в НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ (в ее составе сейчас трудятся 11 академиков и членов-корреспондентов РАН, 62 доктора и 147 кандидатов наук). Еще ранее (в 1963 г.) им была основана новая кафедра вирусологии биолого-почвенного факультета МГУ, что затем позволило готовить кадры и интенсифицировать научные исследования в данной области.

Нельзя сказать, что формирование межфакультетской лаборатории было легким, безоблачным событием. Ее создание происходило в условиях мощного противодействия тогдашнего министра высшего и среднего специального образования СССР В.П. Елютина. Однако тандем двух академиков — ректора Ивана Георгиевича Петровского и заведующего кафедрой Андрея Николаевича Белозерского — оказался сильнее (конечно, не без поддержки М.А. Прокофьева, первого заместителя министра высшего и среднего специального образования СССР в 1959–1966 гг., а с 1966 по 1984 гг. — министра просвещения СССР, члена-корреспондента АН СССР, академика АПН СССР, заведующего кафедрой химии природных соединений химфака МГУ, которая также была интегрирована в структуру межфакультетской лаборатории). Вскоре рядом с биофаком было выстроено новое шестиэтажное здание (лабораторный корпус А), фактически для целого биохимического научно-исследовательского института, оснащенного первоклассным импортным оборудованием на университетские валютные лимиты. То, что произошло позднее, было всего лишь следствием этих кардинальных решений. Внезапная смерть двух выдающихся покровителей данного дела на рубеже 1972–1973 гг. поставила под угрозу существование межфакультетской лаборатории, но твердая позиция нового ректора Р.М. Хохлова и решительная поддержка вице-президента АН СССР Ю.А. Овчинникова

направили ее развитие в позитивное русло. Ныне мы видим расцвет данного учреждения и его существенный вклад в современную физико-химическую биологию, а в последнее время — и в биотехнологию. Имя А.Н. Белозерского навсегда закреплено за его детищем, и знаменитый «молекулярный» корпус является достойным памятником ему.

Библиография трудов ученого по состоянию на 1968 год представлена в издаваемой издательством «Наука» серии «Библиографии ученых СССР» (1968 г.). Полная библиография (248 работ) приведена в академическом издании к 100-летию со дня рождения (2006 г.).

## Литература

1. Андрей Николаевич Белозерский. Библиографии ученых СССР. — М.: Наука, 1968.
2. Андрей Николаевич Белозерский: к 100-летию со дня рождения: научная и педагогическая деятельность, воспоминания, материалы / [отв. ред. А.С. Спирина]; Ин-т биохимии им. А.Н. Баха РАН. — М.: Наука, 2006. — 369 с.
3. Антонов А.С. Начало. (О работах А.Н. Белозерского) // Химия и жизнь. — 1967. — № 11. — С. 19–22.
4. Белозерский Андрей Николаевич / БМЭ. 3-е изд. — М.: Советская энциклопедия. — 1976. — Т. 3. — С. 22–23.
5. Белозерский А.Н. Биохимия нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов. Избранные труды (Вст. статья А.С. Спирина, А.Н. Шамина). — М.: Наука, 1976. — 372 с.
6. Белозерский А.Н. Нуклеиновые кислоты и их связь с эволюцией, филогенией и систематикой организмов. Второй Всесоюзный биохимический съезд. (Ташкент, октябрь 1969 г.). — Ташкент: Изд-во «Фан» Узбекской ССР. — 1969. — 40 с.
7. Белозерский А.Н. О нуклеиновом компоненте ростков семян гороха // Уч. Зап. МГУ. — 1935. — Вып. 4. Биология. — С. 209–215.
8. Белозерский А.Н. О ядре у бактерий // Микробиология. — 1944. — Т. 13. — Вып. 1. — С. 23–31.
9. Белозерский А.Н. Состав нуклеиновых кислот и эволюционная систематика / В кн.: Молекулярная биология. Проблемы и перспективы. (К 70-летию со дня рождения академика В.А. Энгельгардта). — М.: Наука, 1964. — С. 5–13.
10. Белозерский А.Н., Дубровская И.И. О белках и тимонуклеиновой кислоте семени конского каштана (*Aesculus hippocastanum*) // Биохимия. — 1936. — Т. 1. — Вып. 6. — С. 665–675.
11. Белозерский А.Н., Проскуряков Н.И. Практическое руководство по биохимии растений. Учебное пособие для государственных университетов. — М.: Сов. наука, 1951. — 388 с. (учебник переведен на китайский язык).
12. Благовещенский А.В., Белозерский А.Н. О концентрации водородных ионов в водных вытяжках из листьев некоторых горных растений // Бюлл. САГУ. — 1924. — Вып. 7. — С. 14–17.
13. К 100-летию со дня рождения академика А.Н. Белозерского // Успехи биол. химии. — 2005. — Т. 45. — С. 455–462.
14. Методы исследования нуклеиновых кислот. Пер. с англ. / Под ред. и с предисл. А.Н. Белозерского. — М.: Мир, 1970.
15. Спирина А.С. Академик Андрей Николаевич Белозерский и становление молекулярной биологии (к 100-летию со дня рождения) // Вестник РАН. — 2005. — Т. 75. — № 8. — С. 742–750.
16. Спирина А.С. Краткий очерк научно-исследовательской, педагогической и организационной деятельности / Андрей Николаевич Белозерский. Библиография ученых СССР. — М.: Наука, 1968. — С. 7–19.
17. Спирина А.С., Белозерский А.Н., Шугаева Н.В., Ванюшин Б.Ф. Изучение видовой специфичности нуклеиновых кислот у бактерий // Биохимия. — 1957. — Т. 22. — С. 744–754.
18. Спирина А.С., Шамин А.Н. А.Н. Белозерский и развитие молекулярной биологии в нашей стране // Природа. — 1976. — № 10. — С. 72–82.
19. Шамин А.Н. Открытия, создавшие молекулярную биологию // Журнал ВХО им. Д.И. Менделеева. — 1977. — Т. 22. — С. 668–678.
20. 60-летие академика А.Н. Белозерского // Вестн. АН СССР. — 1965. — № 10. — С. 136–137. Редакционная статья.
21. *Belozersky Andrei Nicolaevich* // International who's who. 30th ed. 1966–1967. — London: Europa Publications Ltd. [1966]. — p. 96.
22. *Belozersky Andrei Nicolaevich* // McGraw Hill modern men of science. Vol. 2. — New York: McGraw Hill book company, 1968. — p. 33–34.
23. *Belozersky A.N.* On the nucleoproteins and polynucleotides of certain bacteria // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. — 1947. — Vol. 12. — p. 1–6.
24. *Belozersky A.N., Spirin A.S.* A correlation between the compositions of desoxyribonucleic and ribonucleic acids // Nature. — 1958. — Vol. 182. — p. 111–112.
25. *Kiesel A., Belozersky A.* Untersuchungen ueber Protoplasma. V. Ueber die Nucleinsaeure und die Nucleoproteide der Erbsenkeime // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. — 1934. — Bd. 229. — H. 4–6. — S. 160–166.

## ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2006 г.

## СОБЫТИЯ, ФАКТЫ

**1866** — публикация статьи Г. Менделя «Опыты над растительными гибридами» — Gregor Mendel. *Versuche ueber Pflanzen-Hybriden. Verhandlungen des Naturforschenden Vereines. Abhandlungen. Bruenn. Bd. 4. S. 3–47.*

**1896** — Эдмунд Б. Вильсон (E. Wilson) напечатал книгу «The cell in development and heredity» — это дата основания цитогенетики. Русский перевод «Клетка в развитии и наследственность» появился в 1936 и 1940 гг.

**1901** — присуждение Нобелевской премии по химии (первой по счету) Якобу Г. Вант-Гоффу (1852–1911) за открытие законов химической динамики и осмотического давления в растворах.

**1901** — присуждение Нобелевской премии по медицине (первой по счету) Эмилю Адольфу фон Берингу (1854–1917) за работы по серотерапии, и прежде всего за ее использование в борьбе против дифтерии.

**1906** — У. Бэтсон (W. Bateson) ввел термин «генетика» (обнародовал его, а в 1905 г. упомянул в частном письме). Интересно, что термин «ген» был предложен позже, в 1909 г. датским ботаником В.Л. Йохансенем (равно как и термины «генотип», «фенотип»), а слово «геном» ввел немецкий биолог Г. Винклер в 1920 г. для обозначения совокупности генов, сосредоточенных в хромосомах.

**1911** — Т.Х. Морган на дрозофиле обнаружил связь между конкретными генами и конкретными хромосомами (карты расположения генов в «группах сцепления» и сопоставление этих групп с хромосомами).

**1911** — обнаружение Раусом вируса саркомы (он был впоследствии — в 1966 году — удостоен за это Нобелевской премии).

**1916** — К. Бриджес (ученик Т.Х. Моргана) открыл явление анеуплоидии — нерасхождения X-хромосом в мейозе, в результате чего образуется число

хромосом, не кратное типичному гаплоидному набору ( $2n - 1$  — моносомии;  $2n + 1$  — трисомии, и т.д.).

**1916** — открытие Робертсоновской (В. Робертсон, Великобритания) транслокации (центрического соединения) — частного случая транслокации, связанного с полным переносом на одну хромосому материала другой, то есть слияния двух хромосом.

**1916** — Н.К. Кольцов выступил с широкой программой развития экспериментальной биологии (в связи с основанием нового института), включая изучение мутагенеза и строения гена.

**1926** — публикация книги Т.Х. Моргана «Теория гена» — T. H. Morgan. *The theory of the gene.* New Haven, Yale Univ. Press.

**1926** — А.Г. Стертевант (ученик Т.Х. Моргана) обнаружил инверсии частей хромосомы и исследовал их влияние на кроссинговер.

**1926** — выход в свет книги Н.И. Вавилова «Центры происхождения культурных растений».

**1926** — открытие моносомии у растений (Р. Клаусен, Т.Х. Гудспид, США).

**1926** — Герман Дж. Меллер получил доказательство мутагенеза и изменения хромосом под действием рентгеновых лучей (в 1927 году публикация и доклад на V Международном генетическом съезде в Берлине).

**1931** — присуждение Нобелевской премии по медицине Отто Генриху Варбургу (1883–1970) за открытие природы и функций дыхательного фермента.

**1931** — публикация статьи Б. Мак-Клинток «Корреляция цитологического и генетического кроссинговера у *Zea mays* [кукурузы]» (Barbara McClintock. *A correlation of cytological and genetical crossing over in Zea mays.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) с доказательством обмена участками между гомологичными хромосомами при кроссинговере. Лауреат Нобелевской премии по

медицине 1983 г. за открытие транспозирующих генетических систем.

**1936** — выход в свет книги Н.К. Кольцова «Организация клетки».

**1936** — публикация статьи А.Н. Белозерского и И.И. Дубровской с сообщением о выделении ДНК из растений: «О белках и тимонуклеиновой кислоте семени конского каштана (*Aesculus hippocastanum*)». Напечатано в журнале «Биохимия». — 1936. — Т. 1. — Вып. 6. — С. 665–675.

**1941** — Дж. Бидл и Э. Тейтем (лауреаты Нобелевской премии 1958 г.) установили принцип «один ген — один фермент». Напечатано: Beadle G.W. and E.L. Tatum. Genetic control of biochemical reaction in *Neurospora* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1941. — Vol. 27. — P. 499–506.

**1946** — Дж. Ледерберг и Э. Тейтем открыли генетическую рекомбинацию у бактерий.

**1946** — Макс Дельбрюк и Алфред Д. Херши независимо друг от друга показали генетическую рекомбинацию у вирусов.

**1946** — присуждение Нобелевской премии по химии: одну половину — Джеймсу Бетчеллеру Самнеру за открытие свойств кристаллизации ферментов, а вторую половину — Джону Говарду Нортропу и Уэнделлу Мередиту Стэнли за получение в чистом виде ферментов и белковых вирусов.

**1946** — присуждение Нобелевской премии по медицине Герману Джозефу Меллеру за открытие возникновения мутаций под действием рентгеновых лучей.

**1956** — публикация Артуром Корнбергом сообщения об открытии ДНК-полимеразы, с помощью которой ему удалось синтезировать ДНК in vitro. Напечатано в журнале: *Biochimica et Biophysica Acta*. — Vol. 21. — Issue 1, July 1956. — P. 197–198. Авторы: Arthur Kornberg, I.R. Lehman, Maurice J. Bessman and E.S. Simms

**1961** — начало расшифровки генетического кода Маршаллом Уорреном Ниренбергом и Иоганном Генрихом Маттеи. В августе этого года М.У. Ниренберг сделал

доклад на V Международном биохимическом конгрессе в Москве, в котором впервые сообщил о данном открытии. Речь шла о синтезе полиурацила — молекулы РНК, построенной только из урацила, на которой матричным образом синтезируется полипептид, состоящий только из одной аминокислоты — фенилаланина. Публикация: M.W. Nirenberg, J.H. Matthaei. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic poliribonucleotides // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 1961. — Vol. 47. — N 10. — P. 1588–1602.

**1961** — Ф. Жакоб и Ж. Моно разработали теорию генетических регуляторных механизмов.

**1961** — присуждение Нобелевской премии по химии Мелвину Калвину за исследование биохимических превращений углекислого газа в растениях.

**1961** — регистрация USDA первого биопестицида *Bacillus thuringiensis* (Bt).

**1966** — завершение расшифровки генетического кода — полное раскрытие всех 64 комбинаций (кодонов — трех смежных нуклеотидов) с помощью искусственного синтеза нуклеиновых кислот, а в 1968 г. — присуждение за это Нобелевской премии Маршаллу Уоррену Ниренбергу, Хару Гобинду Коране, Роберту Холли (последний открыл тРНК, переносящую аланин в клетках дрожжей).

**1966** — присуждение Нобелевской премии по медицине Фрэнсису Пейтону Раусу за открытие вируса саркомы, носящей его имя.

**1966** — основание Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

**1971** — основание в США первой научно-исследовательской компании по микробиологии «Сетус» (Cetus Co.). Научную работу в ней курировал лауреат Нобелевской премии 1958 г. Дж. Ледерберг.

**1976** — гены дрожжей встроены в геном бактерий.

**1976** — основание Г. Бойером (Herbert W. Boyer) и Р. Свэнсоном (R.A. Swanson) биотехнологической компании «Дженентек» (Genentech, Inc.), использовавшей метод рекомбинантной ДНК.

**1976** — присуждение Нобелевской премии по медицине Б. Бламбергу и Д.К. Гайдузеку за открытие новых механизмов возникновения и распространения инфекционных заболеваний.

**1981** — создание первых трансгенных животных (мышам были встроены гены других животных, университет штата Огайо).

**1986** — первые полевые испытания генетически модифицированного табака, устойчивого к гербицидам (США, Франция).

**1986** — получены трансгенные свиньи с трансформированным геном человека (ген гормона роста): две особи погибли до достижения половой зрелости, а третья стала парализованной (эксперименты в г. Белтсвилл, штат Мэриленд, США).

**1986** — разработка Л. Худом (Leroy Hood) первого автоматического секвенатора.

**1986** — издание Управлением по разработке политики в области науки и техники Правительства США Координационных правил, регулирующих биотехнологию («Coordinated Framework for the Regulation of Biotechnology Products»).

**1986** — начало обсуждения проекта «Геном человека» (Р. Дюльбекко и др.).

**1996** — открытие гена, ассоциированного с развитием болезни Паркинсона.

**1996** — принятие Федерального закона № 86-ФЗ от 05.07.1996 г. «О государственном регулировании генно-инженерной деятельности».

## ПЕРСОНАЛИИ

**140 лет со дня рождения Томаса Ханта Моргана (1866–1945)**, выдающегося американского генетика, создателя хромосомной теории наследственности (вместе с К. Бриджесом, А. Стертевантом, Г. Меллером).

**120 лет со дня рождения Василия Степановича Пустовойта (1886–1972)**, отечественного селекционе-

ра, академика АН СССР, ВАСХНИЛ. Дважды Герой Социалистического Труда. Автор и соавтор 42 сортов подсолнечника, ржи, проса, кукурузы, клецелины.

**115 лет со дня рождения Джона Говарда Нортропа (1891–1987)**, американского биохимика, выделившего химотрипсин. Нобелевская премия 1946 г. вместе с Дж.Б. Самнером и У.М. Стэнли.

**115 лет со дня рождения и 65 лет со дня смерти (авиакатастрофа во 2-й мировой войне) Фредерика Гранта Бантинга (1891–1941)**. Лауреат Нобелевской премии по медицине 1923 г. (совместно с Дж. Маклеодом) за открытие инсулина.

**115 лет со дня рождения Альфреда Генри Стертеванта (Alfred Henry Sturtevant, 1891–1970)**, американского генетика, соавтора хромосомной теории наследственности (совместно с Т.Х. Морганом, Г. Меллером и К. Бриджесом).

**105 лет со дня рождения Лайнуса Карла Полинга (Linus Carl Pauling, 1901–1994)**, знаменитого американского химика. Дважды лауреат Нобелевской премии: 1954 — по химии за работы по природе химической связи и их приложению к определению структуры сложных соединений, 1962 — Нобелевская премия мира (такой чести удостоивались еще М. Кюри — физика, химия, Ф. Сенгер — химия, Дж. Бардин — физика). Иностраный член АН СССР (1958). Лауреат Международной Ленинской премии «За укрепление мира между народами» (1970). Изучал строение молекул и природу химической связи методами квантовой механики. Сформулировал принципы образования ионных кристаллических структур. Занимался исследованием структуры белков, раскрытием молекулярных механизмов серповидно-клеточной анемии. Начиная с 70-х его интересы переключились на изучение антиоксидантов (витамины Е и С). Обладая огромным авторитетом в науке, настойчиво пропагандировал витамин С как средство против канцерогенеза и старения. Опубликовал известную статью с М. Дельбрюком 1940 г. в «Science» о комплементарности при репликации гена. Автор фундаментальных книг: «Природа химической связи» (1939) и «Общая химия» (1948).

**105 лет со дня рождения Сергея Евгеньевича Северина (1901–1993)**, отечественного биохимика, ученика В.С. Гулевича. Академик АН и АМН СССР.

Академик-секретарь Отделения медико-биологических наук АМН СССР (1948–1957). Президент Всесоюзного биохимического общества (1968–1992). Герой Социалистического Труда. Основная область научных исследований — дипептиды. Основатель кафедры биохимии животных на биофаке МГУ (1939). Директор Института питания АМН СССР (1945–1948).

**105 лет со дня рождения Павла Пантелеймоновича Лукьяненко (1901–1973)**, российского селекционера. Академик АН СССР, ВАСХНИЛ. Дважды Герой Социалистического Труда. Вывел десятки высокоурожайных и высокопродуктивных сортов пшеницы, в том числе знаменитую озимую пшеницу «Безостая 1», районированную в 1959 г.

**100 лет со дня рождения и 25 лет со дня смерти Макса Людвиг Хеннинга Дельбрюка (Max Ludwig Henning Delbrueck, 1906–1981)**, выдающегося биофизика и молекулярного биолога. Уроженец Германии, правнук Ю. Либиха. Физическое образование получил в университетах Тюбингена, Берлина, Бонна и Геттингена (в последнем он был удостоен докторской степени по физике, 1930). Стажировался в Бристоле, Копенгагене, Цюрихе. В молодые годы творчески общался со многими знаменитыми физиками — Юджином Вигнером, Максом Борном, Вольфгангом Паули, Нильсом Бором, Полем Дираком, Сесилом Пауэлом, Патриком Блэкеттом (все — Нобелевские лауреаты). Поддерживал научные и дружеские контакты с русским физиком Георгием Гамовым. С 1932 по 1937 гг. работал в Берлине, в Институте химии кайзера Вильгельма ассистентом у Лизы Мейтнер, занимавшейся ядерной физикой вместе с Отто Ганом. В эти годы в Берлине сблизился с Н.В. Тимофеевым-Ресовским, а в 1935 г. опубликовал совместно с ним и К.Г. Циммером широко известную статью о механизмах мутагенеза и структуре гена. В конце 30-х годов, получив стипендию Рокфеллеровского фонда, работал в Калифорнийском технологическом институте (Калтехе), в лаборатории Т.Х. Моргана. Здесь он сформировал научную группу вместе с Сальвадором Лурия и Алфредом Херши, занимавшуюся изучением бактериофагов («фаговая группа»). Главное достижение этого коллектива — раскрытие закономерностей репликации вирусов. За это они все были награждены Нобелевской премией по медицине 1969 г. Вторая мировая война застала Дельбрюка в США, где он и остался в качестве преподавателя физи-

ки в Университете Вандербильта, в Нашвилле (принял гражданство США в 1945 г.). В 1947 г. был назначен профессором биологии в Калтехе, где трудился до своей отставки в 1977 г., после чего вплоть до смерти в 1981 г. он состоял членом правления института. Начиная с 50-х годов Дельбрюк занимался сенсорной физиологией, изучая на спонгиофорах рода *Rhizomyces* трансдукцию зрительного сигнала. В 1962 г. он основал Институт молекулярной генетики при Кельнском университете. Спустя 10 лет после его кончины, в 1992 г. в Берлин-Бухе был открыт Центр молекулярной медицины, носящий имя Макса Дельбрюка.

**100 лет со дня рождения Соса Исааковича Алиханяна (1906–1985)**, отечественного ученого, профессора, заслуженного деятеля науки и техники, вице-президента Всесоюзного общества генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова. Ученик А.С. Серебровского. Сфера научных интересов — генетика и селекция микроорганизмов. Занимался фундаментальными и практическими проблемами производства антибиотиков, исследованиями молекулярной генетики *E. coli* и ее T-четных бактериофагов, разрабатывал технологии получения аминокислот (лизин, глутаминовая кислота и др.). В 1966 г. он основал и возглавил Государственный НИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (официально институт открыт в 1968 г.), успешно функционирующий до сих пор (ныне — ГосНИИгенетика). Создатель школы специалистов в данной области.

**95 лет со дня рождения Уильяма Говарда Стайна (William Howard Stein, 1911–1980)**, американского биохимика. Совместно со Стэнфордом Муром определил химическую структуру рибонуклеазы, за что оба были удостоены половинной Нобелевской премии по химии в 1972 г.

**90 лет со дня рождения Фрэнсиса Гарри Комптона Крика (Francis Harry Compton Crick, 1916–2004)**, английского физика. Под влиянием чтения книги Э. Шредингера «Что такое жизнь с точки зрения физики» переключился в 1946 г. на изучение биологических проблем. В сотрудничестве с Дж. Уотсоном в 1953 г. разработал двуспиральную модель ДНК, за что оба были удостоены Нобелевской премии 1962 г. (в коллектив лауреатов был также включен и М. Уилкинс). Впоследствии занимался проблемами генетического кода, механизмами памяти (актиновые

элементы в постсинаптических структурах), научной публицистикой.

**90 лет со дня рождения Мориса Хью Фредерика Уилкинса (Maurice Hugh Frederick Wilkins, 1916–2004).** Английский ученый, специалист в области рентгеноструктурного анализа. Участвовал совместно с Дж. Уотсоном и Ф. Криком в создании структурной модели ДНК (двойной спирали), за что все трое были удостоены Нобелевской премии по медицине 1962 г. Его внимание к изучению ДНК стимулировало знакомство с книгой Э. Шредингера «Что такое жизнь с точки зрения физики».

**90 лет со дня рождения Жана Батиста Габриеля Жоашема Доссэ (Jean Baptiste Gabriel Joachim Dausset) — род. в 1916 г.** Французский иммунолог. Открыл в 1959 г. HLA (человеческие лейкоцитарные антигены). Лауреат Нобелевской премии по медицине 1980 г. (совместно с Дж.Д. Снеллом, первооткрывателем МНС — главного комплекса гистосовместимости, — и Б. Бенасеррафом).

**90 лет со дня рождения и 30 лет со дня смерти Алексея Алексеевича Покровского (1916–1976),** отечественного биохимика. Академик АМН СССР, вице-президент АМН СССР (1974–1976). Директор Института питания АМН СССР (1961–1976). Разрабатывал вопросы теории питания (в частности, концепцию сбалансированного питания), клинической диетологии, токсикологии. Автор названных его именем микрометодов определения величин некоторых биохимических показателей (общий азот, креатинин, холестерин и др.). Занимался поиском новых источников белка с использованием методов микробиологического синтеза (за этот цикл работ удостоен Государственной премии СССР, 1971).

**90 лет со дня рождения Василия Дмитриевича Беляева (1916–1979),** начальника Главного управления микробиологической промышленности при Совете Министров СССР (1966–1979), по сути — первого министра микробиологической промышленности. В 1964–1966 гг. — зам. министра химической промышленности СССР. Выпускник Санкт-Петербургского государственного технологического института (ныне технического университета). Российской академией медико-технических наук учреждена премия имени

В.Д. Беляева за работы в области промышленной биотехнологии.

**85 лет со дня рождения Ирины Николаевны Блохиной (1921–1999),** отечественного микробиолога, академика АМН СССР (РАМН). На протяжении многих лет (около полувека) — директор Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии (ныне институт носит ее имя). Разрабатывала проблемы идентификации и классификации бактерий, дисбактериозов, иммунобиотехнологии. Лауреат Государственной премии СССР, почетный гражданин города Нижнего Новгорода. Депутат Верховного Совета СССР нескольких созывов.

**80 лет со дня рождения Пола Берга (Paul Berg) — род. в 1926 г.** Американский биохимик. Лауреат Нобелевской премии по химии 1980 г. Первым получил рекомбинантную молекулу ДНК (в 1972 г.), то есть фактически он является основателем генной инженерии. Тем не менее вместе с другими крупными учеными в 1974 г. П. Берг выступил с предложением наложить мораторий на работы с рекомбинантными ДНК in vitro, который был прерван после Асиломарской конференции в 1975 г.

**75 лет со дня рождения Александра Сергеевича Спирина (род. в 1931 г.),** отечественного биохимика, академика РАН. Ученик А.Н. Белозерского. Директор Института белка РАН в Пушкино (1967–2000). Заведующий кафедрой молекулярной биологии (бывшая кафедра биохимии растений) биофака МГУ. Член Президиума АН СССР (80-е годы). Автор ряда фундаментальных исследований в области биохимии нуклеиновых кислот, в том числе работы, в которой предсказано существование информационной РНК (1957, 1958) — совместно с А.Н. Белозерским. Внес большой вклад в изучение рибосом. Открыл информосомы (1964). Начиная с 70-х годов занимается проблемой внеклеточного синтеза белка. ФЕБС удостоила его медали им. Ханса Кребса (1969). Лауреат Ленинской (1976) и Государственной (1986) премий СССР. Награжден Большой золотой медалью РАН им. М.В. Ломоносова (2001).

**75 лет со дня рождения Николая Павловича Бочкова (род. в 1931 г.),** отечественного медицинского генетика, академика АМН СССР (РАМН). Ученый секретарь Президиума АМН СССР (1980–1985).

Вице-президент РАМН (1996–2006). Директор Института медицинской генетики АМН СССР (1969–1985). Вице-президент Всесоюзного общества генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова. Изучал влияние ионизирующего излучения на хромосомы человека, занимался проблемами химического мутагенеза, популяционно-географическими аспектами хромосомных болезней и др. Автор ряда книг и руководств по цитогенетике и медицинской генетике.

**75 лет со дня рождения Гамильтона Отанела Смита (Hamilton Othanel Smith) — род. в 1931 г.** Американский исследователь. В 1970 г. выделил фермент — рестрикционную эндонуклеазу у бактерии *H. influenzae*, — который рассекал чужеродную ДНК на фрагменты везде, где встречал запрограммированную последовательность из 6 оснований. В 1978 г. удостоен Нобелевской премии по медицине за открытие ферментов рестрикции и приложение этих знаний к проблемам молекулярной генетики (вместе с В. Арбером и Д. Натансом).

**70 лет со дня рождения Виталия Ивановича Швеца (род. в 1936 г.),** академика РАМН, специалиста в области медицинской биотехнологии. Заведует кафедрой биотехнологии в Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова.

**95 лет со дня смерти Фрэнсиса Гальтона (Francis Galton, 1822–1911),** английского ученого разностороннего плана, занимавшегося метеорологией (первым установил антициклоны), статистикой, биометрией, антропологией, дактилоскопией и др. Двоюродный брат Ч. Дарвина. Исследовал также вопросы наследственности (в числе прочего разработал метод близнецового анализа). Автор книги «Наследственный гений» («Heredity genius», 1869). Открыл генетический закон регрессии («закон дочерней регрессии» — «law of filial regression»), который впоследствии не был подтвержден. Основатель евгеники.

**70 лет со дня смерти Арчибалда Гаррода (Archibald Garrod, 1857–1936),** английского исследователя, впервые установившего связь гена и фермента (1902) при изучении алкаптонурии у человека — первая публикация в 1909 г. «Врожденные нарушения метаболизма» в журнале «Lancet».

**65 лет со дня смерти Фредерика Гриффита (Frederick Griffith, 1877–1941),** английского исследователя, который в 1928 г. сообщил о трансформации бактерий, — роль ДНК в передаче генетической информации была показана позднее, в 1944 г. в опытах О. Эйвери и др. Суть работы Фредерика Гриффита сводится к тому, что пневмококки одного штамма (не-вирулентные) приобретают наследуемую вирулентность при контакте с лизатом патогенных бактерий, убитых нагреванием.

**60 лет со дня смерти Алексея Николаевича Баха (1957–1946),** отечественного химика, академика АН СССР, академика-секретаря Отделения химических наук АН СССР. Основатель Института биохимии АН СССР (1935), который ныне носит его имя.

**45 лет со дня смерти Эрвина Шредингера (Erwin Schroedinger, 1887–1961),** австрийского физика, лауреата Нобелевской премии (1933). Человек с абсолютным авторитетом в физике (всем известны его знаменитые уравнения), он прославился своим смелым обращением к проблемам биологии, написав книгу «Что такое жизнь с точки зрения физики» (1945). Книга имела большое значение для построения прочной физико-химической базы для биологии, обратив внимание многих специалистов к поискам в этом направлении.

**40 лет со дня смерти Норайра Мартиросовича Сисакяна (1907–1966),** отечественного биолога, академика АН СССР, Главного ученого секретаря Президиума АН СССР. Один из организаторов космической биологии в СССР.

**40 лет со дня смерти Льва Александровича Зильбера (1894–1966),** отечественного вирусолога, академика АМН СССР. Автор вирусогенетической концепции происхождения опухолей.

**30 лет со дня смерти Жака Люсьена Моно (Jacques Lucien Monod, 1910–1976).** Французский ученый, лауреат Нобелевской премии по медицине 1965 г. за открытия, касающиеся генетической регуляции синтеза ферментов и вирусов (совместно с Андре М. Львовым и Ф. Жакобом). Научная доля Ж.Л. Моно в премии — совместное описание с Ф. Жакобом информационной РНК.



**25 лет со дня смерти Николая Владимировича Тимофеева-Ресовского (1900–1981)**, отечественного генетика. Автор фундаментальных работ в области мутагенеза, популяционной генетики, биогеноценологии. Человек трудной судьбы: зарубежная командировка, а затем вынужденное пребывание в эмиграции в Германии 30–40-х годов, послевоенный арест, осуждение и пребывание в заключении, нелегкая адаптация к труду на родине — сначала в закрытых лабораториях, затем в открытых НИИ. Похоронен в Обнинске рядом с могилой жены Елены Александровны Тимофеевой-Ресовской (урожд. Фидлер), разделившей с супругом тяготы линии жизни и радость совместной научной работы.

**20 лет со дня смерти Александра Евсеевича Браунштейна (1902–1986)**, отечественного биохимика, академика АН и АМН СССР. Открыл реакцию трансаминирования. Внес крупный вклад в изучение ферментов, в том числе установление первичной структуры аспарататтрансаминаз.

**15 лет со дня смерти Сальвадора Лурия (Salvador Edward Luria, 1912–1991)**. Известный американский бактериолог, итальянец по происхождению. За исследования в области биохимии и механизмов размножения бактериофагов в 1969 г. получил Нобелевскую премию (вместе с М. Дельбрюком и А.Д. Херши).

## СОБЫТИЯ ПЕРВОГО ПОЛУГОДИЯ 2006 г.

## Увековечение памяти братьев Вавиловых\*

16 января 2006 г. произошло памятное для Москвы событие — на здании Московского государственного лингвистического университета (бывшего до революции Императорским коммерческим училищем) — Остоженка, 38 — была открыта мемориальная доска в честь академиков братьев Вавиловых.



К галерее знаменитостей, связанных с этим характерным зданием эпохи русского классицизма (это дом генерала П.Д. Еропкина постройки 1771 г.), — писателя И.А. Гончарова, историка С.М. Соловьева, память которых уже увековечена соответствующими досками, прибавились не менее славные для России имена — генетика и селекционера Николая Ивановича Вавилова и физика Сергея Ивановича Вавилова.

На церемонии открытия доски присутствовали ректор МГЛУ И.И. Халеева, вице-президент РАН Н.А. Платэ, зам. директора Физического института им. П.Н. Лебедева РАН О.Н. Крохин, зам. директора Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН И.А. Захаров-Гезехус, вице-президент РАСХН А.А. Жученко, председатель правления Комитета по науке и технологиям Правительства г. Москвы, член-корреспондент РАН В.Г. Систер, члены Вавиловского общества генетиков (С.В. Шестаков, Л.Н. Андреев, Н.К. Янковский), ряд известных ученых (академик,

бывший вице-президент РАН В.Н. Кудрявцев и др.), студенты МГЛУ и др. Присутствовал также сын Н.И. Вавилова — Юрий Николаевич, доктор физ.-мат. наук, сотрудник ФИАН.

Вступительное слово произнесла ректор МГЛУ И.И. Халеева, которая и открыла доску. Взору собравшихся предстала надпись на черном лабрадорите: «Здесь в Императорском коммерческом училище учились естествоиспытатели братья Николай и Сергей Вавиловы». Затем выступили Н.А. Платэ, А.А. Жученко, О.Н. Крохин, С.В. Шестаков, В.Г. Систер, В.П. Визгин и др., которые охарактеризовали вклад в науку братьев академиков Вавиловых и дали оценку происшедшему событию. Многим запомнились слова академика РАН Н.А. Платэ (который является внуком выдающегося химика Н.Д. Зелинского): «В истории науки XX столетия и в истории цивилизации не только российской, но и мировой эти два имени сверкают как бриллианты в лучшей короне мировых достижений». Все выступавшие подчеркивали, что каждый из братьев Вавиловых оставил глубокий след в науке XX века: Николай Иванович — в биологии, создав теорию гомологических рядов и собрав мировую коллекцию культурных растений, Сергей Иванович — в физике, открыв эффект Вавилова — Черенкова, за обнаружение которого в 1958 году наши отечественные исследователи И.Е. Тамм, И.М. Франк, П.А. Черенков были удостоены Нобелевской премии. В заключение сын Н.И. Вавилова Юрий Николаевич поблагодарил всех лиц, способствовавших делу увековечения памяти ученых, отметив при этом большую роль мэра Москвы Ю.М. Лужкова и президента РАН Ю.С. Осипова.

Императорское московское коммерческое училище было основано в 1804 г. и представляло собой учебное заведение, открытое почти для всех сословий. Одной из главных целей, поставленных учредителями, было обучение представителей среднего сословия коммерческому делу «дабы не пускать иноземцев к бухгалтерским книгам» (задача актуальная и тогда и важная на все времена). Но не только этому учили молодых людей в училище — в нем основательно преподавали гуманитарные науки (европейские языки) и давали неплохое общее образование. Последнее немаловажно, поскольку училище дало базовые знания и возможность поступить

\* Материал подготовлен О.В. Воробьевой

старшему брату Вавилову — Николаю — в «Петровку» (тогда — Московский сельскохозяйственный институт, ныне — Тимирязевскую сельскохозяйственную академию) и стать выдающимся биологом, а младшему — Сергею — поступить в Московский университет и в дальнейшем сформироваться как крупнейшему отечественному физику.

Если для И.А. Гончарова годы учебы в коммерческом училище (1822—1830) были досадным эпизодом и оставили тягостные воспоминания от рутины и низкого уровня преподавания, а для С.М. Соловьева здание на Остоженке было родительским домом (он родился в нем — отец его был протоиереем и преподавателем Закона Божьего в училище), то для братьев Вавиловых учеба в нем была стартовой подготовкой к будущим серьезным занятиям наукой. К тому времени, когда в училище проходили обучение Вавиловы, учебная база и преподавательский состав были гораздо выше, чем в годы пребывания в нем И.А. Гончарова, и по сути уровень не уступал гимназическому. Достаточно напомнить, что преподавали в училище известные профессора, в их числе профессор химии А.Н. Реформатский, который высоко поставил уровень преподавания естественных наук и способствовал увлечению Николая своим предметом. Известно, что он даже организовал дома химическую лабораторию, и однажды во время опыта произошел взрыв, который повредил ему один глаз. По свидетельству брата Сергея, «взрыв охладил интерес к химии». В результате Николай переключился на растения и агрономию. Что интересно, напротив, Сергей во время учебы в училище увлекался ботаникой и собиранием гербариев, однако после занялся физикой.

Путь братьев Вавиловых в науку был непрост. Коммерческое училище не давало права поступать в университет: в нем не учили латынь. Поэтому Николай был вынужден идти в сельскохозяйственный институт, где экзамен по латинскому языку не проводился. Младший брат учел все это и предусмотрительно перед окончанием училища сам выучил латынь и сдал этот предмет при поступлении в Московский университет.

Примечательно, что Николай Вавилов окончил училище ровно 100 лет назад 3 января 1906 г., а Сергей завершил учебу тремя годами спустя. Так что открытие доски совпало с таким юбилеем. Кроме того, описываемое событие проходит параллельно и с другой памятной датой — 75-летием МГЛУ.

Инициаторы открытия мемориальной доски сделали очень важное и высокополезное дело. Увековечение памяти двух братьев — национальных гениев России — это

восстановление исторических достопримечательностей, это бесценный воспитательный пример для молодежи, это своеобразное назидание новым поколениям москвичей да и всем юным соотечественникам, начинающим свою жизнь в учебе, познании и самосовершенствовании. К тому же это еще один акт покаяния нашего общества перед памятью Николая Ивановича Вавилова — мученика науки, принявшего смерть в 1943 г. в тюремных стенах по несправедливому обвинению.

## Обновление Президиума РАМН

**28 февраля — 2 марта 2006 г.** в Москве состоялась 16-я (79-я) сессия Общего собрания Российской академии медицинских наук. Президент РАМН, академик РАМН В.И. Покровский, руководивший академией с 1987 г., выступил с отчетным докладом за истекшие 5 лет, после чего сложил свои полномочия и попросил не выдвигать его кандидатуру на следующий срок. Состоялись выборы нового президента и Президиума РАМН. В результате обсуждения и голосования президентом РАМН избран академик РАН и РАМН М.И. Давыдов, директор Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН. Первым вице-президентом РАМН избран академик РАН и РАМН М.А. Пальцев, ректор ММА им. И.М. Сеченова, вице-президентом РАМН — академик РАМН А.Л. Гинцбург, директор НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Главным ученым секретарем Президиума РАМН — академик РАМН А.М. Сточик. Академиком-секретарем Отделения клинической медицины РАМН избран академик РАМН Е.И. Гусев, академиком-секретарем Отделения медико-биологических наук РАМН — академик РАМН С.В. Грачев, академиком-секретарем Отделения профилактической медицины РАМН — академик РАМН В.В. Зверев. Вице-президентом — председателем Президиума Сибирского отделения РАМН избран академик РАМН В.А. Труфакин, вице-президентом — председателем Президиума Северо-Западного отделения РАМН — академик РАМН Б.И. Ткаченко. Членами Президиума РАМН избраны: академики РАН и РАМН А.И. Воробьев и С.П. Миронов, академики РАМН А.А. Баранов, Л.А. Бокерия, В.А. Быков, С.И. Колесников, Г.П. Котельников, Н.О. Миланов, В.И. Петров, Ю.С. Сидоренко, В.П. Харченко, Н.А. Яцицкий, В.Н. Ярыгин.

**14–17 марта 2006 г.** в Москве состоялась Международная специализированная выставка «Мир биотехнологии 2006» и Московская международная конференция «Биотехнология и медицина». В выставке приняли участие 160 организаций из 12 стран мира: России, Австрии, Великобритании, Германии, Индии, Латвии, Польши, США, Финляндии, Франции, Швеции и Японии. В их числе: CUNO CIS, Invitrogen Life Technologies, Tosoh Bioscience, Амершам Биосайнз, Бекман Культер, Биохиммак, Битра, АНО АВТЕХ, БИОРАД Лаборатории, Интерлабсервис, Владисарт, ДЕЛЬРУС, ФакторМед, Микроген, Himedia Laboratories, Fresenius Kabi, Панэко, Parallabs, Артвик, Marubishi Bioengineering, Биолайн, Компания Биоком, Биосан, Компания «ДНК-технология», Фирма Гален, Мосхимфармпрепараты им. Н.А. Семашко, Московская фармацевтическая компания и др. МКНТ, РАН, РАМН и РАСХН представили коллективные экспозиции. В рамках конференции состоялась пленарное заседание, 2 круглых стола и 17 секций.

## ПУБЛИКАЦИИ

### Недавно вышли в свет:

*Шемякин М.М. Химия и биология: на стыке двух наук: избранные тр. / [отв. ред. В.Т. Иванов]; Ин-т биоорг. химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. — М.: Наука, 2006. — 264 с. — (Памятники отечественной науки. XX век).*

**Аннотация.** Книга представляет собой сборник основных научных работ академика-секретаря Отделения биохимии, биофизики и химии физиологически активных соединений АН СССР академика М.М. Шемякина. М.М. Шемякин — выдающийся ученый в области органической и биорганической химии, крупнейший специалист по химии природных соединений. Основными объектами его исследований были антибиотики, белково-пептидные вещества, липиды, витамины и другие биологически активные соединения. В книге приведены работы по установлению строения, синтезу и методам анализа ряда этих веществ; большое внимание уделено вопросам практического применения достижений химии. Для научных работников, специализирующихся в области химии, биологии, биохимии, медицины, аспирантов и студентов.

*Медведев Н.Н. Юрий Александрович Филиппченко. 1882–1930 / Отв. ред. В.В. Бабков. — 2-е изд., испр. и доп. — М.: Наука, 2006. — 230 с. — (Научно-биографическая литература).*

**Аннотация.** Книга о жизни и деятельности профессора Ленинградского университета и заведующего Лабораторией генетики АН СССР Ю.А. Филиппченко (1882–1930), труды которого явились ценным вкладом в развитие русской и советской генетики. В ученом удачно сочетались талант неутомимого исследователя, организатора науки, блестящего оратора и педагога. В книге показан широкий круг научных интересов Ю.А. Филиппченко. Вышедшая в 1978 г. книга значительно отличается от задуманной автором — ее рукопись подверглась многочисленным купюрам и насильственным переделкам. В настоящее издание по первоначальной авторской рукописи добавлена ее драматическая история. Для биологов и многих читателей, интересующихся историей науки и судьбами ее представителей.

*Баранник В.П., Емельянов В.Е., Макаров В.В. и др. Этиловый спирт в моторном топливе / Под ред. В.В. Макарова. — М.: ООО «РАУ-Университет», 2005. — 184 с.*

**Аннотация.** В книге приведены сведения об использовании этанола в моторном топливе (для двигателей с принудительным зажиганием), приведены рекомендации по наиболее его эффективному применению. Книга будет полезна техническим специалистам, осуществляющим разработку и производство моторного топлива как традиционного вида (бензины), так и альтернативных его видов с использованием этилового спирта (бензолы).

*Андрей Николаевич Белозерский: к 100-летию со дня рождения: научная и педагогическая деятельность, воспоминания, материалы / [отв. ред. А.С. Спирин]; Ин-т биохимии им. А.Н. Баха РАН. — М.: Наука, 2006. — 369 с.*

**Аннотация.** Книга посвящена Андрею Николаевичу Белозерскому (1905–1972) — основоположнику молекулярной биологии в СССР, вице-президенту АН СССР. Собранные в книге материалы содержат очерки о жизни и деятельности А.Н. Белозерского, его выступления и научную публицистику, воспоминания его многочисленных учеников и последователей.

Представлен обширный материал об А.Н. Белозерском как о крупном организаторе науки, а также его роли в общественной жизни страны. Книга дает представление об Андрее Николаевиче Белозерском как о выдающемся ученом, прекрасном педагоге, человеке благородном и необыкновенно обаятельном. Для читателей, интересующихся историей развития отечественной науки, жизнью и деятельностью замечательных ученых.

*Харгиттаи И. Откровенная наука: Беседа с корифеями биохимии и медицинской химии / Пер. с англ. — М.: КомКнига, 2006.*

**Аннотация.** Книга И. Харгиттаи состоит из 36 бесед с выдающимися учеными XX века, работавшими в области биохимии, медицинской химии и смежных дисциплин, многие из которых были удостоены Нобелевской премии. Среди них: один из создателей модели пространственной структуры ДНК (двойной спирали) Джеймс Уотсон; один из первооткрывателей явлений трансдукции и рекомбинации у бактерий Джошуа Ледерберг; Фредерик Сенгер, единственный ученый, получивший две Нобелевские премии по химии; Маршалл Ниренберг, внесший решающий вклад в расшифровку генетического кода; первооткрыватель фактора роста нервов Рита Леви-Монтальчини; отец генной инженерии Пол Берг; ученые, занимавшиеся выяснением природы коровьего бешенства, и многие другие. Неформальный стиль бесед предоставляет читателю возможность увидеть личность великих ученых, узнать не только их научные взгляды, но и их мнения по политическим, этическим, философским и другим вопросам. Историкам науки может быть интересен взгляд изнутри на выдающиеся открытия XX века. Это вторая книга из серии «Откровенная наука» (перевод первой книги, *Откровенная наука. Беседы со знаменитыми химиками*, вышел в 2003 г. в издательстве URSS).

*Рокитянский Я.Г. Николай Вавилов. Историческая драма. Пьеса в пяти действиях с документальным приложением. Изд. 2-е, испр., доп. — М.: Academia, 2005. — 151 с. — илл.*

**Реферат.** Автор, известный историк науки, писатель, поэт, публицист. Кандидат исторических наук. Обозреватель журнала «Вестник РАН». Среди прочих проблем занимается исследованием жизни и творчества Н.И. Вавилова. В числе других работ им в соавторстве с Ю.Н. Вавиловым и В.А. Гончаровым опубликована книга «Суд палача. Николай Вавилов в застенках НКВД» (2000). В 2004 г. он напечатал пьесу о трагической судьбе ученого, в которой в художественной форме предстают разные персонажи — от родных и друзей Н.И. Вавилова до Т.Д. Лысенко, И.В. Сталина и Л.П. Берия. Настоящая книга представляет собой 2-е издание, исправленное и дополненное, хорошо проиллюстрированное, в том числе и материалами следственного дела.

*Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В. Высокмолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. — М.: Научный мир, 2005. — 216 с.*

**Аннотация.** Книга посвящена современным проблемам биохимии, клеточной биологии и биотехнологии неорганических полифосфатов — линейных полимеров, состоящих из остатков фосфорной кислоты, соединенных между собой богатыми энергией фосфоангидридными связями. Рассматриваются методы анализа полифосфатов в биологическом материале, приведены характеристики ферментов обмена этих соединений. Описаны функции полифосфатов в клетках, включая такие, как резервирование фосфата и энергии, формирование мембранных каналов, участие в регуляции экспрессии генов и преодолении стрессовых условий. Отдельные главы посвящены перспективам использования этих соединений в биотехнологии, а также возможной роли полифосфатов в химической и биологической эволюции. Книга предназначена для биохимиков, микробиологов, биотехнологов и студентов соответствующих специальностей.

## ПРЕДСТОЯЩИЕ МЕРОПРИЯТИЯ 2006 ГОДА

### КОНФЕРЕНЦИИ, СЪЕЗДЫ

**9–12 апреля 2006 года** в Чикаго (США) состоится конференция «BIO 2006 International Convention» с участием более 16000 представителей из 60 стран. Планируется выставка с 1500 участниками. Это — крупное ежегодное собрание биотехнологов. Справки: [www.bio.org](http://www.bio.org).

**5–8 июня 2006 года** в г. Санкт-Петербурге будет проходить Международный симпозиум «ЕС–Россия: перспективы сотрудничества в области биотехнологии в 7-й Рамочной программе». Организаторы: Министерство образования и науки РФ, Роснаука, РАН, РАСХН, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН, Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Российский национальный контактный центр по разделу «Биотехнология, сельское хозяйство, качество пищи и безопасность продуктов питания» (РНКЦ-ПИЩА), Директорат «Е» по биотехнологии, сельскому хозяйству и пище при Европейской Комиссии и INTAS. Цель симпозиума — обсуждение вопросов организации и перспектив научно-технического сотрудничества России и Евросоюза в рамках Программы FP 7 в области биотехнологии. В симпозиуме предполагается участие ведущих европейских ученых — руководителей крупных международных консорциумов по Программе FP 6, участвующих в формировании технологических платформ 7-й Рамочной программы. Справки: <http://www.biorosinfo.ru>.

**19–21 июня 2006 г.** в Пущино состоится Третья международная конференция из серии «Наука и бизнес» — «Международное сотрудничество в биотехнологии: Перспективы и реальность». Спонсоры Конференции: BioIndustry Initiative, Государственный департамент США, Департамент энергии США, Международный научно-технический центр, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Офис

глобальных военно-морских исследований. Поддерживающие организации: Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, журнал «Наука и жизнь», консалтинговая компания Abercade. Председатели оргкомитета: А.М. Боронин, В.А. Дмитриева. Организатор: Исследовательский центр «Биоресурсы и Экология» (CERBRD) Пущино, Московская область. Контактное лицо: Вера Дмитриева, директор. Тел.: +7 (4967) 73 29 79; 73 16 92; Факс: +7 (496 7) 33 05 10 E-mail: [vdmitrieva@ibpm.pushchino.ru](mailto:vdmitrieva@ibpm.pushchino.ru), [www.cerbrd.ru](http://www.cerbrd.ru).

**4–5 июля 2006 года** в г. Калининграде состоится Научно-практическая конференция «Пищевая и морская биотехнология: проблемы и перспективы». Конференция посвящается 60-летию Калининградской области. Организаторы: Правительство Калининградской области, Калининградский государственный технический университет, Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Сопредседатели оргкомитета: В.Е. Иванов, Р.Г. Васильев; секретарь — О.Я. Мезенова. Справки: <http://www.biorosinfo.ru>.

**12–14 июля 2006 года** в Торонто (Канада) состоится конференция «World Congress on Industrial Biotechnology and Bioprocessing». Участвуют исследователи и бизнесмены в области биотехнологии, биоэнергетики, биопроцессинга. Справки: <http://www.bio.org/worldcongress/reg/>.

**6–8 октября 2006 года** в Дюссельдорфе (Германия) состоится конференция BIO-Europe 2006 — 12th Annual International Partnering Conference. Справки: <http://www.rsci.ru/travel/confer>.

По уточненной информации, **IV Съезд Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова состоится 17–19 октября 2006 года** в Пущинском научном центре РАН (Пущино Московской обл.). Подробности на сайте: <http://www.biorosinfo.ru>.

1. Рукописи статей и других материалов представляются в редакцию на бумажном носителе (формат А4) или в электронном виде (на дискете или по электронной почте с обязательным уведомлением).
2. Текст набирается в Microsoft Word, шрифт — Times New Roman, размер шрифта — 12, межстрочный интервал — полуторный. Размещение на листе формата А4 со стандартными полями. Кроме текста статьи, добавляются краткие сведения об авторе (ах): Ф.И.О., место работы, должность, научные степень и звание, адрес для переписки и факсимильной и электронной связи).
3. Объем рукописи: оригинальные статьи — не более 12 — 14 стр. (в среднем 22000 знаков без пробела), не более 25 цитированных авторов; обзоры — не более 20 — 24 стр. (в среднем 40000 знаков без пробела), список литературы — не более 50 авторов. Требования к композиции рукописи: 1) оригинальные статьи — УДК, название, автор (ы), место работы, резюме на русском и английском языках, ключевые слова, введение, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение (выводы), литература, список сокращений; 2) краткие сообщения и обзоры строятся в виде сплошного текста, без вышеуказанных рубрикации, со списком литературы, но без резюме; 3) остальные материалы (письма в редакцию, хроникальные сообщения, рецензии и т.д.) представляются в произвольной форме.
4. Требования к оформлению содержания рукописи (таблицы, графики, формулы, фотографии, рисунки и др.). Рисунки прилагаются отдельно к тексту рукописи в бумажном и электронном виде. Таблицы помещаются по ходу текста или прилагаются отдельно. Порядок оформления иллюстративного и иного дополнительного (пояснений, примечаний, благодарностей и т.д.) материала к текстам обычный.
5. Требования к цитированной литературе: Список литературы оформляется или в алфавитном порядке (вначале — литература на русском языке, затем — на иностранных), или по порядку упоминания и ссылок в тексте при использовании цифр. В последнем случае номер цитированного источника берется в тексте в квадратные скобки. Оформление отдельного источника литературы осуществляется в соответствии с общепринятыми для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные установки (Index Medicus и др.).
6. Не допускается публикация работ, уже напечатанных или посланных в редакции других изданий.

7. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.
8. Принятые к публикации рукописи проходят рецензирование, после чего принимается окончательное решение о возможности печатания. Отклоненные рукописи не возвращаются.
9. Редакция не несет ответственности за достоверность фактов, выводы и суждения, приведенные в представленном к печати и опубликованном материале авторов.
10. Редакция оставляет за собой право делать научную и литературную правку, в том числе сокращать объем статей.
11. Адрес редакции указан на титульном листе журнала.
12. Журнал является безгонорарным. Редакция резервирует для автора статьи по 1 экземпляру журнала. По вопросам приобретения отдельных номеров журнала следует обращаться в редакцию. Подписка на журнал в течение 2006 года проводиться не будет.



## ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (ОБР) создано в 2003 г., зарегистрировано Минюстом РФ.

Главными целями деятельности ОБР являются:

- содействие развитию биотехнологии в России как приоритетного направления научно-технического прогресса, основы повышения уровня жизни и благосостояния ее граждан;
- содействие сохранению научного и научно-технологического потенциала биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства, достижению приоритета российской науки;
- обеспечение обмена научными идеями и научно-техническими достижениями, передовым производственным опытом;
- содействие развитию сотрудничества ученых, инженеров, специалистов с мировым научным и общественно-политическим сообществом;
- создание условий для творческой работы, роста профессионализма и компетентности, более полного использования интеллектуального потенциала членов организации в интересах развития науки и производства.

Для достижения этих целей ОБР осуществляет различные мероприятия, в том числе проводит конференции, симпозиумы, рабочие совещания. Ежегодно проводится Съезд Общества биотехнологов России.

Издается журнал «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова» совместно с Информационно-аналитическим центром медико-социальных проблем.

ОБР имеет отделения в 50 регионах России и объединяет свыше 1000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

ОБР тесно сотрудничает с Союзом биотехнологов и Фондом развития биотехнологии.

Основой организационной деятельности ОБР являются региональные отделения, тесно взаимодействующие с Центральным Правлением и Секциями (экспертными группами).

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

*Контакты: Адрес: 119296 Москва, Университетский пр-т, 9*

*Тел.: 8-916-640-76-18*

*E-mail: obr@biorosinfo.ru; www.biorosinfo.ru*