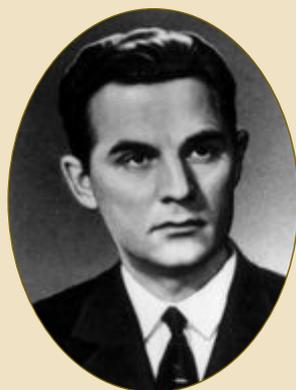


· БЕЛОЗЕРСКИЙ · ТОДД · СЕНГЕР · ОЧОА ·

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

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

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



**Т. 7, № 4**  
**2011**

· СМИТ · ГИЛБЕРТ · БЕРГ · ЭНГЕЛЬГАРДТ ·

2011, Т. 7, № 4

**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, О.Я. Мезенова

**Редакционный совет**

В.А. Быков (Москва), В.Г. Дебабов (Москва), С.Х. Дегтярев (Новосибирск),  
В.В. Зверев (Москва), В.Т. Иванов (Москва), Л.В. Калакуцкий (Пушино),  
М.П. Кирпичников (Москва), О.И. Киселев (Санкт-Петербург), А.И. Мирошников (Москва),  
Т.В. Овчинникова (Москва), О.Н. Озолинь (Пушино), А.Н. Панин (Москва),  
В.О. Попов (Москва), К.Г. Скрябин (Москва), 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: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13, 662-95-91

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.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

*Издается при поддержке*

*Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова*

ISSN 1996-4741

© Информационно-аналитический центр  
медико-социальных проблем, 2011.

**СОДЕРЖАНИЕ**

**Колонка главного редактора**

К читателям. *Р.Г. Василев* ..... 6

**Оригинальные статьи**

Тест-системы на основе иммобилизованных ферментов для определения пестицида паратион-метила и ионов меди.  
*А.М. Филиппова, С.С. Аванесян, О.В. Воробьева* ..... 7

**Обзоры**

Перспективы развития современной медицинской биотехнологии.  
*Р.Г. Василев* ..... 13

**Краткие сообщения**

Исследование терапевтического эффекта совместной экспрессии гена-убийцы HSVtk и иммуномодулятора GM-CSF в клетках опухоли.  
*И.В. Алексеенко, Т.В. Виноградова, Е.П. Копанцев, Е.Д. Свердлов* ..... 18

Получение синтетических аналогов природного микроцина C в системе in vitro.  
*О.Б. Бантыш, К.В. Северинов* ..... 20

Флуоресцентный субстрат фосфолипазы A2.  
*И.А. Болдырев, А.С. Алексеева, Ю.Г. Молотковский, Е.Л. Водовозова* ..... 22

Яд пауков – источник пептидных анальгетиков.  
*А.А. Василевский, Ю.В. Королькова, И.В. Мошарова, Е.В. Гришин* ..... 24

Участок ДНК, расположенный между генами U2AF1L4 и PSENN (Pen2), проявляет свойства двунаправленного промотора.  
*Д.А. Дидыч, Н.А. Смирнов, С.Б. Акопов, Л.Г. Николаев, Е.Д. Свердлов* ..... 26

Криогели на основе модифицированного поливинилового спирта для тканевой инженерии.  
*М.Г. Дроздова, Р.А. Акасов, Д.С. Зайцева-Зотова, А.С. Голунова,*

*А.А. Артюхов, И.А. Прудченко, М.И. Штильман, Е.А. Марквичева* ..... 27

Новый фактор антитерминации транскрипции, действующий на РНК-полимеразу термофильных бактерий.  
*Д.М. Есюнина, Н.А. Миропольская, Л.С. Минахин, А.В. Кульбачинский* ..... 29

riNG-body – новая органелла в сперматоцитах *Drosophila melanogaster*, ответственная за riРНК-сайленсинг.  
*М.В. Кибанов, В.А. Гвоздев, Л.В. Оленина* ..... 31

Существенные функции РНК-хеликазы Vasa в семенниках *D. melanogaster*.  
*А.А. Котов, Л.В. Оленина* ..... 33

Оптимизация условий культивирования эукариотических продуцентов рекомбинантного интерферона-бета.  
*Н.В. Лобанова, И.Н. Трусова, Е.Г. Благодатских, О.И. Копылова,*

*Е.Н. Сауткина, Р.А. Хамитов, Ю.А. Серегин* ..... 35

Биосинтез лимонной кислоты из глюкозы с помощью дрожжей *Yarrowia lipolytica*.  
*Ю.Н. Лунина, С.В. Камзолова, И.Ф. Пунтус, И.Г. Моргунов* ..... 37

Новая парадигма регуляции никотинового ацетилхолинового рецептора: эндогенные гомологи трехпетельных нейротоксинов яда змей — белки Lypx1 и SLURP1 человека. <i>Е.Н. Люкманова</i> .....	39
Структурно-функциональный анализ взаимодействия ДНК-гиразы <i>E. coli</i> и белков, содержащих пентапептидные повторы. <i>М.В. Метелев</i> .....	41
Топология и энергетика взаимодействий между трансмембранными $\alpha$ -спиралями рецепторов ErbB. <i>К.С. Минеев, Э.В. Бочаров, Е.Н. Люкманова, Н.Ф. Хабибуллина, М.В. Гончарук, А.С. Арсеньев</i> .....	43
Исследование свойств нового ингибитора химотрипсина из клубней картофеля <i>Solanum tuberosum</i> . <i>И.А. Парфенов, Т.А. Валцеева</i> .....	45
Структурные основы биосинтеза хромофора зеленого флуоресцентного белка (GFP). <i>Н.В. Плетнева, К.А. Лукьянов, Н.Г. Гурская, К.А. Горячева, В.И. Мартынов, В.З. Плетнев</i> .....	47
Свойства односторонних ДНК-матриц, полученных на основе аптамеров к холоферменту РНК-полимеразы <i>Escherichia coli</i> . <i>Д.В. Пупов, Д.М. Есюнина, А.В. Кульбачинский</i> .....	49
Изучение экспрессии гена сладкого белка Тауматина II из <i>Thaumatococcus daniellii</i> в трансгенных растениях табака. <i>А.С. Пушкин, А.П. Фирсов, С.В. Долгов</i> .....	51
Трансгенные формы березы с генами <i>bar</i> и <i>gs1</i> , устойчивые к сублетальным и летальным дозам фосфинотрицина. <i>М.А. Салмова, Д.С. Закарючкина, Т.Е. Шадрина, К.А. Шестибратов</i> .....	53
Изучение полиморфизма генома широкого спектра токсигенных грибов рода <i>Fusarium</i> . <i>А.А. Стахеев, С.К. Завриев</i> .....	55
Исследование энхансерной активности длинного концевой повтора эндогенного ретровируса семейства HERV-K(HML-2) и механизмов регуляции его работы. <i>М.В. Сунцова, Е.В. Гогвадзе, А.А. Буздин</i> .....	57
Особенности метилирования гена MDR1 при лейкозах. Новый подход к индуцированному CpG-метилированию генома для биологии и медицины. <i>С.В. Тарлачков, О.В. Дьяченко, Д.В. Маринич, Т.В. Шевчук</i> .....	59
Анализ энхансерных РНК и модификаций хроматина в трансфицированных клетках <i>S2 Drosophila melanogaster</i> , содержащих репортерные генетические конструкции. <i>Д.М. Федосеева, О.В. Кретова, Н.А. Чуриков</i> .....	61
Мембраномоделирующие среды для бесклеточной продукции мембранных белков: мицеллы детергентов, бицеллы, липосомы и липид-белковые нанодиски. <i>Н.Ф. Хабибуллина, Е.Н. Люкманова, Э.О. Шенкарев</i> .....	63
Микробиологический синтез $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты. <i>М.Н. Чиглинцева, С.В. Камзолова, И.Г. Моргунов</i> .....	65
Иммуноаналитические методы мониторинга холерного токсина и термолабильного энтеротоксина <i>E. coli</i> с использованием моноклональных антител. <i>Н.С. Шошина, М.А. Симонова, Е.Э. Петрова, О.Е. Лахтина, Р.Л. Комалева, Т.И. Валякина</i> .....	67
<b>Хроника</b>	
События второй половины 2011 года .....	69
<b>Правила для авторов</b> .....	79

**CONTENTS**

**Column of the editor-in-chief**

To readers. *R.G. Vasilov* ..... 6

**Original articles**

Test systems based on immobilized enzymes for the determination of the pesticide parathion-methyl and copper ions.

*A.M. Filippova, S.S. Avanesyan, O.V. Vorobyeva* ..... 7

**Reviews**

Prospects for the development of modern medical biotechnology.

*R.G. Vasilov* ..... 13

**Short communications**

Investigation of the therapeutic effect of a joint expression of the gene-killer HSVtk and immunomodulator GM-CSF in tumor cells.

*I.V. Alekseenko, T.V. Vinogradova, E.P. Kopantsev, E.D. Sverdlov* ..... 18

Preparation of synthetic analogues of natural microcin C with in the in vitro system.

*O.B. Bantysh, K.V. Severinov* ..... 20

The fluorescent substrate of phospholipase A2.

*I.A. Boldyrev, A.S. Alexeeva, Ju.G. Molotkovsky, E.L. Vodovozova* ..... 22

The poison of spiders — a source of peptide analgesics.

*A.A. Vasilewski, Yu.V. Korolkova, I.V. Mosharova, E.V. Grishin* ..... 24

Segment of DNA located between the genes U2AF1L4 and PSENN (Pen2), exhibits the properties of the bidirectional promoter.

*D.A. Didych, N.A. Smirnov, S.B. Akopov, L.G. Nikolaev, E.D. Sverdlov* ..... 26

Cryogels based on a modified polyvinyl alcohol for tissue engineering.

*M.G. Drozdova, R.A. Akasov, D.S. Zaitseva-Zotova, A.S. Golunova,*

*A.A. Artyuhov, I.A. Prudchenko, M.I. Shtilman, E.A. Markvicheva* ..... 27

A new factor of transcription antitermination acting on RNA polymerase of thermophilic bacteria.

*D.M. Esyunina, N.A. Miropolskaya, L.S. Minakhin, A.V. Kul'bachinski* ..... 29

piNG-body — a new organelle in spermatocytes *Drosophila melanogaster*, is responsible for silencing piRNA.

*M.V. Kibanov, V.A. Gvozdev, L.V. Olenina* ..... 31

The essential functions of RNA helicase Vasa in the testes *D. melanogaster*.

*A.A. Kotov, L.V. Olenina* ..... 33

Optimization of conditions for the cultivation of eukaryotic producing recombinant interferon-beta.

*N.V. Lobanova, I.N. Trusova, E.G. Blagodatskikh, O.I. Kopylova,*

*E.N. Sautkina, R.A. Khamitov, Yu.A. Seregin* ..... 35

Biosynthesis of citric acid from glucose using yeast *Yarrowia lipolytica*.

*J.N. Lunina, S.V. Kamzolova, I.F. Puntus, I.G. Morgunov* ..... 37

---

---

The new paradigm of regulation of nicotinic acetylcholine receptor: endogenous homologues of three loops neurotoxins of snake venom, Lynx1 and SLURP1 human proteins. <i>E.N. Lyukmanova</i> .....	39
Structural and functional analysis of the interaction of DNA gyrase <i>E. coli</i> and proteins containing pentapeptide repeats. <i>M.V. Metelev</i> .....	41
Topology and energetics of interactions between transmembrane $\alpha$ -helices of ErbB receptors. <i>K.S. Mineev, E.V. Bocharov, E.N. Lyukmanova, N.F. Khabibullina, M.V. Goncharuk, A.S. Arseniev</i> .....	43
Investigation of the properties of the new chymotrypsin inhibitor from potato tubers <i>Solanum tuberosum</i> . <i>I.A. Parfenov, T.A. Valueva</i> .....	45
Structural basis of the biosynthesis of the chromophore of green fluorescent protein (GFP). <i>N.V. Pletneva, K.A. Lukyanov, N.G. Gurskaya, K.A. Goryacheva, V.I. Martynov, V.Z. Pletnev</i> .....	47
The properties of single-stranded DNA templates derived from aptamers to the RNA polymerase holoenzyme <i>Escherichia coli</i> . <i>D.V. Pupov, D.M. Esyunina, A.V. Kul'bachinski</i> .....	49
The study of gene expression of sweet protein thaumatin II from <i>Thaumatococcus daniellii</i> in transgenic tobacco plants. <i>A.S. Pushin, A.P. Firsov, S.V. Dolgov</i> .....	51
Transgenic forms with birch genes <i>bar</i> and <i>gs1</i> , resistant to sublethal and lethal doses of phosphinothricin. <i>M.A. Salmova, D.S. Zakaryuchkina, T.E. Shadrina, K.A. Shestibratov</i> .....	53
The study of polymorphism in the genome wide range of toxigenic fungi of the genus <i>Fusarium</i> . <i>A.A. Staheev, S.K. Zavriev</i> .....	55
Investigation of enhancer activity long terminal repeat of endogenous retrovirus family HERV-K (HML-2) and the regulatory mechanisms of its work. <i>M.V. Suntsova, E.B. Gogvadze, A.A. Buzdin</i> .....	57
Features of methylation of the <i>MDR1</i> gene in leukemia. A new approach to induced CpG-methylation of the genome for biology and medicine. <i>S.A. Tarlachkov, O.V. Dyachenko, D.V. Marinich, T.V. Shevchuk</i> .....	59
Analysis of enhancer RNAs and chromatin modifications in transfected cells S2 <i>Drosophila melanogaster</i> , containing reporter genetic constructs. <i>D.M. Fedoseeva, O.V. Kretova, N.A. Churikov</i> .....	61
Membrane-modeling environment for cell-free production of membrane proteins: micelles of detergents, bicelles, liposomes and lipid-protein nanodisks. <i>N.F. Habibullina, E.N. Lyukmanova, Z.O. Shenkarev</i> .....	63
Microbiological synthesis of $\alpha$ -ketoglutaric acid. <i>M.N. Chiglintseva, S.V. Kamzolova, I.G. Morgunov</i> .....	65
Immunoanalytic methods for monitoring cholera toxin and heat-labile enterotoxin <i>E. coli</i> using monoclonal antibodies. <i>N.S. Shoshina, M.A. Simonova, E.E. Petrova, O.E. Lakhtina, R.L. Komaleva, T.I. Valyakina</i> .....	67
<b>The chronicle</b> <i>Events of the second half-year 2011</i> .....	69
<b>Rules for authors</b> .....	79

## К читателям

Четвертый номер за 2011 год содержит главным образом материалы X юбилейных чтений памяти академика Ю.А. Овчинникова, состоявшихся 14–17 ноября 2011 г. в Москве и Пущино. В рамках этих чтений был организован конкурс молодых ученых. Учитывая традиционное внимание к поддержке научного роста молодежи, идущее от концептуальных установок Юрия Анатольевича Овчинникова, редколлегия журнала приняла решение опубликовать часть наиболее интересных материалов данного конкурса, в том числе отмеченных премиями.

Кроме того, в номере печатается оригинальная статья А.М. Филипповой с коллегами из Ставропольского государственного университета о разработке тест-систем на основе иммобилизованных ферментов для определения пестицида паратион-метила и ионов меди, а также обзор Р.Г. Василова, посвященный перспективам развития современной медицинской биотехнологии.

По традиции приводится хроника последних событий в сфере биотехнологии и физико-химической биологии. Наконец, редколлегия журнала не могла не отреагировать на уход из жизни в ноябре 2011 года выдающегося молекулярного биолога Хар Гобинда Кораны, и поэтому помещается некролог его памяти.

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

# ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕСТИЦИДА ПАРАТИОН-МЕТИЛА И ИОНОВ МЕДИ

А.М. ФИЛИППОВА\*, С.С. АВАНЕСЯН, О.В. ВОРОБЬЕВА

ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный университет», Ставрополь

Разработан способ получения тест-систем на основе природных полимеров с иммобилизованными ферментами холинэстеразой и панкреатином. Представлены сравнительные характеристики удельной активности иммобилизованных и растворимых ферментов, данные по изменению удельной активности иммобилизованного фермента в присутствии и в отсутствие ингибиторов (паратрион-метила и  $\text{Cu}^{2+}$ ). Показано, что присутствие ингибиторов уменьшает удельную активность иммобилизованных ферментов. Полученные тест-системы с включенными ферментами легки в использовании и не обладают токсичным действием.

**Ключевые слова:** тест-системы, иммобилизация, холинэстераза, панкреатин, ингибиторы, удельная активность фермента, паратион-метил, ионы меди.

## Введение

Для повышения урожайности в сельском хозяйстве часто используются разнообразные пестициды, обладающие высокой токсичностью и избирательным действием, значительная часть которых попадает в продукты растениеводства и животноводства. Для обеспечения безопасности населения необходимо контролировать остаточные микроколичества пестицидов в продуктах питания, почве, воде.

Наиболее часто используемым пестицидом в агропромышленности является метафос (паратрион-метил) — высокотоксичный фосфорорганический пестицид, хорошо проникающий через кожу.

Одним из проявлений токсического эффекта паратион-метила служит антихолинэстеразное действие. Это приводит к накоплению ацетилхолина, который парализует проведение нервных импульсов в холинергических синапсах ЦНС, соматических нервных волокнах, синапсах двигательных нейронов, парасимпатических и некоторых симпатических нервных окончаниях. Таким образом, метафос — это яд с действием, направленным на центральную и вегетативную нервную системы.

Существенным аспектом также является проблема загрязнения окружающей среды ионами тяжелых

металлов. Это воздействие нарушает жизнедеятельность водных организмов и человека.

В качестве такого загрязнителя могут выступать сельхозугодья, регулярно обрабатываемые медьсодержащими ядохимикатами (например, бордосской жидкостью). В результате прямого окисления сульфидов меди кислородом воздуха или сульфатредуцирующими бактериями происходит загрязнение природных гидросистем токсичными ионами меди. Миграция меди в природных поверхностных и грунтовых водах связана с высокой подвижностью ее иона в сульфатных средах [4].

На сегодняшний день важным направлением в аналитической химии представляется создание тест-систем для контроля окружающей среды. При этом отличительными параметрами таких систем служат простота и удобство в применении, высокая чувствительность и надежность. Одним из перспективных методов анализа является ферментативный, с применением иммобилизованных ферментов, что обусловлено высокой чувствительностью, селективностью и мягкими условиями проведения анализа.

В работе [5] изучен процесс стабилизации препаратов ферментов бутирилхолинэстеразы, микробной карбоксилэстеразы и щелочной фосфатазы путем включения в водорастворимые полимерные пленки на основе  $\eta$ -фталилхитазана,  $\beta$ -декстрана и полиглюкина, с целью получения биосенсоров для анализа фосфорорганических инсектицидов, ионов тяжелых металлов,  $\alpha$ -аминофосфонатов и гидразониевых солей диакилдитиофосфатов в различных экспериментальных условиях. При таком типе иммобилизации ферментативная активность остается практически постоянной в течение

© 2011 г. Филиппова А.М., Аванесян С.С., Воробьева О.В.

\* **Автор для переписки:**

Филиппова Анастасия Михайловна  
инженер-лаборант кафедры биологической и медицинской химии  
ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный университет»  
355009 Ставрополь, ул. Пушкина, 1  
E-mail: nastasia.m@list.ru

полугода при использовании полиглюкина и декстрана и более года — для фталилхитозана. В работе [3] изложена технология получения биосенсора на основе бутирилхолинэстеразы, иммобилизованной в нитратцеллюлозную мембрану.

На сегодняшний день актуальной задачей является иммобилизация ферментов холинэстеразы и панкреатина в пленочные материалы на основе природных полимеров и разработка на их основе тест-систем для энзиматического (биохимического) определения фосфорорганического пестицида паратион-метила и  $\text{Cu}^{2+}$  в объектах внешней среды.

### Материалы и методы

В работе использовали фермент холинэстеразу (ацетилхолин-ацетилгидролазу, или ацетилхолинэстеразу — КФ 3.1.1.7 и ацетилхолин-ацилгидролазу, или бутирилхолинэстеразу — КФ 3.1.1.8), а также панкреатин (ОАО «Биосинтез», Россия). Анализ определения фосфорорганических пестицидов основан на количественном определении уксусной кислоты, образующейся из ацетилхолинхлорида в ферментативной реакции, катализируемой холинэстеразой, с ингибированием паратион-метилом. Уксусная кислота сдвигает рН инкубационной смеси в кислую область, что выявляется с помощью индикатора и количественно определяется колориметрическим методом. Анализ определения  $\text{Cu}^{2+}$  основан на ингибировании ферментативной реакции панкреатина, где в качестве субстрата использовался крахмал. Остаточное количество крахмала (эквивалентное  $\text{Cu}^{2+}$ ) выявляли колориметрическим методом.

Для определения активности растворимого и иммобилизованного фермента холинэстеразы нами разработан метод, основанный на использовании в качестве субстрата ацетилхолинхлорида. Суть метода состоит в следующем: к 0,1 мл раствора холинэстеразы (15 мг в 10 мл дистиллированной воды) добавляли 2 мл вероналового буферного раствора (рН 8,36) и термостатировали 60 мин. при 37 °С. Параллельно термостатировали 2%-ный водный раствор ацетилхолинхлорида, используемого в качестве субстрата. Для постановки ферментативной реакции к анализируемому раствору холинэстеразы добавляли 0,5 мл 2%-ного водного раствора ацетилхолинхлорида, смесь инкубировали в течение 60 мин. при температуре 37 °С. Ферментативную реакцию останавливали, добавляя по 0,2 мл 1%-ного водного раствора паратион-метила. В качестве контроля применяли смесь, в состав которой ингибитор вносили перед термо-

статированием. По окончании реакции в каждую пробу вносили по 2,1 мл дистиллированной воды и по 0,3 мл индикатора фенолового красного (0,02%-ный водный раствор). Выделившееся количество уксусной кислоты оценивали по малиновому окрашиванию на ФЭК-56М при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Количество выделившейся кислоты определяли по разности экстинкции контрольной и опытной пробы с учетом калибровочной кривой в координатах оптическая плотность/количество кислоты (мг).

Активность рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{1000 \times m_{\text{ук.к.-ты}}}{m_{\text{фермента}}}, \text{ мг}_{\text{ук.к.-ты}} / \text{г}_{\text{ферм.}}$$

где  $m_{\text{ук.к.-ты}}$  — масса уксусной кислоты, мг;  $m_{\text{ф}}$  — масса фермента, мг; 1000 — единица перевода мг в г.

Для определения амилазной активности растворимого и иммобилизованного фермента панкреатина применяли метод, основанный на использовании в качестве субстрата полисахарида [2]. Суть метода состоит в следующем: к 0,1 мл раствора панкреатина (0,15 мг в 100 мл дистиллированной воды) добавляли 1,6 мл фосфатного буферного раствора (рН 6,9) и термостатировали 5 мин. при 37 °С. Параллельно термостатировали 0,1%-ный раствор крахмала, используемого в качестве субстрата, в 0,9%-ном растворе хлорида натрия. Для постановки ферментативной реакции к анализируемому раствору панкреатина добавляли 1 мл 0,1%-ного раствора крахмала в 0,9%-ном растворе хлорида натрия, смесь инкубировали в течение 30 мин. при температуре 37 °С. В качестве контроля использовали смесь, в состав которой вместо раствора фермента вносили 0,2–0,6 мл 0,9%-ного раствора хлорида натрия. Ферментативную реакцию останавливали, добавляя 0,1 мл 1 М раствора соляной кислоты. Остаточное количество крахмала оценивали по сине-фиолетовому окрашиванию с раствором йода на ФЭК-56М при длине волны 670 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Количество расщепленного крахмала определяли по разности экстинкции контрольной и опытной пробы с учетом калибровочной кривой в координатах оптическая плотность/количество крахмала (мг).

Активность рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{1000 \times m_{\text{кр}}}{m_{\text{ф}}}, \text{ мг}_{\text{крах}} / \text{г}_{\text{ферм.}}$$

где  $m_{\text{кр}}$  — масса расщепленного крахмала, мг;  $m_{\text{ф}}$  — масса фермента, мг; 1000 — единица перевода мг в г.

Концентрацию ферментов в растворе определяли по методу Варбурга и Кристиана [3].

Способ получения пленок изложен в работе Андрусенко С.Ф. [1]. Холинэстеразу в структуру пленок вводили в виде раствора с концентрацией 9 мг/мл, в объеме 4 мл (в 0,9%-ном растворе хлорида натрия). Панкреатин вводили в структуру пленок в виде водного раствора с концентрацией 0,015 мг/мл, в объеме 0,1 мл.

Микрофотографии биополимерных пленок были выполнены на микроскопе марки «Renichaw Invia» с 20-кратным увеличением.

Моделирование процесса влияния различных факторов на удельную активность ферментов холинэстеразы и панкреатина проводилось с помощью программы Statistic V.8 с привлечением метода искусственных нейронных сетей (Neural Networks).

### Результаты и обсуждение

Структуры пленок с иммобилизованными ферментами представлены на рисунке 1. Аморфные области соответствуют участкам, связанным с организацией надмолекулярной структуры при внесении ферментов холинэстеразы (рис. 1Б), панкреатина (рис. 1В).

Сравнительная характеристика удельных активностей растворимых и иммобилизованных ферментов (панкреатина и холинэстеразы) и факторов, влияющих на их величину ( $\rho\text{H}$  и  $t$ ), представлены в таблице 1. При включении фермента в пленки удельная активность холинэстеразы увеличивается на 3,5%, а панкреатина — на 12,3%. Оптимум  $\rho\text{H}$  для холинэстеразы — 8,36, панкреатина — 6,9, температурный оптимум для обоих ферментов совпадает — 37 °С.

Для оптимизации факторов, влияющих на удельную активность иммобилизованного в пленки фермента холинэстеразы, применено равномерное планирование эксперимента.

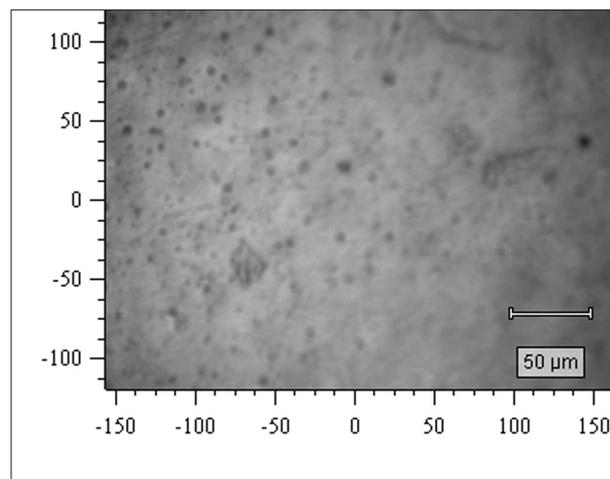
В качестве основных факторов, влияющих на скорость ферментативной реакции холинэстеразы, были выбраны следующие:

X1 — температура, °С;

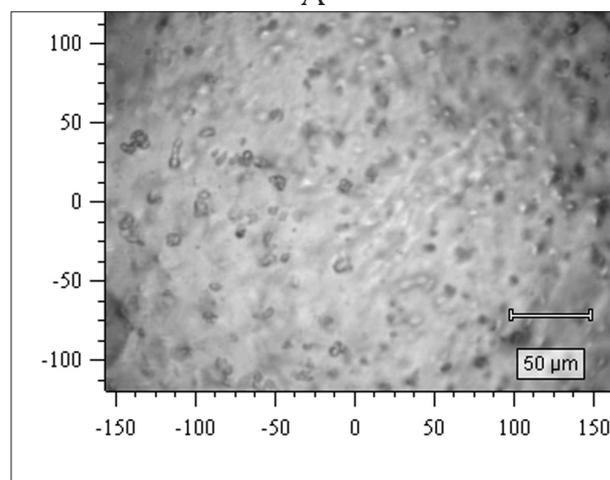
X2 —  $\rho\text{H}$  буферного раствора.

Осуществляли моделирование процесса влияния различных факторов на удельную активность фермента в соответствии с вышеуказанным методом.

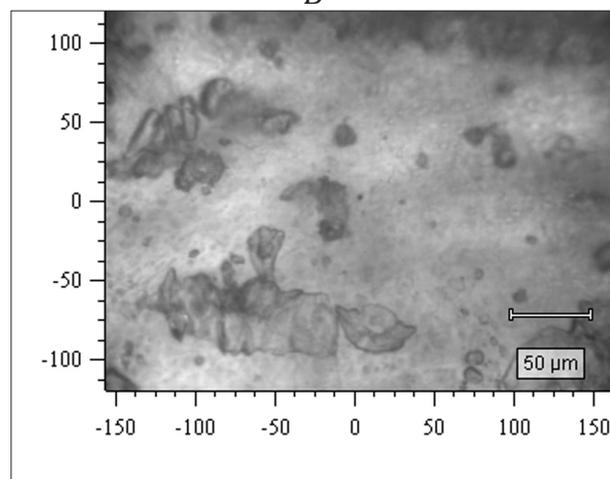
Все эти факторы совместимы и не коррелируют между собой. Пределы их изменений приведены в таблице 2.



А



Б



В

Рис. 1. А — фото пленки без фермента; Б — фото пленки с иммобилизованным ферментом холинэстеразой; В — фото пленки с иммобилизованным ферментом панкреатином

Выбор интервалов изменения факторов основывался на экспериментальных данных и корректировался с учетом образования в процессе ферментативной реакции

Таблица 1

**Оптимизация факторов, влияющих на постановку ферментативной реакции  
для растворимого и иммобилизованного ферментов холинэстеразы и панкреатина**

Состояние	Наименование	Холинэстераза			Панкреатин		
		Удельная активность, %	pH	t, °C	Удельная активность, %	pH	t, °C
Физическое состояние фермента							
Растворимый фермент		100	8,36	37	100	6,9	37
Иммобилизованный фермент		103,5	8,36	37	112,3	6,9	37

Таблица 2

**Условия проведения полного двухфакторного эксперимента**

Условия планирования	Пределы изменения	
	X1, °C	X2, ед.
Основной уровень (0)	45	10
Верхний уровень (+1)	55	11
Нижний уровень (-1)	37	8,4
Верхняя «звездная точка» (+1,682)	60	12
Нижняя «звездная точка» (-1,682)	25	7,5

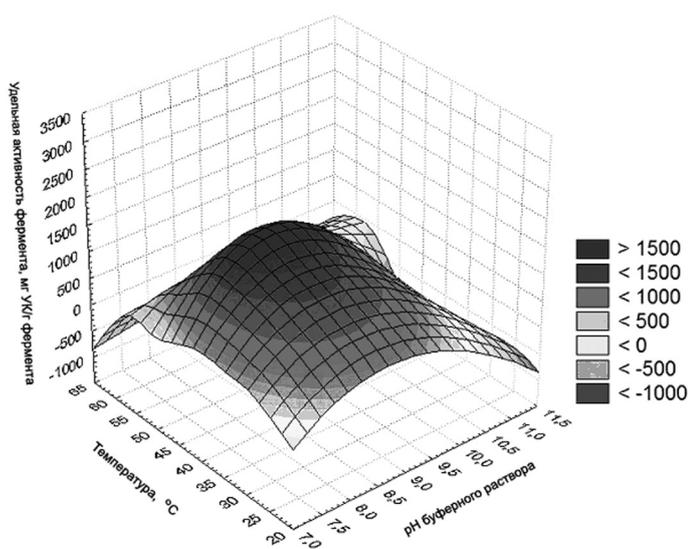


Рис. 2. Динамика изменения удельной активности иммобилизованной в пленки холинэстеразы от температуры и pH

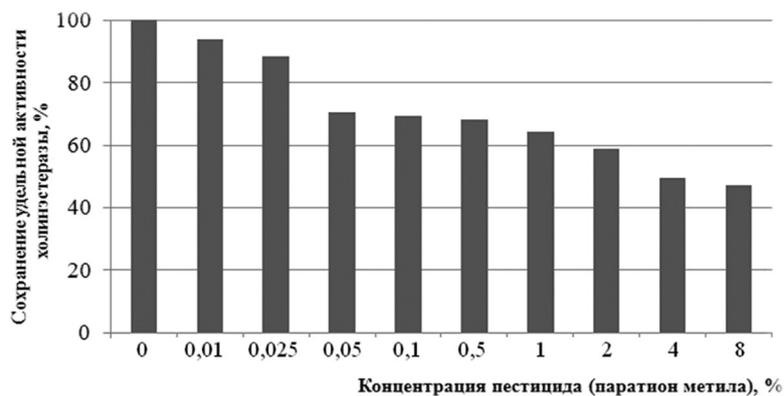


Рис. 3. Влияние количества пестицида (паратин-метил) на сохранение удельной активности холинэстеразы

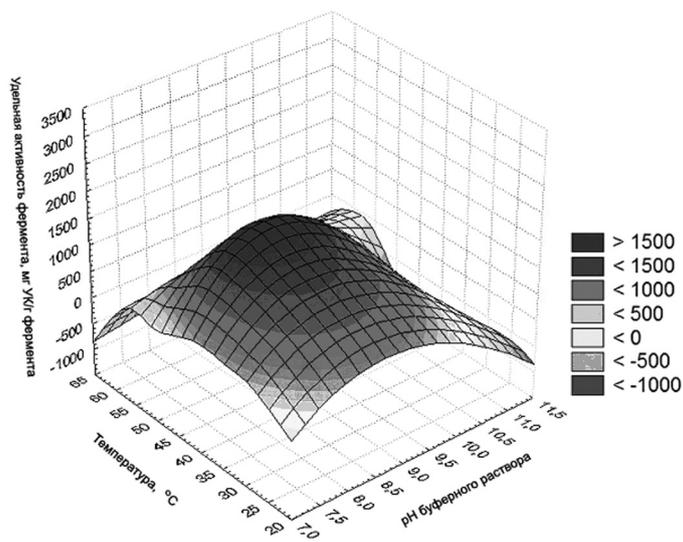


Рис. 4. Динамика изменения удельной активности иммобилизованного в пленки панкреатина от температуры и рН в присутствии  $\text{Cu}^{2+}$

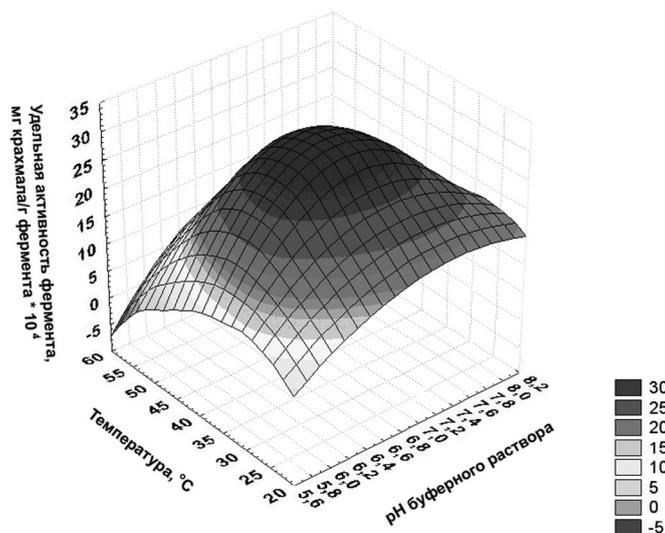


Рис. 5. Динамика изменения удельной активности иммобилизованного в пленки панкреатина от температуры и рН в отсутствие  $\text{Cu}^{2+}$

уксусной кислоты. Критерием оптимизации являлась удельная активность фермента холинэстеразы (мгУК/г фермента).

На рисунке 2 показана поверхность отклика, которая характеризует зависимость величины активности холинэстеразы (Y) от заданных параметров (X1, X2).

Нами исследовано влияние концентрации ингибитора на активность иммобилизованной холинэстеразы, данные представлены на рисунке 3.

Также были оптимизированы факторы, влияющие на удельную активность иммобилизованного в пленки панкреатина, в присутствии и в отсутствие  $\text{Cu}^{2+}$  (рис. 4 и 5).

Из данных видно, что наличие ионов меди в анализируемом растворе уменьшает активность панкреатина в 2 раза. Полученные результаты могут быть использованы для разработки тест-систем на основе иммобилизованного панкреатина для обнаружения  $\text{Cu}^{2+}$ .

### Заключение

Полученные тест-системы с иммобилизованным ферментом панкреатином отличаются простотой исполнения, недорогими, легкодоступными и безвредными реагентами.

Количество меди, используемое в анализе, соответствует предельно допустимой концентрации (ПДК)

меди в объектах внешней среды. По сравнению с ГОСТ методом в разработанном методе обнаружению меди не мешают ионы железа и висмута; в анализе необходим меньший объем пробы, меньшее количество реактивов.

### Литература

1. Андрусенко С.Ф., Воробьева О.В., Филь А.А., Волосова Е.В., Аванесян С.С., Иванова А.М., Каданова А.А. Пленка для «авоськи». Природные полимеры помогут синтезировать биоразлагаемые материалы // Экология и жизнь. — 2009. — № 10. — С. 30–33.
2. Воробьева О.В., Иванова А.М., Аванесян С.С., Волосова Е.В., Андрусенко С.Ф., Каданова А.А. Получение ферментативных пленочных материалов на основе природных полисахаридов // Известия высших учебных заведений. Сер. Химия и химическая технология. — 2011. — Т. 54. — № 1. — С. 71–75.
3. Ильичева Н.Ю., Бейлинсон Р.М., Медянцева Э.П., Будников Г.К., Ванягина О.Н. Холинэстеразные биосенсоры для определения гербицида пропанаила // Вестник Московского университета. Сер. 2. Химия. — 2002. — Т. 43. — № 6. — С. 409–413.
4. Патент РФ № 2182131, C02F1/62, C02F1/28. Способ локализации техногенной меди.
5. Стойкова Е.Е. Экспресс-определение загрязнителей окружающей среды с помощью ферментативных колориметрических тестов. Автореф. дисс. канд. хим. наук. — Казань, 1997. — 18 с.

## TEST SYSTEMS BASED ON IMMOBILIZED ENZYMES FOR THE DETERMINATION OF THE PESTICIDE PARATHION-METHYL AND COPPER IONS

A.M. FILIPPOVA, S.S. AVANESYAN, O.V. VOROBYEVA

*FGBOU VPO «Stavropol State University», Stavropol*

A method for producing test systems based on natural polymers with immobilized enzyme cholinesterase, and pancreatin. The comparative characteristics of the specific activity of immobilized and soluble enzymes, data on changes in the specific activity of the immobilized enzyme in the presence and absence of inhibitors (parathion-methyl, and  $\text{Cu}^{2+}$ ) are presented. It is shown that the presence of inhibitors reduces the specific activity of immobilized enzymes. The resulting test systems with included enzymes are easy to use and do not have a toxic effect.

*Keywords:* test systems, immobilization, cholinesterase, pancreatin, inhibitors, the specific activity of the enzyme parathion-methyl, copper ions.

## ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ СОВРЕМЕННОЙ МЕДИЦИНСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Р.Г. ВАСИЛОВ\*

*Институт биоэкономики Российского экономического университета им. Г.В. Плеханова,  
Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Москва*

Представлен обзор тенденций в развитии современной медицинской биотехнологии. Проводится сравнение зарубежных и отечественных подходов в данной области. Анализируются перспективы развития биофармацевтики и биомедицины. Отдельно обсуждается проблема персонализированной медицины.

*Ключевые слова:* медицинская биотехнология, биофармацевтика, биоматериалы, персонализированная медицина.

Биотехнология является ведущим научно-практическим направлением XXI века, которое интегрирует достижения различных дисциплин и технологий с целью создания биотехнологических продуктов для разных отраслей экономики.

К 2030 году биотехнология обеспечит в развитых странах:

- 35% химической промышленности,
- 80% медицинских препаратов,
- 50% сельскохозяйственного производства,
- 2,7% ВВП развитых стран.

Для развивающихся стран вклад биотехнологии будет еще больше.

Выдающиеся достижения молекулярной биологии XX столетия, в особенности геномные и постгеномные технологии, привели к созданию системной и синтетической биологии. Общая схема системного подхода в биологии сводится к объединению следующих двух главных блоков: компьютеризированная биология (исследование модельных систем, исследование систем млекопитающих, улучшение здоровья человека) и информатика (блок геномики, блок протеомики, блок изображений, блок микрожидкостей).

Системная биология послужила базой для инициации принципиально нового направления в медицине — так называемой персонализированной медицины. Основа-

телем персонализированной медицины (или медицины «P4») является американский исследователь Лерой Худ. Он работал в Институте системной биологии (США), участвовал в формировании четырех парадигм, изменивших биологию и приведших к созданию медицины P4. К этим парадигмам относятся:

- внедрение инженерии в биологию (высокопроизводительная биология);
- реализация проекта «Геном человека»;
- междисциплинарная биология;
- системная биология.

Медицина P4 означает собой медицину, основанную на четырех механизмах:

- Predictive — «Предсказательная»;
- Personalized — «Персонализированная»;
- Preventive — «Профилактическая»;
- Participatory — «Совместная, в том числе с участием пациентов».

Предсказательная медицина создает вероятностный прогноз здоровья (по ДНК-последовательности); мультипараметрическое измерение белков крови два раза в год; *in vivo* определение («визуализация») молекул.

Персонализированная медицина предоставляет уникальный генетический паспорт для индивидуального лечения; обеспечивает длительный контроль пациента; по каждому индивидуальная информация — гигабайты информации, общая информация на 100 млн. пациентов с гигабайтами индивидуальной информации.

Профилактическая медицина позволяет определять дизайн лечебных и профилактических препаратов с помощью системного подхода; системный подход к вакцинам служит для предотвращения инфекционных

© 2011 г. Василев Р.Г.

\* Адрес для переписки:

Василов Раиф Гаянович  
профессор, президент Общества биотехнологов России  
им. Ю.А. Овчинникова  
Тел.: +7 (495) 648-09-13  
E-mail: raifvasilov@mail.ru

заболеваний; при этом обеспечивается оценка состояния здоровья.

Совместная медицина, в том числе с участием пациента («participatory»), дает возможность больному участвовать в процессе лечения; это требует переобучения врачей, сформировавшихся до появления медицины Р4; медицинское сообщество взаимосвязано и руководствуется едиными образовательными программами; информационные технологии в здравоохранении позволяют обслуживать миллиарды пациентов (объем информации у каждого — гигабайты).

Российский исследователь В.С. Баранов (Санкт-Петербург) при обсуждении персонализированной (предиктивной) медицины выделяет следующие проблемы: 1) достоверность результатов генетического тестирования наследственной предрасположенности; 2) выявление всех главных генов, ассоциированных с конкретным сочетанным (мультифакторным) заболеванием; 3) адекватная интерпретация результатов генетического тестирования для лечащих врачей. Для решения указанных проблем служат нижеперечисленные методы. Так, внедрение метода полногеномного скрининга ассоциаций (Genome Wide Association Studies — GWAS) позволит в значительной мере решить первые две проблемы, а решение третьей в большей степени зависит от реализации общей программы повышения квалификации медицинского персонала в сфере высоких технологий, улучшения его образовательного уровня в целом. За рубежом активно ведутся исследования по интеграции генетической и клинической информации. Создаются специализированные центры: NCBI — National Center Biotechnological Information, European Bioinformatic Institute. Осуществляются целевые программы: Human Variome Project (HVP), Collaboration, Education & Test Translation (CETT) — [www.cettprogram.org](http://www.cettprogram.org). Формируются соответствующие базы данных: LSD — Locus Specific Databases. Функционируют сайты: United Kingdom Genetic Testing Network — [www.ukgt.nhs.uk](http://www.ukgt.nhs.uk); ВОЗ — [www.who.int/genomics/en](http://www.who.int/genomics/en). Разрабатываются компьютерные программы для оценки результатов генетического тестирования (ГТ). Готовятся также соответствующие кадры, способные истолковывать результаты ГТ.

Особенно следует подчеркнуть возможности разработанного метода генетического тестирования GWAS, который позволяет строить карты генов, связанных с заболеваниями (открывается возможность демонстрировать связи с сотнями заболеваний).

Важным направлением в контексте обсуждаемой проблемы является этногеномика. В России наиболее

широкие исследования в этом направлении проведены Э.К. Хуснутдиновой (Уфа). Она видит перспективы развития этногеномики в России в следующих аспектах:

- Каталогизация генетического разнообразия (маркеры/популяции).
- Детальный анализ региональных генофондов (изучение эволюции, происхождения, миграции).
- Уточнение глобальной картины, полученной по мтДНК, Y хромосоме и с помощью полных геномов.
- Изучение роли естественного отбора в формировании и структуризации генетического разнообразия человека.
- Молекулярная эпидемиология: географическое распределение генетической варибельности, связанной с распространенными болезнями. GWAS и ресеквенирование в разных популяциях.
- Оценка индивидуального предка популяций.
- Фармакогеномика и индивидуальная медицина.
- ДНК-идентификация. Создание Биобанков и Баз данных.

Конец XX столетия ознаменовался выдающимся событием — расшифровкой полного генома человека. В наступившем XXI веке такая линия на определение геномов была продолжена. Хронология определения персональных геномов выстраивается так (подборка сделана В.П. Пузыревым, Томск):

- 2007 октябрь (9 мая 2007), Крейг Вентер (м), стоимость — \$10 млн.;
- 2008 апрель (3 декабря 2007), Джеймс Дьюи Уотсон (м), \$2 млн.;
- 2008 ноябрь (28 мая 2008), Евро-американка с острой миелоидной лейкемией (ж), \$1 млн.;
- 2008 ноябрь (24 июня 2008), йоруба (NA18507) (м), \$250000;
- 2008 ноябрь (21 августа 2008), китаец (Yanhuang, YH) (м), \$500000;
- 2009 май (3 февраля 2009), кореец Seong-Jin Kim, SJK (м);
- 2009 июнь (1 февраля 2009), йоруба (NA18507) (м);
- 2009 август (6 марта 2009), Кореец, AK1 (м);
- 2009 август (10 июня 2009), Европеоид США, PO (м), Сиквенс с 1 молекулы \$48,000;
- 2009 декабрь, Русский, рак почки (м);
- 2010 январь (3 сентября 2009), Европеоид (NA07022) (м), \$8000;
- 2010 январь (3 сентября 2009), Йоруба (NA19240) (ж), \$3400;

- 2010 январь (3 сентября 2009), Европеонид (NA20431) (м), \$1700;
- 2010 февраль (30 ноября 2009), Палео-эскимос, Saqqaq, Древняя ДНК (4000 лет).

Представляет интерес в этом ряду геном первооткрывателя двойной спирали ДНК Джеймса Уотсона (согласно сообщению Science Daily; см. информацию: <http://lenta.ru/news/2007/06/01/watson/index.htm>). Компании 454 Life Sciences и BSM Human Genome Sequencing Center в 2007 году расшифровали геном лауреата Нобелевской премии Джеймса Уотсона, первооткрывателя структуры молекулы ДНК (совместно с покойным Френсисом Криком) и вручили ему DVD-диск с записью этой информации. Компания 454 Life Sciences проводила секвенирование с помощью полимеразной цепной реакции, а Центр по секвенированию генома человека BSM отвечал за контроль качества работы и выявление в полученном массиве информации генов с известной функцией, ответственных за различные патологические состояния. В геноме 79-летнего (на то время) ученого обнаружен ряд отклонений, в частности, известная мутация, вызывающая рак кожи. Уотсон приветствовал работу этих фирм и был намерен передать полученную информацию для открытой публикации в Интернете, в базе данных GenBank. Обе компании сделали подарок в честь признания его вклада в молекулярную генетику. Работа по расшифровке генома Дж. Уотсона заняла 2 месяца и обошлась в 1 млн. долларов. Для сравнения: для первой расшифровки генома Homo sapiens потребовалось 13 лет (1990–2003 гг.), в ней участвовали государственные и частные научные центры; на эти исследования было истрачено 400 млн. долларов.

Большинством специалистов перспективы развития медицины «Р4» оцениваются таким образом:

- Медицина Р4 является медициной настоящего и будущего.
- Медицина Р4 является скорее революционной, чем эволюционной, поскольку медицина становится информационной наукой. Будут созданы базы данных с миллиардами байт на каждого индивидуума.
- Медицина Р4 будет преобразовывать медицинскую промышленность.
- Медицина Р4 будет эффективной и недорогой.
- Необходима реализация пилотных проектов на людях с информационной поддержкой, чтобы убедить скептиков.
- Требуется перестройка стратегических подходов руководящих органов здравоохранения к формированию медицины будущего.

Кроме описанной медицины будущего, основанной на прогрессе биотехнологии и молекулярной биологии, медицинская биотехнология содержит еще два главных раздела:

- Биофармацевтика (генно-инженерные препараты, иммунобиологические препараты, диагностикумы, антибиотики, биологически активные вещества и др.).
- Биомедицина (клеточные технологии, биочипы, биосенсоры, биокомпьютеры и др.).

Ниже будут рассмотрены в основном проблемы биофармацевтики. Мировой фармацевтический рынок в 2008 году составил более 750 млрд. долларов. Россия значительно уступает другим странам по производству биотехнологических лекарств, хотя доля биотехнологических препаратов в структуре лекарственных средств, потребляемых в Российской Федерации, соответствует аналогичной для мирового рынка.

В 2008 году Северная Америка занимала 41% мирового фармацевтического рынка, Европа – 27%, Япония – 11%, остальные государства – 8%, развивающиеся страны – 13%. Согласно прогнозам, ожидается значительный рост производства биотехнологических препаратов в Китае, Индии, Бразилии и других странах.

Потребление лекарств на душу населения, по данным 2008 г., наиболее высокое в США (\$1018,2), высокое – во Франции, Японии, Германии, наиболее низкое – в России (\$119,9) и Китае (\$27,6) (источник: Business Monitor International).

С целью устранения отставания РФ в производстве лекарственных препаратов, в том числе биотехнологических, разработана «Стратегия Фарма-2020», основными задачами которой являются:

- увеличить к 2020 году долю отечественных лекарственных средств до 50% в денежном выражении;
- увеличить долю предприятий, соответствующих правилам GMP, до 100%;
- увеличить долю экспорта в общем объеме производства до 20%.

В рамках указанной стратегии важное место отводится технологическим платформам как инструменту развития биотехнологии, которые будут разрабатывать вопросы, связанные с биоиндустрией и биоресурсами, биоэнергетикой, медициной будущего. Сейчас разработана дорожная карта развития «красной» биотехнологии (биофармацевтики) в РФ до 2020 года, в которой предусматривается 30%-ная доля биофармацевтики к 2020 году.

В настоящее время к лучшим отечественным производителям относится 10 фирм: Микроген (13,08%), Отечественные лекарства (11,86%), Фармстандарт (9,10%), Верофарм (5,81%), Фарм-Центр (5,49%), Нижфарм (4,98%), Макиз-Фарма (4,49%), Материя Медика (3,91%), Акрихин (3,51%), Сотекс (3,43%).

Следует отметить, что несмотря на общее отставание в производстве отечественных биофармпрепаратов достигнуты определенные позитивные результаты. Так, например, академиком А.И. Мирошниковым (Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН) налажено получение первого отечественного генно-инженерного инсулина человека. Это исследование является примером реальной интеграции академической науки и производства, когда все — от идеи до серийного препарата — сосредоточено в одних руках.

В результате опытное биотехнологическое производство ИБХ РАН наладило выпуск препаратов инсулина — «Инсуран Р» и «Инсуран НПХ», что имеет большое импортозамещающее значение в условиях абсолютной монополизации инсулинового производства иностранными компаниями. В коллективе, руководимом А.И. Мирошниковым, разработана технология получения отечественного генно-инженерного гормона роста (препарат «Растан»).

Получены также штаммы-продуценты ряда важных лекарственных препаратов белково-пептидной природы. В его лаборатории ведутся поисковые исследования по разработке технологий получения актуальных противовирусных и противораковых препаратов на основе модифицированных нуклеотидов.

Свою нишу заняли отечественные производители пептидных препаратов: речь идет о ООО «Пептос Фарма», которое создало и вывело на рынок ряд востребованных биофармацевтических средств: Тимоген, Седатин, Тимодепрессин, Стемокин.

К числу реальных успехов отечественной биофармацевтики необходимо отнести использование бактериофагов. Это направление имеет большие перспективы:

- Фаготерапия представляет собой одно из перспективных направлений для практического здравоохранения.
- Бактериофаги высокоспецифичны при лечении инфекций, не подавляют нормальную микрофлору и не нарушают естественный баланс внутренней среды организма, то есть фаготерапия является этиотропной, специфической.

- Бактериофаги не имеют противопоказаний к применению: их можно назначать беременным, кормящим матерям и детям любого возраста, включая недоношенных.
- Бактериофаги не вызывают развития резистентности микроорганизмов;
- Бактериофаги оказывают стимулирующее влияние на гуморальное и клеточное звенья иммунитета.
- Бактериофаги не обладают токсическим, аллергическим и тератогенным эффектами.
- Бактериофаги эффективны в монотерапии, но также могут применяться в комбинации с другими препаратами, в том числе с антибиотиками и пробиотиками.

Развитие биотехнологии может иметь существенное значение и для медицинской реабилитации. В этом плане могут быть наиболее востребованы такие линии развития:

- донозологическая диагностика (биочипы, ИФА, ПЦР, RAST и др.);
- выявление полиморбидной (сочетанной) патологии;
- оценка и прогнозирование реабилитационного потенциала;
- третичная профилактика (борьба с хронизацией и рецидивами заболеваний);
- использование новых генно-инженерных препаратов для лечения и профилактики (вакцины, моноклональные антитела и др.).

Хотелось бы в заключение упомянуть слова Н.И. Пирогова: «Будущее принадлежит медицине предохранительной ...». Эти слова, сказанные им в XIX веке, свидетельствуют, что Россия уже давно приступила к созданию медицины XXI века — медицины «Р4». Так что одно из четырех «Р» уже обозначено, и теперь предстоит заняться остальными тремя «Р». Этап «Participatory», по-видимому, можно преодолеть сравнительно легко (объединить пациента, семью и врача — это давняя мечта всех участников медицинского процесса). Остаются два самых трудных «Р» — персонализированная и предиктивная (предсказательная) медицина. Оба этих раздела целиком связаны с широкомасштабным внедрением геномных и постгеномных технологий, включая протеомику, метаболомику, биоинформатику и т.д.

В целом следует заключить, что у медицинской биотехнологии большое будущее, поскольку последние достижения постгеномных технологий фактически революционизируют методические возможности как теоретической, так и практической медицины.

## **PROSPECTS FOR THE DEVELOPMENT OF MODERN MEDICAL BIOTECHNOLOGY**

R.G. VASILOV

*Bioeconomy Institute, Plekhanov Russian University of Economics,  
Ju.A. Ovchinnikov Russian Biotechnology Society, Moscow*

A review of current trends in the development of modern medical biotechnology. A comparison of foreign and domestic approaches in this field. Analyzes the prospects of biopharmaceuticals and biomedicine. Separately, we discuss the problem of personalized medicine.

*Keywords:* medical biotechnology, biopharmaceutics, biomaterials, personalized medicine.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА СОВМЕСТНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА-УБИЙЦЫ HSVtk И ИММУНОМОДУЛЯТОРА GM-CSF В КЛЕТКАХ ОПУХОЛИ

И.В. АЛЕКСЕЕНКО\*, Т.В. ВИНОГРАДОВА, Е.П. КОПАНЦЕВ, Е.Д. СВЕРДЛОВ

Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Показано, что бидистронные экспрессионные конструкции, несущие под контролем одного промотора ген-убийцу HSVtk и ген цитокина GM-CSF, обладают значительным противоопухолевым потенциалом и могут быть использованы в качестве основы генно-терапевтических препаратов для лечения онкологических заболеваний.

*Ключевые слова:* гены HSVtk и GM-CSF, бидистронные экспрессионные конструкции, опухоли, генотерапия.

В настоящее время рак представляет собой наиболее серьезную проблему медицины. Среди различных генно-терапевтических стратегий уничтожения раковых клеток одним из универсальных является подход с использованием генов-убийц.

Ген-убийца тимидинкиназа вируса простого герпеса (HSVtk) способен превращать нуклеозидный аналог ганцикловир (GCV) в токсичные метаболиты, что приводит к подавлению синтеза ДНК в опухолевых клетках и их гибели. Эффективность терапии онкологических заболеваний с помощью генов-убийц может быть повышена за счет стимуляции противоопухолевого иммунного ответа.

Среди множества цитокинов наиболее эффективным представляется гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), способный стимулировать рост, созревание, дифференцировку гранулоцитов и антиген-представляющих клеток, обеспечивая индукцию иммунного ответа.

В нашей работе были получены и протестированы экспрессионные конструкции, содержащие гены HSVtk и GM-CSF, под контролем промотора цитомегаловируса

как по отдельности, так и в составе одной конструкции. Для оценки терапевтического потенциала полученных конструкций были проведены эксперименты *ex vivo* на животных. Мышам линии C57BL/6 были трансплантированы клетки карциномы Льюис; трансформированные полученными конструкциями, далее в течение 10 дней животные получали раствор GCV или фосфатный буфер (PBS). Определение размера развившейся опухоли проводили в течение 60 дней эксперимента.

У животных, получивших систему HSVtk-GM-CSF/GCV, не было обнаружено признаков развития опухоли на конец эксперимента; при этом в группе животных, получавших систему HSVtk/GCV, 10% особей имели опухоль. В группе, получавшей систему HSVtk-GM-CSF/PBS, 50% мышей не имели опухоли на момент окончания эксперимента; при этом у всех животных, получавших HSVtk/PBS, наблюдалось быстрое развитие опухоли.

Таким образом, нами было выявлено, что бидистронные экспрессионные конструкции, несущие под контролем одного промотора ген-убийцу HSVtk и ген цитокина GM-CSF, обладают значительным противоопухолевым потенциалом и могут быть использованы в качестве основы генно-терапевтических препаратов для лечения онкологических заболеваний.

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

© 2011 г. Алексеенко И.В., Виноградова Т.В., Копанцев Е.П., Свердлов Е.Д.

\* Автор для переписки:

Алексеенко Ирина Васильевна, мл.н.с.,  
Учреждение Российской академии наук  
Институт биоорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10  
Тел.: +7 (495) 330 69 92  
E-mail: irina.alekseenko@mail.ru

---

**INVESTIGATION OF THE THERAPEUTIC EFFECT  
OF A JOINT EXPRESSION OF THE GENE-KILLER HSVtk  
AND IMMUNOMODULATOR GM-CSF IN TUMOR CELLS**

I.V. ALEKSEENKO, T.V. VINOGRADOVA, E.P. KOPANTSEV, E.D. SVERDLOV

*M.M. Shemyakin and Ju.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*

It is shown that bicistron expression design, carrying under the control of a promoter gene-killer *HSVtk* and gene cytokine *GM-CSF*, have significant antitumor potential and can be used as a basis for gene therapy treatments for cancer.

*Keywords:* genes *HSVtk* and *GM-CSF*, bicistronic expression vectors, tumor gene therapy.

## ПОЛУЧЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ПРИРОДНОГО МИКРОЦИНА С В СИСТЕМЕ IN VITRO

О.Б. БАНТЫШ\*, К.В. СЕВЕРИНОВ

Учреждение Российской академии наук Институт биологии гена РАН, Москва

Авторами получен рекомбинантный белок МссВ, обладающий ферментативной активностью. В системе *in vitro* выделенный фермент модифицировал синтетический аналог пептида дикого типа МссА (MRTGNAN), навешивая остаток АМФ на его С-конец. Образовавшийся продукт ингибировал рост клеток *E. coli*, аналогично природному микроцину С. Рекомбинантный белок МссВ способен аденилировать пептиды различной длины, а метионин в первом положении МссА, по-видимому, необходим для проникновения микроцина С и его аналогов в клетку через транспортер YejABEF, но не играет ключевой роли в узнавании пептида ферментом МссВ.

*Ключевые слова:* природный микроцин С, синтетические аналоги, система *in vitro*.

Микроцин С — антибиотик, продуцируемый некоторыми штаммами кишечной палочки и активный против многих энтеробактерий. Зрелый микроцин С представляет собой N-формилированный линейный гептапептид, соединенный с остатком АМФ через N-ацилфосфоамидную связь, расположенную между фосфатом нуклеотида и  $\alpha$ -карбоксильной группой С-концевого аспартата. К фосфату АМФ, в свою очередь, присоединена пропиламидная группа. Микроцин С действует по механизму «троянского коня». Он проникает в клетку за счет сигнальной пептидной части через транспортер YejABEF, расположенный на внутренней мембране энтеробактерий, затем пептидная часть антибиотика процессируется под действием олигопептидаз. В результате высвобождается негидролизуемый аналог аспартил-аденилата, ингибирующий аспартил-тРНК синтетазу и останавливающий трансляцию в клетке.

Гены, ответственные за созревание и устойчивость клетки-продуцента к микроцину С, организованы в оперон *mssABCDE* и транскрибируются с общего промотора. Ген *mssA* кодирует гептапептид-предшественник зрелого микроцина; ген *mssB* кодирует фермент, присоединяющий АМФ к гептапептиду.

Нами получен рекомбинантный белок МссВ, обладающий ферментативной активностью. В системе *in vitro* выделенный фермент модифицировал синтетический аналог пептида дикого типа МссА (MRTGNAN), навешивая остаток АМФ на его С-конец. Образовавшийся продукт ингибировал рост клеток *E. coli*, аналогично природному микроцину С.

На основе опубликованных кристаллографических структур комплекса фермента МссВ с пептидом МссА мы предсказали пептиды, которые могут узнаваться ферментом МссВ, аналогично пептиду дикого типа. Субстратные свойства таких предсказанных пептидов были протестированы в системе *in vitro*. Пептиды GMRTGNAN, GGMRTGNAN, GGGMRTGNAN, GGGGGMRTGNAN, GGGGGRTGNAN, FRTGNAN узнавались и модифицировались ферментом. При этом антибактериальной активностью по отношению к клеткам *E. coli* обладали только продукты модификации GGMRTGNAN, GGMRTGNAN и GGGGGMRTGNAN.

Таким образом, МссВ способен аденилировать пептиды различной длины, а метионин в первом положении МссА, по-видимому, необходим для проникновения микроцина С и его аналогов в клетку через транспортер YejABEF, но не играет ключевой роли в узнавании пептида ферментом МссВ.

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

© 2011 г. Бантыш О.Б., Северинов К.В.

\* **Автор для переписки:**

Бантыш Ольга Борисовна, аспирант,  
Учреждение Российской академии наук  
Институт биологии гена РАН  
119334 Москва, ул. Вавилова, 34/5  
Тел.: +7 (499) 135-34-97  
E-mail: biobantik@yandex.com

---

## PREPARATION OF SYNTHETIC ANALOGUES OF NATURAL MICROCIN C WITH IN THE IN VITRO SYSTEM

O.B. BANTYSH, K.V. SEVERINOV

*Institute of Gene Biology RAS, Moscow*

The authors have produced a recombinant protein MccB, which has enzymatic activity. In the in vitro system isolated enzyme modified synthetic analogue of the wild-type peptide MccA (MRTGNAN), hanging residue AMP on its C-terminus. The resulting product inhibited the growth of cells *E. coli*, similar to the natural microcin C. The recombinant protein MccB is capable to perform adenylation peptides of different lengths, and methionine in the first position MccA, apparently, is essential for the penetration of microcin C and its analogues into the cell through the transporter YejABEF, but does not play a key role in the recognition of peptide by the enzyme MccB.

*Keywords:* natural microcin C, synthetic analogues, in vitro system.

## ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ СУБСТРАТ ФОСФОЛИПАЗЫ A2

И.А. БОЛДЫРЕВ\*, А.С. АЛЕКСЕЕВА, Ю.Г. МОЛОТКОВСКИЙ, Е.Л. ВОДОВОЗОВА

*Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

Авторами синтезирован новый флуоресцентный субстрат и разработана мицеллярная матрица, которая позволяет нужным образом сориентировать в пространстве флуорофор и тушитель. Испытания с контрольными образцами фосфолипазы A2 из пчелиного яда и с образцами плазмы крови человека показали достоверный уровень определения крайне малых (0,004 ед.) количеств фермента.

*Ключевые слова:* фосфолипаза A2, флуоресцентный субстрат.

Мониторинг активности секреторной фосфолипазы A2 (PLA2) особенно актуален для пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Для определения активности этого фермента используются флуоресцентные фосфолипидные зонды, содержащие одновременно и флуорофор, и специфический тушитель его флуоресценции.

При этом флуорофор прикрепляется к одной ацильной цепи, а тушитель — к другой. Эффективность тушения флуоресценции зависит от расстояния между флуорофором и тушителем, их спектральных свойств и взаимной ориентации.

При расщеплении зонда PLA2 флуорофор и тушитель отдаляются друг от друга, и флуоресценция возрастает. Это позволяет определять наличие PLA2 и измерять ее активность. Чем ниже фоновый уровень флуоресценции и чем ярче она разгорается, тем чувствительнее оказывается зонд.

Для повышения чувствительности зондов стараются располагать флуорофор и тушитель как можно ближе друг к другу (на как можно более коротких ацильных цепях). Однако, если ацильные цепи будут слишком короткими, то флуоресцентный субстрат может потерять сродство к PLA2.

Изучая поведение ряда зондов в фосфолипидной мембране, мы обнаружили, что некоторые ароматические молекулы можно расположить параллельно поверхности мембраны. Тогда становится возможным применить зонд, у которого и флуорофор, и тушитель в мембране будут располагаться так, что их дипольные моменты перехода окажутся параллельны друг другу. В этом случае эффективность тушения флуоресценции будет существенно выше.

Используя этот принцип, мы синтезировали новый флуоресцентный субстрат и разработали мицеллярную матрицу, которая позволяет нужным образом сориентировать в пространстве флуорофор и тушитель. При этом оба хромофора прикреплены к концам длинных (11 и 13 атомов C, соответственно) ацильных цепей. В отсутствие матрицы тушение флуоресценции незначительное. Однако при нахождении зонда в фосфолипидной мицеллярной системе флуоресценция оказывается практически полностью затупленной. Испытания с контрольными образцами PLA2 из пчелиного яда и с образцами плазмы крови человека показали достоверный уровень определения крайне малых (0,004 ед.) количеств фермента.

Разработанная система позволит создать доступный для клинических исследований диагностический набор для определения активности секреторной PLA2.

*Работа поддержана грантом правительства Москвы (договор № 218/10-АХТ-М).*

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

*Автор И.А. Болдырев отмечен премией.*

© 2011 г. Болдырев И.А., Алексеева А.С., Молотковский Ю.Г., Водовозова Е.Л.

\* **Автор для переписки:**

Болдырев Иван Александрович, н.с., к.х.н.,  
Учреждение Российской академии наук  
Институт биоорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10  
Тел.: +7 (926) 224-68-06  
E-mail: ivan@lipids.ibch.ru

---

## THE FLUORESCENT SUBSTRATE OF PHOSPHOLIPASE A2

I.A. BOLDYREV, A.S. ALEXEEVA, Ju.G. MOLOTKOVSKY, E.L. VODOVOZOVA

*M.M. Shemyakin and Ju.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*

The authors synthesized a new fluorescent substrate and developed a micellar matrix, which allows good way to orient in space fluorophore and quencher. Tests with control samples of bee venom phospholipase A2, and with samples of human plasma showed reliable detection level of extremely low amounts of the enzyme (0.004 units).

*Keywords:* phospholipase A2, a fluorescent substrate.

## ЯД ПАУКОВ – ИСТОЧНИК ПЕПТИДНЫХ АНАЛЬГЕТИКОВ

А.А. ВАСИЛЕВСКИЙ\*, Ю.В. КОРОЛЬКОВА, И.В. МОШАРОВА, Е.В. ГРИШИН

Учреждение Российской академии наук Института биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Скрининг коллекции ядов, имеющейся в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов Института биоорганической химии РАН, позволил выявить активность в отношении пуринаргических P2X рецепторов сенсорных нейронов млекопитающих — одного из важных классов болевых рецепторов. Новое семейство пептидов из яда пауков вызывает большой интерес с точки зрения создания на их основе эффективных анальгетиков.

*Ключевые слова:* яд пауков, пептиды, анальгезирующий эффект.

Среди важных проблем современной медицины особое место занимает внедрение в клиническую практику новых обезболивающих средств. В развитых странах жалобы на боль являются одной из наиболее частых причин обращения людей за врачебной помощью. При этом доступные на рынке анальгетики характеризуются множеством недостатков, таких как отсутствие специфического действия на систему восприятия боли. Некоторые токсины из животных ядов в настоящее время рутинно используются в нейробиологии в качестве точнейших инструментов исследования, поскольку специфично модифицируют функцию определенных рецепторов нейронов. Мы предположили, что яд пауков, ввиду поразительного разнообразия компонентного состава, может служить источником веществ, селективно воздействующих на болевые рецепторы.

Скрининг коллекции ядов, имеющейся в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, позволил выявить активность в отношении пуринаргических P2X рецепторов сенсорных нейронов млекопитающих — одного из важных классов болевых рецепторов. Из яда нескольких европейских и среднеазиатских пауков нами были вы-

делены гомологичные пептиды, составляющие семейство «пуротоксинов». Эти пептиды состоят из 30–40 аминокислотных остатков и содержат 3–4 S-S-мостика.

Рекомбинантные пуротоксины были получены от *Escherichia coli* и использованы затем в различных структурных и функциональных исследованиях. Пространственная структура пуротоксина-1 (PT1) из яда паука-«волка» *Geolycosa sp. (Lycosidae)* была исследована в лаборатории биомолекулярной ЯМР спектроскопии ИБХ РАН. Для PT1 и, по-видимому, для других членов семейства характерен наиболее часто встречающийся структурный мотив токсинов пауков, так называемый «цистиновый узел».

В сотрудничестве с Институтом физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины исследована активность пуротоксинов. Показано, что PT1 ингибирует P2X<sub>3</sub> рецепторы в наномолярных концентрациях (IC<sub>50</sub> ≈ 10 нМ), вероятно, за счет стабилизации их десенситизированного состояния. В животных моделях PT1 эффективно снимал вызванную боль в дозах (≈ 0,05 мг/кг) существенно меньших, нежели обычные анальгетики. Новое семейство пептидов из яда пауков вызывает большой интерес с точки зрения создания на их основе эффективных анальгетиков.

*Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 10-04-90460), Президиума РАН (программа «Молекулярная и клеточная биология»), Минобрнауки России (Госконтракт № П1388).*

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

*Автор А.А. Василевский отмечен премией.*

© 2011 г. Василевский А.А., Королькова Ю.В.,  
Мошарова И.В., Гришин Е.В.

\* Автор для переписки:

Василевский Александр Александрович, н.с., к.х.н.,  
Учреждение Российской академии наук  
Институт биоорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10  
Тел.: +7 (495) 336-65-40  
E-mail: avas@ibch.ru

---

## THE POISON OF SPIDERS – A SOURCE OF PEPTIDE ANALGESICS

A.A. VASILEWSKI, Yu.V. KOROLKOVA, I.V. MOSHAROVA, E.V. GRISHIN

*M.M. Shemyakin and Ju.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*

Screening of a collection of poisons available in the laboratory of neuroreceptors and neuroregulators of Institute of Bioorganic Chemistry, revealed the activity of purinergic P2X on sensory receptor neurons of mammals – one of the most important classes of pain receptors. A new family of peptides from the poison of spiders is of great interest in terms of creating on their basis of effective analgesics.

*Keywords:* poison of spiders, peptides, analgesic effect.

УДК 577.1

## УЧАСТОК ДНК, РАСПОЛОЖЕННЫЙ МЕЖДУ ГЕНАМИ U2AF1L4 И PSENNEN (PEN2), ПРОЯВЛЯЕТ СВОЙСТВА ДВУНАПРАВЛЕННОГО ПРОМОТОРА

Д.А. ДИДЫЧ\*, Н.А. СМІРНОВ, С.Б. АКОПОВ, Л.Г. НИКОЛАЕВ, Е.Д. СВЕРДЛОВ

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

Получены данные, подтверждающие предположение о том, что область между генами *U2AF1L4* и *PSENNEN (PEN2)* является двунаправленным промотором.

*Ключевые слова:* ДНК, гены *U2AF1L4* и *PSENNEN (PEN2)*, промоторы.

## SEGMENT OF DNA LOCATED BETWEEN THE GENES U2AF1L4 AND PSENNEN (PEN2), EXHIBITS THE PROPERTIES OF THE BIDIRECTIONAL PROMOTER

D.A. DIDYCH, N.A. SMIRNOV, S.B. AKOPOV, L.G. NIKOLAEV, E.D. SVERDLOV

*M.M. Shemyakin and Ju.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*

The data obtained confirm the assumption that the region between genes *U2AF1L4* and *PSENNEN (PEN2)* is a bidirectional promoter.

*Keywords:* DNA, genes *U2AF1L4* and *PSENNEN (PEN2)*, promoters.

Работа посвящена исследованию промоторной области близко расположенных генов человека *U2AF1L4* и *PSENNEN (PEN2)*, транскрипция которых осуществляется в противоположных направлениях. Ген *U2AF1L4* кодирует один из ортологов белка U2AF<sup>35</sup>, компонента сплайсосомы в составе гетеродимерного комплекса, ответственного за распознавание 3'-сплайс сайтов. Ген *PSENNEN (PEN2)* кодирует субъединицу гамма-секретазного комплекса, участвующего в пост-трансляционном процессинге трансмембранных белков первого типа, в частности белка-предшественника бета-амилоида и Notch-рецептора. С применением 5'RACE в клетках линии HeLa для обоих генов нами были обнаружены точки начала транскрипции (TSS), расположенные друг от друга на расстоянии менее 300 п.н. Для анализа промоторной активности исследуемого

участка ДНК область, содержащую обнаруженные TSS, клонировали в обеих ориентациях в беспромоторный вектор pGL4, содержащий ген люциферазы светлячка. Был проведен биоинформатический анализ нуклеотидной последовательности, содержащей обнаруженные TSS, который позволил выявить несколько потенциальных регуляторных участков.

Для исследования роли выявленных участков в инициации двунаправленной транскрипции были получены мутантные формы исследуемого фрагмента генома человека, содержащие нуклеотидные замены. Промоторная активность полученных фрагментов была измерена в системе двойной люциферазной детекции в клетках линии HeLa. Выявлено несколько общих регуляторных последовательностей для генов *U2AF1L4* и *PSENNEN (PEN2)*. Полученные результаты подтверждают предположение о том, что область между генами *U2AF1L4* и *PSENNEN (PEN2)* является двунаправленным промотором.

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

© 2011 г. Дидыч Д.А., Смирнов Н.А., Акопов С.Б., Николаев Л.Г., Сverdlov Е.Д.

\* Автор для переписки:

Дидыч Дмитрий Александрович, н.с., к.б.н.,  
ИБХ РАН  
117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10  
Тел.: 8(495) 330-70-29  
E-mail: Dmitry\_D@inbox.ru

## КРИОГЕЛИ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

М.Г. ДРОЗДОВА<sup>1\*</sup>, Р.А. АКАСОВ<sup>1</sup>, Д.С. ЗАЙЦЕВА-ЗОТОВА<sup>1</sup>, А.С. ГОЛУНОВА<sup>2</sup>, А.А. АРТЮХОВ<sup>2</sup>, И.А. ПРУДЧЕНКО<sup>1</sup>, М.И. ШТИЛЬМАН<sup>2</sup>, Е.А. МАРКВИЧЕВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,

<sup>2</sup> Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

Исследовали матриксы на основе модифицированного поливинилового спирта, дополнительно содержащие заряженные группы диметиламиноэтил-метакрилата или акриловую кислоту, для их дальнейшего использования в тканевой инженерии. Показано, что матриксы на основе поливинилового спирта не токсичны и способны обеспечивать адгезию, рост и пролиферацию клеток. Введение пептида-агониста тромбинового рецептора в среду культивирования (5 мкг/мл) улучшает пролиферацию фибробластов.

*Ключевые слова:* тканевая инженерия, криогели, модифицированный поливиниловый спирт.

Тканевая инженерия — область медицинской биотехнологии, целью которой является восстановление с помощью новых биоматериалов поврежденных или утраченных тканей и органов. Одна из ключевых задач тканевой инженерии — это создание биodeградируемого полимерного 3D каркаса (матрикса), который обеспечивает поверхность для адгезии и роста клеток и постепенно заменяется формирующимися на основе этих клеток тканями. К перспективным материалам для создания матриксов относятся макропористые гидрогели (криогели) на основе модифицированного поливинилового спирта (ПВС).

Цель данной работы заключалась в получении и исследовании матриксов на основе ПВС, дополнительно содержащие заряженные группы диметиламиноэтил-метакрилата (ДМАЭМА) или акриловой кислотой, для их дальнейшего использования в тканевой инженерии.

В данной работе исследовали матриксы, получаемые сополимеризацией макромера на основе акрированного поливинилового спирта (M=14400) и соответствующего ионогенного низкомолекулярного мономера, вводимого в

состав гидрогеля с целью улучшения адгезии клеток. Другим важным компонентом тканевой инженерии является использование биоактивных молекул, способных ускорить процесс регенерации тканей. Нами был изучен эффект пептида-агониста тромбинового рецептора (TRAP-6), который способен ускорять процесс ранозаживления. В работе использовались клетки линии мышечных фибробластов (L929) и мезенхимальные стволовые клетки, выделенные из жировой ткани человека (MSC). Исследование цитотоксичности проводили с помощью экстракт- и контакт-тестов. Рост и пролиферацию клеток контролировали с помощью оптического микроскопа, а количество жизнеспособных клеток определяли с помощью МТТ-теста. Экстракт-тест позволяет оценить жизнеспособность клеток при их культивировании в экстракте, полученном при инкубировании матриксов в питательной среде, а контакт-тест дает возможность изучить взаимодействие монослоя клеток с поверхностью матрикса в течение 24 часов.

Результаты показали, что матриксы на основе модифицированного ПВС не токсичны и способны обеспечивать адгезию, рост и пролиферацию клеток. Также было показано, что введение TRAP-6 в среду культивирования (5 мкг/мл) улучшает пролиферацию фибробластов.

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

© 2011 г. Дроздова М.Г., Акасов Р.А., Зайцева-Зотова Д.С., Голунова А.С., Артюхов А.А., Прудченко И.А., Штильман М.И., Марквичева Е.А.

\* **Автор для переписки:**

Дроздова Мария Георгиевна, аспирант,  
Институт биоорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10  
Тел.: 8 (495) 336-06-00, Факс: 8 (495) 335-10-11,  
E-mail: drozdovamg@gmail.com

## CRYOGELS BASED ON A MODIFIED POLYVINYL ALCOHOL FOR TISSUE ENGINEERING

M.G. DROZDOVA<sup>1</sup>, R.A. AKASOV<sup>1</sup>, D.S. ZAITSEVA-ZOTOVA<sup>1</sup>, A.S. GOLUNOVA<sup>2</sup>,  
A.A. ARTYUHOV<sup>2</sup>, I.A. PRUDCHENKO<sup>1</sup>, M.I. SHTILMAN<sup>2</sup>, E.A. MARKVICHEVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *M.M. Shemyakin and Ju.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,*

<sup>2</sup> *Russian University of Chemical Technology named after D.I. Mendeleev, Moscow*

Investigated the matrix based on modified polyvinyl alcohol, further comprising charged groups dimethylaminoethyl methacrylate and acrylic acid, for use in tissue engineering. Shown that the matrix-based polyvinyl alcohol non-toxic and able to provide adhesion, growth and cell proliferation. Introduction peptide thrombin receptor agonist in the culture medium (5 mcg/ml) enhances the proliferation of fibroblasts.

*Keywords:* tissue engineering, cryogels, modified polyvinyl alcohol.

## НОВЫЙ ФАКТОР АНТИТЕРМИНАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ, ДЕЙСТВУЮЩИЙ НА РНК-ПОЛИМЕРАЗУ ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Д.М. ЕСЮНИНА\*, Н.А. МИРОПОЛЬСКАЯ,  
Л.С. МИНАХИН, А.В. КУЛЬБАЧИНСКИЙ

Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной генетики РАН, Москва

В работе исследован новый антитерминаторный белок gr39, кодируемый бактериофагом P23-45, заражающим термофильные бактерии *Thermus thermophilus* и *Thermus aquaticus*. Показано, что белок gr39 способен эффективно подавлять терминацию транскрипции бактериальной РНК-полимеразы этих бактерий на терминаторах бактериофага. Кроме того, белок gr39 значительно ускоряет элонгацию транскрипции и подавляет образование транскрипционных пауз. Вместе с тем этот белок не влияет на скорость различных реакций (синтеза РНК, пирофосфоролиза и расщепления РНК) в активном центре РНКП.

**Ключевые слова:** транскрипция, антитерминация, бактериальная РНК-полимераза, термофильные бактерии.

Бактериальная РНК-полимераза (РНКП) — это сложная молекулярная машина, активность которой на разных стадиях транскрипции регулируется многими факторами. Одной из важных регуляторных стадий в синтезе РНК является терминация транскрипции, которая происходит в специальных участках генома — терминаторах. Процесс терминации состоит из нескольких стадий, включая временную остановку РНКП в участке терминатора, формирование шпильки определенной структуры в РНК-транскрипте и диссоциацию транскрипционного комплекса.

Антитерминация транскрипции служит важным механизмом, обеспечивающим транскрипцию генов оперона, расположенных после терминатора. Белки-антитерминаторы, кодируемые бактериальной клеткой, либо бактериофагами (например, белки N и Q бактериофага  $\lambda$ ), способны подавлять терминацию, воздействуя на различные стадии этого процесса.

В данной работе исследован новый антитерминаторный белок gr39, кодируемый бактериофагом P23-45, заражающим термофильные бактерии *Thermus*

*thermophilus* и *Thermus aquaticus*. Показано, что белок gr39 способен эффективно подавлять терминацию транскрипции РНКП этих бактерий на терминаторах бактериофага. Кроме того, белок gr39 значительно ускоряет элонгацию транскрипции и подавляет образование транскрипционных пауз. Вместе с тем этот белок не влияет на скорость различных реакций (синтеза РНК, пирофосфоролиза и расщепления РНК) в активном центре РНКП.

Таким образом, антитерминаторная активность белка gr39, по-видимому, определяется его влиянием на первую стадию терминации — остановку РНКП в участке терминатора — за счет способности подавлять паузы транскрипции. Установлено, что активность gr39 не требует участия дополнительных бактериальных белков, что отличает его от «классических» антитерминаторов — белков N и Q бактериофага  $\lambda$ . Белок gr39 может быть в дальнейшем использован для структурных исследований процессов терминации и антитерминации с использованием РНКП термофильных бактерий в качестве модели.

*Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (госконтракт № 02.740.11.5132).*

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

© 2011 г. Есюнина Д.М., Миропольская Н.А.,  
Минахин Л.С., Кульбачинский А.В.

\* **Автор для переписки:**

Есюнина Дарья Михайловна, аспирант,  
Учреждение Российской академии наук  
Институт молекулярной генетики РАН  
123182 Москва, пл. Академика Курчатова, 2  
Тел.: +7 (499) 196-00-15  
E-mail: es\_dar@inbox.ru

## **A NEW FACTOR OF TRANSCRIPTION ANTITERMINATION ACTING ON RNA POLYMERASE OF THERMOPHILIC BACTERIA**

D.M. ESYUNINA, N.A. MIROPOLSKAYA, L.S. MINAKHIN, A.V. KUL'BACHINSKI

*Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow*

We have studied a new antiterminator protein gp39, encoded by bacteriophage P23-45, infects thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* and *Thermus aquaticus*. It is shown that the gp39 protein is able to effectively inhibit bacterial transcription termination by RNA polymerase of bacteria on the terminators of bacteriophage. In addition, the gp39 protein greatly accelerates the elongation of transcription and suppresses transcription pauses. However, this protein has no effect on the rate of various reactions (synthesis of RNA, and RNA pyrophosphorolysis and cleavage) in the active site of RNAP.

*Keywords:* transcription, antitermination, bacterial RNA polymerase, thermophilic bacteria.

## piNG-BODY – НОВАЯ ОРГАНЕЛЛА В СПЕРМАТОЦИТАХ *DROSOPHILA MELANOGASTER*, ОТВЕТСТВЕННАЯ ЗА piРНК-САЙЛЕНСИНГ

М.В. КИБАНОВ\*, В.А. ГВОЗДЕВ, Л.В. ОЛЕНИНА

Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной генетики РАН, Москва

Показано, что piNG-body является основным местом локализации белков системы piРНК-сайленсинга — Aub, AGO3, Vasa, Tudor, Spindle-E, Squash и Cutoff, белков микроРНК-сайленсинга — AGO1 и Belle, а также белка DCP1α — компонента системы деградации мРНК. Появление piNG-body совпадает с началом активной транскрипции в сперматоцитах. Данные позволяют предполагать, что piNG-body служит центром осуществления piРНК-сайленсинга в сперматоцитах *D. melanogaster*, а выявленная компартиментализация компонентов способствует быстрому и эффективному образованию пула piРНК. piNG-body также может обеспечивать интеграцию между микроРНК- и piРНК-путями сайленсинга.

**Ключевые слова:** piNG-body, сперматоциты, piРНК-сайленсинг, *Drosophila melanogaster*.

Эволюционно консервативный путь piРНК-сайленсинга необходим для поддержания целостности генома, поскольку предотвращает экспрессию нежелательных элементов генома в герминальных тканях эукариот. Белки, отвечающие за его реализацию, найдены в околядерных гранулах piage у *Drosophila melanogaster* и хроматоидном тельце у млекопитающих.

С помощью иммуноокрашивания семенников *D. melanogaster* и конфокальной микроскопии в околядерной зоне первичных сперматоцитов наряду с множеством мелких гранул piage (0,62±0,13 мкм) авторами впервые была обнаружена более крупная структура (2,38±0,35 мкм), одна на клетку, которую мы назвали piNG-body (piRNA piage giant body). Наши исследования показали, что piNG-body является основным местом локализации белков системы piРНК-сайленсинга — Aub, AGO3, Vasa, Tudor, Spindle-E, Squash и Cutoff, белков микроРНК-сайленсинга — AGO1 и Belle, а также белка DCP1α — компонента системы деградации мРНК.

Появление piNG-body совпадает с началом активной транскрипции в сперматоцитах. Нами было

выявлено, что AGO3 располагается в центральной доле piNG-body, тогда как остальные идентифицированные компоненты локализуются в нескольких периферийных долях, что, возможно, отражает факт существования различных макромолекулярных комплексов, участвующих в piРНК-сайленсинге и образовании piРНК.

Мутации *aub*, *ago3* и *vasa* приводят к исчезновению piNG-body и гиперэкспрессии повторяющихся генов *Stellate*, в норме репрессированных с помощью Su(Ste) piРНК.

Функционирование системы piРНК-сайленсинга зависит от симметричного метилирования остатков аргинина в этих белках, которое осуществляется аргининметилтрансферазой dPRMT5. Мутации в гене данной метилтрансферазы приводили к выходу белка Aub из состава piage в цитоплазму, исчезновению piNG-body, нарушению образования Su(Ste) piРНК и к дерепрессии повторов *Stellate*.

Наши данные позволяют предполагать, что piNG-body является центром осуществления piРНК-сайленсинга в сперматоцитах *D. melanogaster*, а обнаруженная компартиментализация компонентов способствует быстрому и эффективному образованию пула piРНК. piNG-body также может обеспечивать интеграцию между микроРНК- и piРНК-путями сайленсинга.

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

*Автор М.В. Кибанов отмечен премией.*

© 2011 г. Кибанов М.В., Гвоздев В.А., Оленина Л.В.

\* **Автор для переписки:**

Кибанов Михаил Викторович, м.н.с.,  
Учреждение Российской академии наук  
Институт молекулярной генетики РАН  
123182 Москва, пл. Академика Курчатова, 2  
Тел.: +7 (499) 196-08-09  
Факс: +7 (499) 196-02-21;  
E-mail: mkibanov@gmail.com

---

## **piNG-BODY – A NEW ORGANELLE IN SPERMATOCYTES DROSOPHILA MELANOGASTER, IS RESPONSIBLE FOR SILENCING piRNA**

M.V. KIBANOV, V.A. GVOZDEV, L.V. OLENINA

*Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow*

It is shown that piNG-body is the main site of localization of protein-silencing system piRNA – Aub, AGO3, Vasa, Tudor, Spindle-E, Squash and Cutoff, protein microRNA-silencing – AGO1 and Belle, as well as protein DCP1 $\alpha$  – component of the system degradation mRNA. The appearance of piNG-body coincides with the beginning of active transcription in spermatocytes. The data suggest that piNG-body serves as the center of piRNA-silencing in spermatocytes *D. melanogaster*, as revealed compartmentalization of components facilitates rapid and efficient formation of a pool piRNA. piNG-body can also provide integration between the microRNA- and piRNA-pathways silencing.

*Keywords:* piNG-body, spermatocytes, piRNA-silencing, *Drosophila melanogaster*.

## СУЩЕСТВЕННЫЕ ФУНКЦИИ РНК-ХЕЛИКАЗЫ VASA В СЕМЕННИКАХ *D. MELANOGASTER*

А.А. КОТОВ\*, Л.В. ОЛЕНИНА

Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной генетики РАН, Москва

Впервые были получены данные о том, что *Vasa* необходим для поддержания популяции стволовых герминальных клеток и для функционирования рiРНК-пути в семенниках *Drosophila*. В дальнейшем планируется изучение молекулярных взаимодействий *Vasa* в этих процессах.

**Ключевые слова:** РНК-хеликаза, *Vasa*, семенники, дрозофила.

РНК-хеликаза *Vasa* у *Drosophila* и его гомологи у других эукариот, включая человека, являются консервативным маркером герминальных клеток. Функция *Vasa* существенна для развития герминальных тканей и последующего гаметогенеза (Gustafson et al., 2010). В яичниках *Drosophila* *Vasa* обнаружен в составе околоядерных РНП-гранул (так называемое «облачко» — «puage») и на заднем полюсе ооцита, в полярных гранулах. Отсутствие материнского белка *Vasa* в полярной плазме приводит к нарушению формирования гонад в развивающемся эмбрионе (Liang et al., 1994; Lasko and Ashburner, 1990). В отсутствие зиготической экспрессии *Vasa* в яичниках не формируется puage, происходит мобилизация ретротранспозонов, в норме подавляемых с помощью рiРНК-интерференции, что приводит к деградации яичников в среднем оогенезе (Malone et al., 2009). Однако, по литературным данным, отсутствие *Vasa* не оказывает влияния на морфологию семенников и процесс сперматогенеза у *Drosophila* (Styhler et al., 1998; Lasko and Ashburner, 1990).

С помощью иммуноокрашивания препаратов семенников мух, мутантных по *vasa*, и конфокальной микроскопии было показано, что в первичных сперматоцитах экспрессия *Vasa* также необходима для формирования гранул puage. Отсутствие *Vasa* приводило к делокализации белков рiРНК-пути Aub и AGO3 в

цитоплазму и к дерепрессии генов *Stellate*. Тандемные повторы *Stellate* служат основной мишенью системы рiРНК-интерференции в семенниках (Nishida et al., 2007; Nagao et al., 2010) и их гиперэкспрессия приводит к мейотическим нарушениям в расхождении хромосом и к стерильности (Livak, 1984; Palumbo et al., 1994).

Следовательно, *Vasa* является существенным архитектурным компонентом puage и важен для процесса рiРНК-интерференции в семенниках. Было обнаружено, что в семенниках мух, мутантных по *vasa*, происходит видимое уменьшение общего числа герминальных клеток на всех стадиях сперматогенеза, по сравнению с диким типом. Выяснена причина потери клеток. Произведенный подсчет числа стволовых герминальных клеток (СГК), детектированных как клетки, прилегающие к хаб-структуре и содержащие спектросому (визуализованную с помощью антител к  $\alpha$ -спектрину), показал, что в семенниках мутантных мух их количество достоверно снижено по сравнению с контролем в 2,5 раза (в день вылета), а в случае мух 6-дневного возраста в 30% семенников мутантов СГК были полностью утрачены.

Таким образом, авторами впервые были получены данные о том, что *Vasa* необходим для поддержания популяции стволовых герминальных клеток и для функционирования рiРНК-пути в семенниках *Drosophila*. В дальнейшем планируется изучение молекулярных взаимодействий *Vasa* в этих процессах.

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

*Автор А.А. Котов отмечен премией.*

© 2011 г. Котов А.А., Оленина Л.В.

\* **Автор для переписки:**

Котов Алексей Александрович, мл.н.с.,  
Учреждение Российской академии наук  
Институт молекулярной генетики РАН  
123182 Москва, пл. Академика Курчатова, 2  
Тел.: +7-905-187-30-25  
E-mail: kotov\_alexei@mail.ru

## THE ESSENTIAL FUNCTIONS OF RNA HELICASE VASA IN THE TESTES *D. MELANOGASTER*

A.A. KOTOV, L.V. OLENINA

*Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow*

First, data were obtained that Vasa is required to maintain populations of germinal stem cells and to function piRNA-way in the testes *Drosophila*. In the future we plan to study the molecular interactions of Vasa in these processes.

*Keywords:* RNA helicase, Vasa, testes, *Drosophila*.

## ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ПРОДУЦЕНТОВ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА-БЕТА

Н.В. ЛОБАНОВА\*, И.Н. ТРУСОВА, Е.Г. БЛАГОДАТСКИХ,  
О.И. КОПЫЛОВА, Е.Н. САУТКИНА, Р.А. ХАМИТОВ, Ю.А. СЕРЕГИН

*ФГУП Государственный научно-исследовательский институт генетики  
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва*

При анализе концентрации интерферона-бета в культуральной жидкости, полученной при разных условиях культивирования, выявлено, что продуктивность клонов при температуре 30 °С выше примерно в 3 раза. Максимальная продуктивность достигнута при плотности  $2,0 \times 10^6$  клеток/мл, дальнейшее повышение плотности не приводило к заметному ее увеличению. Неионные детергенты Твин-20 и Твин-80 в концентрации 0,1% оказались токсичными для клеток. Однако добавление цвиттерионного детергента CHAPS до конечной концентрации 0,1% приводило к увеличению концентрации интерферона-бета в культуральной жидкости более чем в 2 раза, по сравнению с контрольным образцом, причем жизнеспособность и скорость роста клеток были также существенно выше.

*Ключевые слова:* рекомбинантный интерферон-бета, культура клеток, модификация технологии.

Работа была направлена на оптимизацию процесса культивирования клеточной линии СНО, позволяющую увеличить продукцию интерферона-бета (ИФН-бета).

Клеточные линии были созданы на основе клеток яичников китайского хомячка СНО и содержали ген ИФН-бета под контролем индуцируемого промотора. Культивирование проводилось в суспензии в среде без содержания сыворотки. Для оценки концентрации белка в культуральной жидкости (КЖ) использовался метод Вестерн-блоттинга.

Разработка технологии была начата с оптимизации температуры культивирования. Показано, что при культивировании в течение 8 суток при температуре 37 °С клетки достигают большей плотности, однако при двухступенчатом профиле культивирования (37 °С в течение первых суток с последующим переходом на температуру 30 °С) жизнеспособность выше 70% сохраняется примерно на одни сутки дольше. При анализе концентрации ИФН-бета в КЖ, полученной при разных условиях

культивирования, выявлено, что продуктивность клонов при температуре 30 °С выше примерно в 3 раза.

Исследована зависимость продукции ИФН-бета и жизнеспособности клеток от исходной клеточной плотности при засеве. Максимальная продуктивность достигнута при плотности  $2,0 \times 10^6$  клеток/мл, дальнейшее повышение плотности не приводило к заметному ее увеличению.

При оптимизации состава среды для культивирования клеток обнаружено, что существенное увеличение концентрации ИФН-бета в КЖ происходит при добавлении антиоксидантов N-ацетилцистеина (1 мМ) и метионина (1 мкМ).

Изучено влияние различных детергентов на жизнеспособность культуры и уровень продукции белка. Неионные детергенты Твин-20 и Твин-80 в концентрации 0,1% оказались токсичными для клеток. Однако добавление цвиттерионного детергента CHAPS до конечной концентрации 0,1% приводило к увеличению концентрации ИФН-бета в КЖ более чем в 2 раза, по сравнению с контрольным образцом, причем жизнеспособность и скорость роста клеток были также существенно выше.

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

© 2011 г. Лобанова Н.В., Трусова И.Н., Благодатских Е.Г., Копылова О.И., Сауткина Е.Н., Хамитов Р.А., Серегин Ю.А.

\* **Автор для переписки:**

Лобанова Наталия Валентиновна, н.с.,  
ФГУП Государственный научно-исследовательский институт  
генетики и селекции промышленных микроорганизмов  
117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1  
Тел.: +7 (495) 315-07-90  
E-mail: alamos11@mail.ru

## OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR THE CULTIVATION OF EUKARYOTIC PRODUCING RECOMBINANT INTERFERON-BETA

N.V. LOBANOVA, I.N. TRUSOVA, E.G. BLAGODATSKIKH,  
O.I. KOPYLOVA, E.N. SAUTKINA, R.A. KHAMITOV, Yu.A. SEREGIN

*Federal State Unitary Enterprise State Scientific-Research Institute of Genetics  
and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow*

When analyzing the concentration of interferon-beta in the culture fluid, obtained under different culture conditions revealed that the productivity of clones at 30 °C higher than about 3 times. The maximum productivity achieved at a density of  $2.0 \times 10^6$  cells/ml, no further increase in density led to its marked increase. Nonionic detergents Tween 20 and Tween 80 at a concentration of 0.1% proved to be toxic to cells. However, the addition of zwitterionic detergent CHAPS to a final concentration of 0.1% resulted in an increase in the concentration of interferon-beta in the culture fluid of more than 2-fold, as compared with the control sample, and the viability and growth rate of cells was also significantly higher.

*Keywords:* recombinant interferon-beta, cell culture, modification of the technology.

## БИОСИНТЕЗ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ГЛЮКОЗЫ С ПОМОЩЬЮ ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA*

Ю.Н. ЛУНИНА\*, С.В. КАМЗОЛОВА, И.Ф. ПУНТУС, И.Г. МОРГУНОВ

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино

Впервые показана возможность продолжительного синтеза лимонной кислоты из глюкозы с использованием мембранного биореактора и отъемно-доливного метода. Отъемно-доливной способ культивирования является наиболее эффективным. Процесс обеспечивает высокую биосинтетическую активность дрожжей (лимонная кислота на уровне 80 г/л) в течение более 12 суток.

**Ключевые слова:** лимонная кислота, биосинтез, глюкоза, дрожжи, *Yarrowia lipolytica*.

Ежегодно в мире производится 1 млн. 400 тыс. тонн лимонной кислоты (ЛК) с годовым приростом производства 3–5% от существующего уровня. Наряду с традиционным использованием ЛК в пищевой, химической и фармацевтической промышленности рассматриваются новые направления ее применения, расширяется использование ее натриевой соли в составе синтетических моющих средств в качестве заменителя полифосфатов, опасных для экологии.

Традиционно для получения ЛК используются микелиальные грибы *Aspergillus niger*. Но данный процесс имеет ограниченную сырьевую базу, является многостадийным и экологически небезопасным. В Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (ИБФМ РАН) в последние годы разработаны процессы получения ЛК с помощью дрожжей *Yarrowia lipolytica* из растительных масел, глицеринсодержащих отходов производства биодизельного топлива, этанолсодержащего сырья. Сейчас отмечается интерес к глюкозе и глюкозным сиропам — как к дешевому и доступному сырью для получения ЛК.

Исследованиями, проведенными в ИБФМ РАН, впервые обнаружена способность дрожжевых организмов

ассимилировать глюкозу в качестве источника углерода и энергии и продуцировать в значительных количествах ЛК. Установлено, что наиболее активными продуцентами ЛК являются дрожжи, относящиеся к виду *Y. lipolytica*; в качестве продуцентов отобраны природный штамм *Y. lipolytica* 704 и мутант *Y. lipolytica* N 15. Мутант получен путем воздействия комбинированного мутагена УФО и N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидином на природный штамм *Y. lipolytica* 704 и характеризовался повышенной способностью к синтезу ЛК.

Подобраны условия культивирования для *Y. lipolytica*, обеспечивающие максимальную продуктивность биосинтеза ЛК в условиях периодического культивирования. Они включали в себя: ограничение роста дрожжей источником азота при избыточном содержании глюкозы, стабильное поддержание pH на уровне 4,5, интенсивную аэрацию среды и содержание глюкозы в среде от 20 до 40 г/л. В периодическом режиме синтез ЛК с использованием мутанта составлял около 100 г/л.

Таким образом, впервые показана принципиальная возможность продолжительного синтеза ЛК из глюкозы с использованием мембранного биореактора и отъемно-доливного метода. Отъемно-доливной способ культивирования является наиболее эффективным. Процесс обеспечивает высокую биосинтетическую активность дрожжей (ЛК на уровне 80 г/л) в течение более 12 суток.

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пущино, 14–17 ноября 2011 г.).*

© 2011 г. Лунина Ю.Н., Камзолова С.В., Пунтус И.Ф., Моргунов И.Г.

\* **Автор для переписки:**

Лунина Юлия Николаевна, мл.н.с.,

Учреждение Российской академии наук

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов

им. Г.К. Скрыбина РАН

142290 Московская область, Пущино, пр-т Науки, 5

Тел.: +7 (496) 731-86-70

E-mail: luninaj@rambler.ru

## **BIOSYNTHESIS OF CITRIC ACID FROM GLUCOSE USING YEAST YARROWIA LIPOLYTICA**

Ju.N. LUNINA, S.V. KAMZOLOVA, I.F. PUNTUS, I.G. MORGUNOV

*G.K. Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino*

For the first time shows the possibility of prolonged synthesis of glucose from the citric acid using a membrane bioreactor and removable-topping up method. Removable-topping up method of cultivation is the most effective. The process provides a high biosynthetic activity of yeast (citric acid at 80 g/l) for more than 12 days.

*Keywords:* citric acid biosynthesis, glucose, yeast, *Yarrowia lipolytica*.

## НОВАЯ ПАРАДИГМА РЕГУЛЯЦИИ НИКОТИНОВОГО АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА: ЭНДОГЕННЫЕ ГОМОЛОГИ ТРЕХПЕТЕЛЬНЫХ НЕЙРОТОКСИНОВ ЯДА ЗМЕЙ – БЕЛКИ *Lynx1* И *SLURP1* ЧЕЛОВЕКА

Е.Н. ЛЮКМАНОВА\*

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

В работе были разработаны системы бактериальной продукции для ряда  $\alpha$ -нейротоксинов: короткого нейротоксина II (*Naja oxiana*), длинного аналога нейротоксина II, «необычного» токсина WTX (*Naja kaouthia*), а также двух эндогенных нейромодуляторов человека, *Lynx1* и *SLURP1* и их аналогов, меченных стабильными изотопами  $^{15}\text{N}$  и  $^{13}\text{C}$ . Полученные данные впервые экспериментально подтвердили структурную гомологию белков *Lynx1*, *SLURP1* и  $\alpha$ -нейротоксинов. Была выявлена концентрационная зависимость действия *Lynx1* на никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR). На основании полученной пространственной структуры нейромодулятора была построена модель комплекса *Lynx1*/nAChR. Показано принципиальное отличие этой модели от известных моделей, построенных ранее для  $\alpha$ -нейротоксинов.

**Ключевые слова:** никотиновый ацетилхолиновый рецептор, нейротоксины, яд змей, белок *Lynx1*, белок *SLURP1*.

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR) представляет собой лигандозависимый ионный канал, встроенный в постсинаптическую мембрану нейронов. С дисфункцией этих рецепторов связаны многие болезни центральной и периферической нервной системы. Одними из широко изученных ингибиторов nAChR являются  $\alpha$ -нейротоксины яда змей, которые представляют собой небольшие «трехпетельные»  $\beta$ -структурные белки, стабилизированные 4-5 дисульфидными связями. Открытие в центральной нервной системе млекопитающих белков *Lynx* и *SLURP*, взаимодействующих с nAChR и возможно обладающих структурной гомологией с  $\alpha$ -нейротоксинами яда змей, вызвало огромный интерес к этим молекулам и поставило вопрос об их роли в нервной системе организма.

В настоящей работе были разработаны системы бактериальной продукции для ряда  $\alpha$ -нейротоксинов: короткого нейротоксина II (*Naja oxiana*), длинного аналога нейротоксина II, «необычного» токсина WTX (*Naja kaouthia*), а также двух эндогенных нейромодуляторов человека, *Lynx1* и *SLURP1* и их аналогов, меченных стабильными изотопами  $^{15}\text{N}$  и  $^{13}\text{C}$ . Методами сайт-направленного мутагенеза была подтверждена ключевая роль центральной петли  $\alpha$ -нейротоксинов во взаимо-

действии с nAChR. Методами ЯМР-спектроскопии впервые были определены пространственные структуры WTX, *Lynx1* и *SLURP1* и охарактеризована конформационная гетерогенность этих белков в растворе.

Полученные данные впервые экспериментально подтвердили структурную гомологию белков *Lynx1*, *SLURP1* и  $\alpha$ -нейротоксинов. Была продемонстрирована концентрационная зависимость действия *Lynx1* на nAChR. В отличие от  $\alpha$ -нейротоксинов, при концентрации нейромодулятора 1 мкМ наблюдалась активация токов через канал рецептора, а увеличение концентрации выше 10 мкМ приводило к ингибированию. Конкуренция *Lynx1* с  $\alpha$ -нейротоксинами за связывание с рецептором указала на частичное перекрытие сайтов связывания токсина и нейромодулятора.

На основании полученной пространственной структуры нейромодулятора была построена модель комплекса *Lynx1*/nAChR. Было выявлено принципиальное отличие этой модели от известных моделей, построенных ранее для  $\alpha$ -нейротоксинов. Взаимодействие *Lynx1* с мускариновыми ацетилхолиновыми рецепторами предполагает возможное существование отличных от nAChR мишеней действия нейромодулятора.

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

*Автор Е.Н. Люкманова отмечена премией.*

© 2011 г. Люкманова Е.Н.

\* **Автор для переписки:**

Люкманова Екатерина Назымовна, ст.н.с, к.б.н.,  
ИБХ РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10  
Тел.: +7 (495) 330-69-83

E-mail: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

---

**THE NEW PARADIGM OF REGULATION OF NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR: ENDOGENOUS HOMOLOGUES OF THREE LOOPS NEUROTOXINS OF SNAKE VENOM, Lynx1 AND SLURP1 HUMAN PROTEINS**

E.N. LYUKMANOVA

*M.M. Shemyakin and Ju.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*

We have developed a system of bacterial products for a number of  $\alpha$ -neurotoxins: short-neurotoxin II (*Naja oxiana*), an analogue of the long neurotoxin II, «unusual» toxin WTX (*Naja kaouthia*), as well as two human endogenous neuromodulators, Lynx1 and SLURP1 and their analogues, labeled with stable isotopes  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$ . The data obtained experimentally for the first time confirmed the structural homology of proteins Lynx1, SLURP1 and  $\alpha$ -neurotoxins. Was detected concentration dependence of the Lynx1 on the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR). Based on the resulting spatial structure of the neuromodulator was a model of the complex Lynx1/nAChR. Shown the fundamental difference between this model from the known models constructed earlier for  $\alpha$ -neurotoxins.

*Keywords:* nicotinic acetylcholine receptor, neurotoxins, the poison of snakes, protein Lynx1, protein SLURP1.

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДНК-ГИРАЗЫ *E. COLI* И БЕЛКОВ, СОДЕРЖАЩИХ ПЕНТАПЕПТИДНЫЕ ПОВТОРЫ

М.В. МЕТЕЛЕВ\*

Учреждение Российской академии наук Институт биологии гена РАН, Москва

В работе был проведен анализ взаимодействия PRP-белка QngB с ДНК-гиразой *E. coli*, используя бактериальную дигибридную систему. Было выявлено, что QngB взаимодействует как с А, так и с В субъединицей ДНК-гиразы. С помощью направленного мутагенеза были идентифицированы позиции в QngB, которые ответственны за связывание с каждой из субъединиц ДНК-гиразы. Распределение данных позиций частично коррелирует с «выпетливаниями» из регулярной структуры PRP-белков. Нарушение взаимодействия между ДНК-гиразой и QngB приводит к значительному снижению уровня протективного действия.

*Ключевые слова:* ДНК-гираза, PRP-белок QngB, *E. coli*.

Бактериальная ДНК-гираза является топоизомеразой II типа с уникальной способностью к созданию отрицательной сверхспирализации ДНК и представляет собой гетеротетрамер из двух А (GyrA) и двух В (GyrB) субъединиц.

Фермент пропускает один сегмент ДНК (Т-сегмент) через временно образующийся двухцепочечный разрыв в другом (G-сегмент), таким образом изменяя топологию ДНК. ДНК-гираза необходима для репликации, транскрипции и регуляции генов, что делает ее важной мишенью для природных и химически синтезированных антибиотиков.

Фторхинолоны — класс высокоэффективных синтетических антибиотиков широкого спектра действия, они связываются с ДНК-гиразой, стабилизируя двухцепочечные разрывы, накопление которых приводит к гибели клетки.

Природная устойчивость к фторхинолонам может определяться необычными белками, содержащими пентапептидные повторы (PRP-белки). Гены, кодирующие PRP-белки, обнаружены на плазмидах и в геномах многих бактерий. Интересно, что устойчивость к при-

родным антибиотикам (микроцин В, альбицидин) также обеспечивается PRP-белками. Механизм протективного действия PRP-белков пока до конца не ясен.

В работе был проведен анализ взаимодействия PRP-белка QngB с ДНК-гиразой *E. coli*, используя бактериальную дигибридную систему. Было выявлено, что QngB взаимодействует как с А, так и с В субъединицей ДНК-гиразы.

С помощью направленного мутагенеза были идентифицированы позиции в QngB, которые ответственны за связывание с каждой из субъединиц ДНК-гиразы; распределение данных позиций частично коррелирует с «выпетливаниями» из регулярной структуры PRP-белков.

Нарушение взаимодействия между ДНК-гиразой и QngB приводит к значительному снижению уровня протективного действия.

В настоящее время работа направлена на идентификацию участков ДНК-гиразы, взаимодействующих с QngB. Определение детального механизма устойчивости, связанного с PRP-белками, может помочь в разработке новых антибиотиков, действующих на ДНК-гиразу и способных преодолевать защитное действие PRP-белков.

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

*Автор М.В. Метелев отмечен премией.*

© 2011 г. Метелев М.В.

\* **Автор для переписки:**

Метелев Михаил Васильевич, аспирант,  
Учреждение Российской академии наук  
Институт биологии гена РАН, Москва  
119334 Москва, ул. Вавилова, 34/5  
Тел: +7-929-666-25-97  
E-mail: metallopho@gmail.com

**STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ANALYSIS  
OF THE INTERACTION OF DNA GYRASE *E. COLI*  
AND PROTEINS CONTAINING PENTAPEPTIDE REPEATS**

M.V. METELEV

*Institute of Gene Biology RAS, Moscow*

In this paper we analyzed the interaction of PRP-protein QnrB with DNA gyrase *E. coli*, using a bacterial digibridic system. It was found that QnrB interacts with both A, and the B subunits of DNA gyrase. Using directed mutagenesis identified positions in QnrB, which are responsible for binding to each of the subunits of DNA gyrase. The distribution of these positions is partially correlated with the «looping» from the regular structure of PRP-proteins. Violation of the interaction between DNA gyrase and QnrB leads to a significant reduction in the protective action.

*Keywords:* DNA gyrase, PRP-protein QnrB, *E. coli*.

## ТОПОЛОГИЯ И ЭНЕРГЕТИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ ТРАНСМЕМБРАННЫМИ $\alpha$ -СПИРАЛЯМИ РЕЦЕПТОРОВ ErbB

К.С. МИНЕЕВ\*, Э.В. БОЧАРОВ, Е.Н. ЛЮКМАНОВА,  
Н.Ф. ХАБИБУЛЛИНА, М.В. ГОНЧАРУК, А.С. АРСЕНЬЕВ

*Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

Впервые измерены кинетические характеристики димеризации трансмембранных спиралей. Полученные параметры существенным образом проясняют природу взаимодействий между белками в липидном бислое.

*Ключевые слова:* трансмембранные  $\alpha$ -спирали рецепторов ErbB3, топология, энергетика.

Взаимодействия между трансмембранными (ТМ)  $\alpha$ -спиралями в мембранных доменах (МД) интегральных мембранных белков определяют их третичную структуру и функциональность. Тем не менее основополагающие принципы этих взаимодействий на настоящий момент исследованы слабо, что ограничивает возможность предсказания структуры и свойств  $\alpha$ -спиральных МД.

В представленной работе методами ЯМР спектроскопии изучены взаимодействия между ТМ сегментами в двуспиральных МД рецепторных тирозинкиназ ErbB3 (в мицеллах додецилфосфатидилхолина — ДФХ) и ErbB4 (в бицеллах ДМФХ/ДГФХ 1:3). ТМ спирали ErbB4 ассоциируют по сдвоенному полярному мотиву A655GxxGG660, образуя параллельный правозакрученный димер, стабилизированный полярными контактами. ТМ спирали ErbB3 образуют левозакрученный димер, ассоциируя по длинному неполярному мотиву типа «семичленный повтор» посредством контактов Ван-дер-Ваальса, стекинга ароматических колец и  $\pi$ -катионных взаимодействий. В обоих случаях наблюдалось детергент (липид)-зависимое равновесие мономер-димер, которое было проанализировано количественно.

Показано, что для ErbB3 ДФХ не является идеальным растворителем, и концентрация детергента

служит дополнительным фактором, влияющим на равновесие мономер-димер. В то же время бицеллы ДМФХ/ДГФХ оказались идеальным растворителем для ТМ спиралей ErbB4, что позволило измерить свободную энергию их димеризации, составившую -1,5 ккал/моль. Для обоих ТМ димеров константа димеризации существенно возрастала при превышении соотношением белок/мицелла (бицелла) единицы («насыщенные мицеллы»). Из температурной зависимости заселенности двух состояний ErbB4 измерены изменения энтропии, энтальпии и теплоемкости при димеризации в «насыщенных бицеллах». Показано, что ассоциация спиралей ErbB4 — эндотермический процесс, протекающий с существенным увеличением энтропии и теплоемкости. Это свидетельствует о наличии в бицеллах ДМФХ/ДГФХ эффекта, аналогичного гидрофобному в полярном окружении, то есть «замороженного» состояния липидов у поверхности ТМ спиралей.

Из температурной зависимости ширины линий сигналов в спектрах ЯМР определена энергия активации димеризации, а также энтропия и энтальпия переходного состояния. Это позволило оценить вклад взаимодействий спираль-спираль в свободную энергию димеризации.

Таким образом, были впервые измерены кинетические характеристики димеризации ТМ спиралей. Полученные параметры существенным образом проясняют природу взаимодействий между белками в липидном бислое.

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

*Автор К.С. Минеев отмечен премией.*

© 2011 г. Минеев К.С., Бочаров Э.В., Люкманова Е.Н., Хабибуллина Н.Ф., Гончарук М.В., Арсеньев А.С.

\* **Автор для переписки:**

Минеев Константин Сергеевич, н.с., к.ф.-м.н.,

Учреждение Российской академии наук

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина

и Ю.А. Овчинникова РАН

117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Тел.: +7 (495)330-74-83

E-mail: mineev@nmr.ru

**TOPOLOGY AND ENERGETICS OF INTERACTIONS  
BETWEEN TRANSMEMBRANE  $\alpha$ -HELICES OF ErbB RECEPTORS**

K.S. MINEEV, E.V. BOCHAROV, E.N. LYUKMANOVA,  
N.F. KHABIBULLINA, M.V. GONCHARUK, A.S. ARSENIIEV

*M.M. Shemyakin and Ju.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*

For the first time measured the kinetic characteristics of the dimerization of transmembrane helices. The parameters obtained substantially clarify the nature of interactions between proteins in the lipid bilayer.

*Keywords:* transmembrane  $\alpha$ -helices of ErbB receptors, topology, energetics.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ НОВОГО ИНГИБИТОРА ХИМОТРИПСИНА ИЗ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ *SOLANUM TUBEROSUM*

И.А. ПАРФЕНОВ\*, Т.А. ВАЛУЕВА

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии  
им. А.Н. Баха РАН, Москва

Изучены характеристики нового ингибитора химотрипсина из клубней картофеля — белка РКСИ-23. Определена N-концевая аминокислотная последовательность первых 20 остатков молекулы этого белка. Белок РКСИ-23 подавлял с одинаковой степенью эффективности активность химотрипсина и трипсина и был способен образовывать с ними тройные комплексы, содержащие одновременно оба фермента. Исследована зависимость стабильности ингибитора от рН и температуры. Выявлено, что белок РКСИ-23 в различной степени угнетает рост и развитие патогенных микроорганизмов *Fusarium culmorum* и *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, поражающих картофель.

**Ключевые слова:** белок РКСИ-23, химотрипсин, ингибиторы, клубни картофеля, *Solanum tuberosum*.

Белки-ингибиторы составляют особую группу белков растений, способных образовывать с различными ферментами комплексы, что приводит к ингибированию их активности. Белки ингибиторы с молекулярными массами от 20 до 24 кДа, встречающиеся в клубнях картофеля, выделяют в отдельное подсемейство, обозначенное как подсемейство РКПИ (Kunitz-type proteinase inhibitors).

Было выявлено, что белки РКПИ принимают участие в защитной системе картофеля при поражении фитопатогенами, а также могут контролировать *in vivo* активности эндогенных ферментов при его прорастании. Однако при всей важности данных белков для растений взаимосвязь структуры ингибиторов и выполняемых ими функций до сих пор остается малоизученной. Исследование свойств и структуры ингибиторов является важным направлением исследований для понимания механизмов их действия, а также для будущего использования в биотехнологии и медицине.

Из клубней картофеля (*Solanum tuberosum* L., сорт Юбилей Жукова) выделен новый высокоочищенный белок, обозначенный как РКСИ-23 (potato Kunitz-type chymotrypsin inhibitor). Определена N-концевая

аминокислотная последовательность первых 20 остатков молекулы этого белка. Белок РКСИ-23 с одинаковой степенью эффективности подавлял активность химотрипсина и трипсина и был способен образовывать с ними тройные комплексы, содержащие одновременно оба фермента. Образование таких комплексов связано с наличием в молекуле ингибитора второго реактивного центра, в составе которого локализован остаток Met154. Сделано предположение о том, что этот центр ответствен за связывание химотрипсина.

Исследована зависимость стабильности ингибитора от рН и температуры. Выявлено, что белок РКСИ-23 в различной степени угнетает рост и развитие патогенных микроорганизмов *Fusarium culmorum* и *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, поражающих картофель.

Из генома этого сорта картофеля был амплифицирован фрагмент гена, кодирующий данный белок, и проведен его сравнительный анализ с последовательностями РКПИ из других сортов картофеля, который показал высокую степень гомологии (от 89 до 99% идентичных остатков) между ними. Получен продукт гетерологичной экспрессии в *E. coli* BL-21(DE3) с молекулярной массой около 23 кДа, который не обнаруживался в колониях, не несущих вставки. Исследовано действие рекомбинантного белка на протеиназы и фитопатогены.

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

© 2011 г. Парфенов И.А., Валueva Т.А.

\* **Автор для переписки:**

Парфенов Игорь Александрович, аспирант,  
Учреждение Российской академии наук  
Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН  
119071 Москва, Ленинский пр-т, 33, стр. 2  
Тел.: +7 (495) 952-13-84  
E-mail: valueva@inbi.ras.ru

---

## INVESTIGATION OF THE PROPERTIES OF THE NEW CHYMOTRYPSIN INHIBITOR FROM POTATO TUBERS *SOLANUM TUBEROSUM*

I.A. PARFENOV, T.A. VALUEVA

*A.N. Bach Institute of Biochemistry RAS, Moscow*

The characteristics of the new chymotrypsin inhibitor from potato tubers — PCCI-23 protein. Determined N-terminal amino acid sequence of the first 20 residues of the protein molecule. The protein PKCI-23 inhibited an activity of chymotrypsin and trypsin with the same degree of efficiency and was able to form ternary complexes with them, containing both enzymes simultaneously. The dependence of the stability of the inhibitor on the pH and temperature was studied. It was revealed that the protein PKCI-23 in varying degrees inhibit the growth and development of pathogens *Fusarium culmorum* and *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, affecting potato.

*Keywords:* protein PKCI-23, chymotrypsin inhibitors, potato tubers, *Solanum tuberosum*.

## СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ БИОСИНТЕЗА ХРОМОФОРА ЗЕЛЕННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА (GFP)

Н.В. ПЛЕТНЕВА\*, К.А. ЛУКЪЯНОВ, Н.Г. ГУРСКАЯ,  
К.А. ГОРЯЧЕВА, В.И. МАРТЫНОВ, В.З. ПЛЕТНЕВ

*Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

В работе с использованием флуоресцентного, рентгеноструктурного и других методов показано, что созревание зеленого хромофора aceGFP происходит по альтернативному механизму, с участием Tug220 в качестве каталитического остатка, вместо стандартного для всех GFP-подобных белков инвариантного Glu222.

*Ключевые слова:* зеленый флуоресцентный белок, хромофор, биосинтез.

Пространственные структуры зеленого флуоресцентного белка aceGFP (из *Aequorea coerulea*), его бесцветного нефлуоресцентного мутантного варианта aceGFP\_G222E и фотоконвертированного зеленого варианта aceGFP\_G222E-UV определены с разрешением 1,5, 1,14 и 1,75 ангстрем, соответственно.

Мономер исследованных белков имеет типичную для GFP пространственную структуру, состоящую из 11-антипараллельных  $\beta$ -сегментов и одной центральной  $\alpha$ -спирали, проходящей вдоль оси  $\beta$ -бочонка, содержащей хромофор. aceGFP<sub>L</sub> — единственный установленный к настоящему моменту нефлуоресцентный бесцветный GFP-подобный белок дикого типа.

Его мутантный вариант aceGFP, содержащий в 222 положении Glu вместо инвариантного каталитического остатка Glu, демонстрирует быструю скорость созревания и яркую зеленую флуоресценцию.

При обратной точечной замене G222E в aceGFP образуется незрелый бесцветный вариант aceGFP\_G222E, который подвергается необратимой фотоконверсии в зеленое флуоресцентное состояние (aceGFP\_G222E-UV).

Хромофор бесцветного aceGFP\_G222E представляет собой промежуточное состояние, при котором стадии циклизации и дегидратации уже завершились, а последующая реакция окисления связи  $C\alpha-C\beta$  остатка Tug хромофора еще не произошла. При этом в наблюдаемой структуре незрелого хромофора aceGFP\_G222E имидазолоновый и фенольный циклы некопланарны друг другу.

Облучение незрелого aceGFP\_G222E приводит к завершению созревания хромофора в конечное зеленое флуоресцентное состояние. Хромофор aceGFP\_G222E-UV представляет собой стандартную планарную бициклическую систему сопряженных двойных связей, сформированную из пятичленного имидазолонового и фенольного циклов. Сопряжение происходит за счет образования двойной связи  $C\alpha=C\beta$  Tug хромофора в процессе реакции окисления.

На основе рентгеноструктурных данных и структурно-мотивированного сайт-направленного мутагена было показано, что остаток Tug220 из ближайшего окружения хромофора играет ключевую роль в наблюдаемых эффектах. Сделан вывод, что созревание зеленого хромофора aceGFP происходит по альтернативному механизму, с участием Tug220 в качестве каталитического остатка, вместо стандартного для всех GFP-подобных белков инвариантного Glu222.

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

*Автор Н.В. Плетнева отмечена премией.*

© 2011 г. Плетнева Н.В., Лукьянов К.А., Гурская Н.Г., Горячева К.А., Мартынов В.И., Плетнев В.З.

\* **Автор для переписки:**

Плетнева Надежда Владимировна, н.с., к.х.н.,  
Учреждение Российской академии наук  
Институт биоорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10  
Тел.: +7 (495) 330-75-10  
E-mail: nadand@mail.ru

## **STRUCTURAL BASIS OF THE BIOSYNTHESIS OF THE CHROMOPHORE OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP)**

N.V. PLETNEVA, K.A. LUKYANOV, N.G. GURSKAYA,  
K.A. GORYACHEVA, V.I. MARTYNOV, V.Z. PLETNEV

*M.M. Shemyakin and Ju.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*

In this paper, using fluorescence, X-ray and other techniques show that maturation of the green chromophore aceGFP is an alternate mechanism, involving Tyr220 as a catalytic residue, instead of the standard for all GFP-like proteins of the invariant Glu222.

*Keywords:* green fluorescent protein, chromophore, biosynthesis.

## СВОЙСТВА ОДНОНИТЕВЫХ ДНК-МАТРИЦ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ АПТАМЕРОВ К ХОЛОФЕРМЕНТУ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *ESCHERICHIA COLI*

Д.В. ПУПОВ\*, Д.М. ЕСЮНИНА, А.В. КУЛЬБАЧИНСКИЙ

Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной генетики РАН, Москва

Исследованы свойства искусственных однонитевых матриц на основе оцДНК-аптамеров, отобранных к холоферменту РНКП *E. coli* с помощью метода SELEX. Показано, что длина РНК-продуктов, синтезируемых РНКП на таких матрицах, зависит от размера расплавленного участка в составе шпильки: на матрицах, содержащих короткую петлю, РНКП синтезирует только abortивные продукты; увеличение же размера петли приводит к синтезу полноразмерных РНК.  $\alpha$ -субъединица в процессе инициации транскрипции на однонитевых шпильчатых матрицах выполняет две существенные функции: осуществляет узнавание специфических промоторных элементов и непосредственно участвует в инициации синтеза РНК.

*Ключевые слова:* однонитевые ДНК-матрицы, РНК-полимераза, холоферменты, аптамеры, *Escherichia coli*.

РНК-полимераза (РНКП) играет центральную роль в процессе синтеза РНК с использованием в качестве матрицы двунитевой ДНК. Однако в ряде случаев роль матрицы для транскрипции могут выполнять одноцепочечные ДНК или РНК. В данной работе исследованы свойства искусственных однонитевых матриц на основе оцДНК-аптамеров, отобранных к холоферменту РНКП *E. coli* с помощью метода SELEX.

Полученные нами аптамеры образуют шпильчатые структуры, содержащие в расплавленном участке последовательность -10 и ТГ элементов бактериального промотора. Показано, что РНКП может инициировать транскрипцию на таких искусственных матрицах. Как и в случае двунитевых промоторов, эффективность инициации транскрипции на данных матрицах зависит от наличия в их составе специфических промоторных элементов, узнаваемых фактором инициации —  $\alpha$ -субъединицей РНКП.

В то же время было обнаружено несколько существенных отличий в механизме инициации транскрипции на данных оцДНК-матрицах по сравнению с классическими промоторами. Было найдено, что

длина РНК-продуктов, синтезируемых РНКП на таких матрицах, зависит от размера расплавленного участка в составе шпильки: на матрицах, содержащих короткую петлю, РНКП синтезирует только abortивные продукты; увеличение же размера петли приводит к синтезу полноразмерных РНК. Следовательно, в отличие от природных промоторов, эффективность инициации транскрипции определяется как первичной, так и вторичной структурой матрицы. Кроме того, нами выявлено, что, в отличие от двунитевых промоторов, стабильное связывание данных матриц с РНКП может происходить даже в отсутствие контактов РНКП с ДНК спереди по ходу транскрипции.

Еще одной важной особенностью исследуемых оцДНК-матриц является сильная зависимость синтеза коротких РНК-продуктов от  $\alpha$ -субъединицы РНКП, которая, по-видимому, участвует в связывании инициаторных субстратов и удерживании коротких РНК-продуктов. Таким образом,  $\alpha$ -субъединица в процессе инициации транскрипции на однонитевых шпильчатых матрицах выполняет две важные функции: осуществляет узнавание специфических промоторных элементов и непосредственно участвует в инициации синтеза РНК.

© 2011 г. Пупов Д.В., Есюнина Д.М., Кульбачинский А.В.

\* **Автор для переписки:**

Пупов Данил Владимирович, н.с., к.б.н.,  
Учреждение Российской академии наук  
Институт молекулярной генетики РАН  
123182 Москва, пл. Академика Курчатова, 2  
Тел.: +7 (499) 196-00-15  
E-mail: danila@pupov.ru

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

*Автор Д.В. Пупов отмечен премией.*

---

## THE PROPERTIES OF SINGLE-STRANDED DNA TEMPLATES DERIVED FROM APTAMERS TO THE RNA POLYMERASE HOLOENZYME *ESCHERICHIA COLI*

D.V. PUPOV, D.M. ESYUNINA, A.V. KUL'BACHINSKI

*Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow*

The properties of artificial matrices based on single-stranded ssDNA aptamers selected to the RNAP holoenzyme *E. coli* using the SELEX. It is shown that the length of the RNA products synthesized by RNAP on these matrices depends on the size of the melted area in the hairpin on the matrices containing a short loop, RNAP synthesizes only abortive products, and increase as the size of the loops leads to the synthesis of full-length RNA.  $\alpha$ -subunit in the process of transcription initiation on single-stranded hairpin matrices performs two essential functions: provides a recognition of specific promoter elements and is directly involved in the initiation of RNA synthesis..

*Keywords:* single-stranded DNA templates, RNA polymerases, holoenzymes, aptamers, *Escherichia coli*.

## ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА СЛАДКОГО БЕЛКА ТАУМАТИНА II ИЗ *THAUMATOCOCCUS DANIELLII* В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА

А.С. ПУШИН<sup>1,2\*</sup>, А.П. ФИРСОВ<sup>1,2</sup>, С.В. ДОЛГОВ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Филиал Учреждения Российской академии наук Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино;

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Москва

Анализировали экспрессию гена тауматина при помощи иммуноблотинга с применением поликлональных антител, специфичных к тауматину. При наличии N- и C-сигнальных последовательностей тауматин накапливался внутриклеточно (предположительно в вакуолях) и соответствовал по подвижности зрелому белку, что свидетельствует о прохождении процессинга. Удаление C-концевого гексапептида приводило к секреции тауматина в межклеточное пространство, при этом процессинг проходил корректно.

**Ключевые слова:** ген сладкого белка тауматина, трансгенный табак.

Сладкий белок тауматин II впервые выделен из плодов западноафриканского растения *Thaumatococcus daniellii* Benth. Тауматин синтезируется в виде предшественника (препротауматина), который содержит N-концевой гидрофобный сигнальный пептид из 22 а.к. остатков и C-концевой пептид, состоящий из 6 а.к. остатков.

Целью наших исследований было изучить влияние удаления N- и C-сигнальных последовательностей препротауматина на характер экспрессии тауматина в трансгенных растениях табака. Для этого были синтезированы несколько нуклеотидных последовательностей, кодирующих разные формы тауматина: форму с удаленным C-концевым сигнальным пептидом, форму с удаленными N- и C-сигнальными пептидами, форму с удаленным N-концевым сигнальным пептидом. В качестве контроля использовали ген, кодирующий препротауматин — форму, содержащую оба сигнальных пептида. Все нуклеотидные последовательности клонировали в бинарный вектор pBI121 вместо гена *uidA*. Полученные векторы переносили в агробактериальный штамм CBE21 для трансформации растений табака. Отобранные трансгенные линии табака использовали для анализа.

Анализ экспрессии гена тауматина при помощи иммуноблотинга с применением поликлональных антител, специфичных к тауматину, дал следующие результаты. При наличии N- и C-сигнальных последовательностей тауматин накапливался внутриклеточно (предположительно в вакуолях) и соответствовал по подвижности зрелому белку, что свидетельствует о прохождении процессинга. Удаление C-концевого гексапептида приводило к секреции тауматина в межклеточное пространство, при этом процессинг проходил корректно.

Уровень накопления тауматина в листьях трансгенного табака определяли по ELISA. В растениях, содержащих форму тауматина с N- и C- сигналами, количество тауматина доходило до 0,57% от общего растворимого белка. В растениях, у которых тауматин был с удаленным C-концевым сигналом, количество доходило до 0,43%.

Органолептический анализ показал, что синтезированный тауматин обладал сладким вкусом. Это свидетельствует о сохранении нативной конформации тауматина при накоплении как внутриклеточно, так и в апопласте. Удаление обоих сигнальных пептидов или только N-концевого существенно снижало уровень накопления тауматина в табаке. В этих растениях тауматин практически не определялся (менее 0,0001% от общего растворимого белка).

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

© 2011 г. Пушин А.С., Фирсов А.П., Долгов С.В.

\* **Автор для переписки:**

Пушин Александр Сергеевич, м.н.с.,

Филиал Института биоорганической химии

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

142290 Московская область, Пушкино г., пр-т Науки, 6

Тел. +7 (926) 354-36-84

E-mail: aspushin@rambler.ru

---

## THE STUDY OF GENE EXPRESSION OF SWEET PROTEIN THAUMATIN II FROM THAUMATOCOCCUS DANIELLII IN TRANSGENIC TOBACCO PLANTS

A.S. PUSHIN<sup>1,2</sup>, A.P. FIRSOV<sup>1,2</sup>, S.V. DOLGOV<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Branch of M.M. Shemyakin and Ju.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino;*

<sup>2</sup> *All-Russian Research Institute for Agricultural Biotechnology RAAS, Moscow*

Gene expression thaumatin was analyzed by immunoblotting using polyclonal antibodies specific to thaumatin. In the presence of N- and C-signal sequences thaumatin accumulate intracellularly (presumably in the vacuoles) and corresponded to the mobility of the mature protein, indicating the realization of the processing. Removal of the C-terminal hexapeptide led to secretion of thaumatin in the intercellular space, and the processing took place correctly.

*Keywords:* sweet protein thaumatin gene, transgenic tobacco.

## ТРАНСГЕННЫЕ ФОРМЫ БЕРЕЗЫ С ГЕНАМИ *bar* И *GS1*, УСТОЙЧИВЫЕ К СУБЛЕТАЛЬНЫМ И ЛЕТАЛЬНЫМ ДОЗАМ ФОСФИНОТРИЦИНА

М.А. САЛМОВА<sup>1,2\*</sup>, Д.С. ЗАКАРЮЧКИНА<sup>3</sup>, Т.Е. ШАДРИНА<sup>1</sup>, К.А. ШЕСТИБРАТОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Филиал Учреждения Российской академии наук Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова,

<sup>2</sup> Пушинский государственный университет, Пушино;

<sup>3</sup> Российский государственный аграрный университет — МСХА им К.А.Тимирязева, Москва

Впервые получено пять трансгенных линий березы с геном *bar*, обладающих стабильной устойчивостью ко всем примененным концентрациям фосфинотрицина. Для полной характеристики этих клонов запланированы полевые испытания. Растения линий *GS* показали устойчивость лишь к сублетальным концентрациям гербицида в условиях *in vitro*. Для этих линий необходимо проведение дальнейших исследований метаболизма азота и активности рекомбинантной глутаминсинтетазы.

**Ключевые слова:** трансгенные растения, береза, ген *bar*, ген *gs1*, фосфинотрицин, устойчивость.

Фосфинотрицин (ФФТ) — гербицид, ингибирующий работу фермента глутаминсинтетазы (ГС; КФ 6.3.1.2), вследствие чего в клетках растения накапливаются ионы аммония, приводящие к остановке фотосинтеза и гибели растения. Повышения устойчивости растений к гербициду можно достичь либо суперэкспрессией фермента ГС, либо экспрессией фермента, деградирующего ФФТ.

Для создания новых линий березы (*Betula pubescens*, генотип бп3f1) проведен ряд агробактериальных трансформаций генами фосфинотрицинацетилтрансферазы *bar* и глутаминсинтетазы сосны *gs1*. Применялись бинарные векторы *pGS* с геном *gs1* и *pVIBar* с геном *bar* под контролем *35S* промотора. Присутствие целевых генов было подтверждено методом ПЦР у 25 линий *gs* и 5 линий *bar*.

В условиях *in vitro* испытывались три линии *gs* при концентрациях 0,1 и 0,5 мг/л и все линии *bar* при концентрациях до 10 мг/л на предмет устойчивости к ФФТ. У нетрансгенной линии при выращивании на среде с 0,1 мг/л ФФТ (сублетальная доза) значительно уменьшились ростовые показатели. При концентрации 0,5 мг/л растения погибали — летальная доза. У линии

F14GS9a наблюдался аналогичный уровень угнетения. У двух других линий с геном *gs1* (F14GS13a, F14GS16b) он был достоверно ниже лишь при концентрации ФФТ 0,1 мг/л. Ростовые характеристики линий *bar* во всем диапазоне концентраций не отличались от контрольного варианта культивирования.

Эксперимент по оценке устойчивости линий к ФФТ в условиях защищенного грунта провели путем нанесения на листья препаратов в концентрациях от 0 до 30 мг/л. В качестве контроля использовали нетрансгенные растения. Линии растений *GS* поражались при всех концентрациях гербицида, как и контрольные растения. Линии *BAR* показали значительную устойчивость к действию ФФТ. На их листьях полностью отсутствовали признаки поражения.

В результате исследований впервые получено 5 трансгенных линий березы с геном *bar*, обладающих стабильной устойчивостью ко всем примененным концентрациям ФФТ. Для полной характеристики этих клонов запланированы полевые испытания. Растения линий *GS* показали устойчивость лишь к сублетальным концентрациям гербицида в условиях *in vitro*. Для этих линий необходимо проведение дальнейших исследований метаболизма азота и активности рекомбинантной глутаминсинтетазы.

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

© 2011 г. Салмова М.А., Закарючкина Д.С., Шадрина Т.Е., Шестибратов К.А.

\* Автор для переписки:

Салмова Маргарита Анатольевна, аспирант, Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова 142290, Московская область, Пушино г., пр-т Науки, 6  
Тел.: +7 (4967) 33-09-66  
E-mail: mak401@gmail.com

## TRANSGENIC FORMS WITH BIRCH GENES *BAR* AND *GS1*, RESISTANT TO SUBLETHAL AND LETHAL DOSES OF PHOSPHINOTHRICIN

M.A. SALMOVA<sup>1,2</sup>, D.S. ZAKARYUCHKINA<sup>3</sup>, T.E. SHADRINA<sup>1</sup>, K.A. SHESTIBRATOV<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Branch of M.M. Shemyakin and Ju.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,*

<sup>2</sup> *Pushchino State University, Pushchino,*

<sup>3</sup> *Russian State Agrarian University – MTAA named after K.A. Timiryazev, Moscow*

First obtained five transgenic lines of birch with the gene *bar*, with a stable resistance to all applied concentrations of phosphinothricin. For a complete characterization of these clones are planned field trials. Plants *GS* lines showed resistance only to sublethal concentrations of herbicide in the conditions *in vitro*. For these lines is necessary to conduct further studies of nitrogen metabolism and activity of recombinant glutamine synthetase.

*Keywords:* transgenic plants, birch, gene *bar*, gene *gs1*, phosphinothricin, sustainability.

## ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОМА ШИРОКОГО СПЕКТРА ТОКСИГЕННЫХ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM*

А.А. СТАХЕЕВ\*, С.К. ЗАВРИЕВ

Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Был проведен мультилокусный анализ с помощью метода ПЦР, а также RAPD-анализ штаммов 11 видов грибов рода *Fusarium* 4 секций *Discolor*, *Sporotrichiella*, *Gibbosum*, *Roseum* из различных регионов России и ряда сопредельных государств. На основании секвенирования участков гена фактора элонгации трансляции 1 альфа ( $TEF1\alpha$ ) и межгенных спейсеров рибосомальной ДНК были впервые сконструированы праймеры, обеспечивающие специфичную детекцию видов *F. torulosum* и *F. equiseti*. Сравнение последовательностей нуклеотидов генов бета-тубулина, межгенных спейсеров рДНК, фактора элонгации трансляции, а также ряда отсекуемых продуктов RAPD позволило определить степень филогенетической близости исследуемых видов и разработать специфичные маркеры.

**Ключевые слова:** геном, полиморфизм, ПЦР-метод, RAPD-анализ, грибы, род *Fusarium*.

Фузариоз колоса является распространенным по всему миру заболеванием злаковых, наносящим существенный ущерб урожаю и качеству сельскохозяйственной продукции. Большинство видов грибов рода *Fusarium* является продуцентами целого спектра микотоксинов, таких как деоксиниваленол (ДОН), диацетоксисцирпенол (ДАС), Т-2 и НТ-2 токсины, энниатины, монилиформин, зеараленон, накопление которых в зерне делает его непригодным для производства продуктов питания и кормов. Изучение полиморфизма генома возбудителей фузариоза и разработка специфических ДНК-маркеров необходима как для их идентификации и диагностики, так и для фундаментальных исследований структурной и функциональной организации генома этих фитопатогенов.

Был проведен мультилокусный анализ с помощью метода ПЦР, а также RAPD-анализ штаммов 11 видов грибов рода *Fusarium* 4 секций: *Discolor* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*), *Sporotrichiella* (*F. sporotrichioides*, *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. tricinctum*), *Gibbosum* (*F. equiseti*) и *Roseum* (*F. avenaceum*, *F. acuminatum*) из различных регионов России и ряда сопредельных государств от северной и восточной Европы до КНР. Также были ис-

следованы штаммы вида *F. torulosum*, впервые обнаруженного на территории России в 2009 году, и *F. anguioides*, таксономический статус которого до сих пор не ясен.

На основании секвенирования участков гена фактора элонгации трансляции 1 альфа ( $TEF1\alpha$ ) и межгенных спейсеров рибосомальной ДНК были впервые сконструированы праймеры, обеспечивающие специфичную детекцию видов *F. torulosum* и *F. equiseti*. С помощью трех стандартных декамерных праймеров впервые получены спектры RAPD-амплификации ДНК этих видов. Сравнение последовательностей нуклеотидов генов бета-тубулина, межгенных спейсеров рДНК, фактора элонгации трансляции, а также ряда отсекуемых продуктов RAPD позволило определить степень филогенетической близости исследуемых видов и разработать специфичные маркеры.

На основе полученных результатов разработаны и оптимизированы диагностические наборы, специфичные либо к отдельным видам, либо к группам видов, характеризующихся сходными спектрами продуцируемых микотоксинов. Эти наборы дают возможность с высокой точностью и надежностью проводить анализ зерна и продуктов его переработки на зараженность токсигенными грибами рода *Fusarium*.

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

© 2011 г. Стахеев А.А., Завриев С.К.

\* **Автор для переписки:**

Стахеев Александр Александрович, аспирант,  
Институт биоорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10  
Тел.: +7 (495) 336-45-11  
E-mail: a\_stakheev@mail.ru

## THE STUDY OF POLYMORPHISM IN THE GENOME WIDE RANGE OF TOXIGENIC FUNGI OF THE GENUS FUSARIUM

A.A. STAHEEV, S.K. ZAVRIEV

*M.M. Shemyakin and Ju.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*

Multilocus analysis was performed using PCR and RAPD-analysis of 11 strains of *Fusarium* species of fungi 4 sections *Discolor*, *Sporotrichiella*, *Gibbosum*, *Roseum* from various regions of Russia and several neighboring states. Based on the sequencing of parts of the gene translation elongation factor 1 alpha (TEF1 $\alpha$ ) and intergenic spacers of ribosomal DNA primers were first designed to ensure specific detection of *F. torulosum* and *F. equiseti*. Comparison of the nucleotide sequences of genes of beta-tubulin intergenic spacers of rDNA, translation elongation factor, as well as a number of RAPD products sequencing possible to determine the degree of phylogenetic proximity of the studied species and to develop specific markers.

*Keywords:* genome, polymorphism, PCR method, RAPD-analysis, fungi, genus *Fusarium*.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНХАНСЕРНОЙ АКТИВНОСТИ ДЛИННОГО КОНЦЕВОГО ПОВТОРА ЭНДОГЕННОГО РЕТРОВИРУСА СЕМЕЙСТВА HERV-K(HML-2) И МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ЕГО РАБОТЫ

М.В. СУНЦОВА\*, Е.В. ГОГВАДЗЕ, А.А. БУЗДИН

*Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

С помощью генно-инженерных конструкций на основе промоторной области гена *PRODH1* был исследована энхансерная активность LTR в ряде клеточных линий. В культуре клеток тератокарциномы Tera-1 LTR оказывает значительный энхансерный эффект на данный промотор. Это коррелирует с данными об экспрессии гена пролиндегидрогеназы *in vivo*, который наиболее активно экспрессируется в линии Tera-1. При исследовании образцов тканей человека, выяснилось, что наивысший уровень экспрессии этого гена достигается в образцах мозга.

*Ключевые слова:* эндогенный ретровирус, семейство HERV-K(HML-2).

Семейство эндогенных ретровирусов (ЭРВ) HERV-K(HML-2) — единственная группа, содержащая человекоспецифичных представителей, которые во многом сохранили транскрипционный потенциал. Так, минимум половина представителей группы человекоспецифичных ЭРВ обнаруживает транскрипционную активность в различных тканях человека. Длинные концевые повторы (Long terminal repeats, LTR) ЭРВ содержат регуляторные элементы, необходимые для формирования ретровирусных транскриптов, но благодаря их наличию LTR могут оказывать влияние на близлежащие гены. На расстоянии 2,2 тысячи пар оснований от точки начала транскрипции гена пролиндегидрогеназы *PRODH1* находится провирус семейства HERV-K(HML-2). *PRODH1* участвует в метаболизме пролина и синтезе ряда нейромедиаторов, также этот ген связывают с развитием шизофрении и других нейродегенеративных заболеваний.

В настоящей работе с помощью генноинженерных конструкций на основе промоторной области гена *PRODH1* была исследована энхансерная активность LTR в ряде клеточных линий. В культуре клеток тератокарциномы Tera-1 LTR оказывает значительный эн-

хансерный эффект на данный промотор. Это коррелирует с данными об экспрессии гена пролиндегидрогеназы *in vivo*, который наиболее активно экспрессируется в линии Tera-1.

При исследовании образцов тканей человека выяснилось, что наивысшего уровня экспрессия этого гена достигает в образцах мозга. Бисульфитное секвенирование LTR и CpG-островка, находящегося в регуляторной зоне гена, показало, что CpG-островок деметилирован во всех исследованных образцах, тогда как LTR деметилирован только в тератокарциноме и некоторых образцах мозга. Следовательно, LTR может выступать в качестве тканеспецифичного энхансера этого гена *in vivo*.

При анализе потенциальных сайтов связывания факторов транскрипции в составе LTR и данных о дифференциально экспрессирующихся генах в образцах клеточных линий и тканей человека нами были выбраны транскрипционные факторы Sox2 и NF-карраВ1 в качестве потенциальных регуляторов. В опытах с трансфекцией клеточных линий Tera-1 и NT2/D1 обнаружено, что добавление Sox2 усиливает энхансерный эффект LTR в несколько раз в обеих тканях, а добавление NF-карраВ1 не оказывает влияния. Таким образом, транскрипционный фактор Sox2 может участвовать в регуляции работы LTR.

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

© 2011 г. М.В. Сунцова, Е.В. Гогвадзе, А.А. Буздин

\* **Автор для переписки:**

Сунцова Мария Владимировна, аспирант,  
Институт биоорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10  
Тел.: +7 (495) 727-38-63  
E-mail: suntsova86@mail.ru

## **INVESTIGATION OF ENHANCER ACTIVITY LONG TERMINAL REPEAT OF ENDOGENOUS RETROVIRUS FAMILY HERV-K (HML-2) AND THE REGULATORY MECHANISMS OF ITS WORK**

M.V. SUNTSOVA, E.B. GOGVADZE, A.A. BUZDIN

*M.M. Shemyakin and Ju.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*

With the help of genetic engineering structures based on the promoter region of the gene was investigated PRODHI LTR enhancer activity in several cell lines. In cell culture teratocarcinoma Tera-1 LTR enhancer exerts a significant effect on this promoter. This correlates with data on proline dehydrogenase gene expression in vivo, which is most actively expressed in the line Tera-1. In the study of human tissue samples revealed that the highest level of expression of this gene is achieved in samples of brain.

*Keywords:* endogenous retrovirus, family HERV-K (HML-2).

## ОСОБЕННОСТИ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНА *MDR1* ПРИ ЛЕЙКОЗАХ. НОВЫЙ ПОДХОД К ИНДУЦИРОВАННОМУ CpG-МЕТИЛИРОВАНИЮ ГЕНОМА ДЛЯ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ

С.В. ТАРЛАЧКОВ<sup>1,2\*</sup>, О.В. ДЬЯЧЕНКО<sup>1</sup>, Д.В. МАРИНИЧ<sup>3</sup>, Т.В. ШЕВЧУК<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Филиал Учреждения Российской академии наук Института биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова,

<sup>2</sup> Пушчинский государственный университет, Пушкино;

<sup>3</sup> ГУ Республиканский научно-практический центр гематологии  
и трансфузиологии, Минск, Беларусь

Проведен анализ уровня метилирования гена *MDR1* в норме и при различных формах лейкозов. Выявлено, что CpG-гиперметилирование промотора гена *MDR1* более характерно для острой лимфоидной лейкемии, чем для хронической фазы и миелодиспластического синдрома. Впервые обнаружено метилирование CCWGG-сайтов промотора гена *MDR1* в норме и снижение его уровня в ходе прогрессирования заболевания. Для разработки пути индуцированного CpG-метилирования ДНК нами получена генетическая конструкция, содержащая ген бактериальной ДНК-метилтрансферазы HhaI, слитый с геном зеленого флуоресцентного белка (GFP), и модифицированная добавлением последовательностей сигнала ядерной локализации и сигнала переноса через клеточную мембрану.

**Ключевые слова:** ген *MDR1*, CpG-метилирование, лейкозы.

При лечении онкологических заболеваний применение новых классов химиопрепаратов позволяет существенно улучшить состояние пациентов. Одним из факторов, препятствующих эффективной химиотерапии, является фенотип множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Развитию синдрома МЛУ способствует повышенный уровень экспрессии гена *MDR1* (multi-drug resistance) вследствие снижения уровня CpG-метилирования его промоторной области. Несмотря на то, что промотор гена *MDR1* представляет собой типичный CpG-островок, эта область обогащена последовательностями CCWGG — потенциальными мишенями для CpHrG-метилирования ДНК (H=A, T, C). Однако до настоящего времени анализ метилирования последовательностей CCWGG в этой области гена *MDR1* не проводился.

Авторами проведен анализ уровня метилирования гена *MDR1* в норме и при различных формах лейкозов. Выявлено, что CpG-гиперметилирование промотора гена *MDR1* более характерно для острой лимфоидной лейкемии, чем для хронической фазы и миелодиспластического синдрома. Впервые обнаружено метилирование CCWGG-сайтов промотора гена *MDR1* в норме и снижение его уровня в ходе прогрессирования заболевания. Полученные данные могут найти применение для диагностики лейкемий и в изучении механизмов развития опухолевого процесса при различных формах лейкозов.

В настоящее время в химиотерапии онкологических заболеваний используют 5-азацитидин для деметилирования генов-супрессоров опухолей. В то же время практически не реализован альтернативный путь — направленное метилирование онкогенов.

Для разработки пути индуцированного CpG-метилирования ДНК нами получена генетическая конструкция, содержащая ген бактериальной ДНК-метилтрансферазы HhaI, слитый с геном зеленого флуоресцентного белка (GFP), и модифицированная добавлением последовательностей сигнала ядерной локализации и сигнала переноса через клеточную мембрану. Кодированный этой конструкцией белок был выделен из клеток *E. coli*. Для очищенного белка было показано

© 2011 г. Тарлачков С.В., Дьяченко О.В.,  
Маринич Д.В., Шевчук Т.В.

\* **Автор для переписки:**

Тарлачков Сергей Владимирович, аспирант,  
Филиал Института биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
142290 Московская область, Пушкино г., пр-т Науки, 6  
Тел.: +7 (4967) 33-09-70  
E-mail: serj621@yandex.ru

сохранение ДНК-метилтрансферазной активности и подтверждена его способность проникать в цитоплазму культивируемых клеток человека *in vitro*.

Полученная конструкция может найти применение в исследовании функциональной роли CpG-метилирования генома и в эпигенной терапии онкологических заболеваний.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№09-04-00889).*

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

## FEATURES OF METHYLATION OF THE MDR1 GENE IN LEUKEMIA. A NEW APPROACH TO INDUCED CpG-METHYLATION OF THE GENOME FOR BIOLOGY AND MEDICINE

S.A. TARLACHKOV<sup>1, 2</sup>, O.V. DYACHENKO<sup>1</sup>, D.V. MARINICH<sup>3</sup>, T.V. SHEVCHUK<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Branch of M.M. Shemyakin and Ju.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,*

<sup>2</sup> *Pushchino State University, Pushchino,*

<sup>3</sup> *State Republican Scientific Practical Center of Hematology and Blood Transfusion, Minsk, Belarus*

The analysis of the methylation level of *MDR1* gene in normal and various forms of leukemia. Revealed that the CpG-hypermethylation of the *MDR1* gene promoter is more typical for acute lymphoid leukemia than for chronic phase, and myelodysplastic syndrome. First detected methylation sites CCWGG-promoter of *MDR1* gene in normal and reduced its level in the progression of the disease. To develop ways of CpG-induced DNA methylation we have obtained genetic construct containing a gene for a bacterial DNA methyltransferase HhaI, a fusion gene of green fluorescent protein (GFP), and modified by adding a signal sequence the nuclear localization and signal transfer across the cell membrane.

*Keywords:* gene *MDR1*, CpG-methylation, leukemia.

УДК 577.1

## АНАЛИЗ ЭНХАНСЕРНЫХ РНК И МОДИФИКАЦИЙ ХРОМАТИНА В ТРАНСФЕЦИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ S2 DROSOPHILA MELANOGASTER, СОДЕРЖАЩИХ РЕПОРТЕРНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ

Д.М. ФЕДОСЕЕВА\*, О.В. КРЕТОВА, Н.А. ЧУРИКОВ

Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,  
Москва

В настоящей работе впервые проанализированы энхансерные РНК (эРНК) дрозофилы, а также изучено влияние энхансера на структурно-функциональное состояние хроматина. Старты транскрипции эРНК (TSS) были обнаружены на различном расстоянии от энхансера, однако большая часть TSS эРНК приходится на область R3, удаленную от энхансера на 265 п.н. Полученные данные подтверждают гипотезу авторов, согласно которой, энхансер функционирует в основном опосредованно, эпигенетически, через модификации хроматина в области, удаленной от энхансера на 265 п.н.

*Ключевые слова:* энхансерные РНК, хроматин, трансфицированные клетки S2, *Drosophila melanogaster*.

Механизмы работы энхансеров и инсуляторов до сих пор не выяснены. В последние годы было показано, что индукция синтеза некодирующих РНК осуществляется в обе стороны от энхансера и примерно соответствует уровню транскрипции контролируемого энхансером гена.

В настоящей работе авторами впервые проанализированы энхансерные РНК (эРНК) дрозофилы, а также изучено влияние энхансера на структурно-функциональное состояние хроматина. В ходе исследования с использованием репортерных генетических конструкций было определено, что размеры некодирующих РНК варьируют в пределах от 300 до 1050 п.н. Старты транскрипции эРНК (TSS) были обнаружены на различном расстоянии от энхансера, однако большая часть TSS эРНК приходится на область R3, удаленную от энхансера на 265 п.н., что было независимо подтверждено в предварительных экспериментах 5'RACE и primer extension.

Для исчерпывающей характеристики TSS эРНК подготовлена и охарактеризована проба для «глубокого» секвенирования. В последовательности самого энхансера

было выявлено лишь небольшое количество TSS эРНК. Добавление инсулятора между энхансером и промотором приводит к заметному подавлению синтеза всех наблюдаемых эРНК. Подобное распределение TSS, вероятно, обеспечивается энхансерными белками и белковыми комплексами, которые, связываясь с энхансером, вызывают образование петель ДНК и модификации хроматина на расстоянии 265 п.н. от энхансера. Эти модификации и служат основными сигналами старта транскрипции эРНК РНК-полимеразой II.

С использованием модельной системы, которая исключает влияние регуляторных элементов геномного окружения, было выяснено, что сами энхансеры приобретают характерные метки хроматина — H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac и H3K18ac. В районе R3 конструкций, где найдена основная часть TSS, энхансер вызывает модификации H3K4me3 и H3K18ac. Инсулятор же в этом районе уменьшает содержание данных модификаций и вызывает увеличение количеств модификаций H3K4me1 и H3K27ac.

Полученные данные подтверждают гипотезу авторов, согласно которой, энхансер функционирует в основном опосредованно, эпигенетически, через модификации хроматина в области, удаленной от энхансера на 265 п.н.

© 2011 г. Федосеева Д.М., Кретова О.В., Чуриков Н.А.

\* **Автор для переписки:**

Федосеева Дарья Михайловна, аспирант,  
Учреждение Российской академии наук  
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН  
119991 Москва, ул. Вавилова, 32  
Тел: +7 (499) 135-97-02  
E-mail: dfedoseeva86@yandex.ru

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

*Автор Д.М. Федосеева отмечена премией.*

**ANALYSIS OF ENHANCER RNAs AND CHROMATIN MODIFICATIONS  
IN TRANSFECTED CELLS S2 DROSOPHILA MELANOGASTER,  
CONTAINING REPORTER GENETIC CONSTRUCTS**

D.M. FEDOSEEVA, O.V. KRETOVA, N.A. CHURIKOV

*V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow*

In this paper we first analyzed the enhancer RNAs (eRNA) *Drosophila*, and also studied the effect of enhancer on the structural and functional state of chromatin. Transcription start eRNA (TSS) were found at different distances from the enhancer, but most of the TSS eRNA occurs in the region R3, remote from the enhancer at 265 bp. These data support the hypothesis the authors, according to which the enhancer operates primarily indirectly, epigenetically through chromatin modification in a region remote from the enhancer at 265 bp.

*Keywords:* enhancer RNAs, chromatin, transfected cells S2, *Drosophila melanogaster*.

## МЕМБРАНОМОДЕЛИРУЮЩИЕ СРЕДЫ ДЛЯ БЕСКЛЕТОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ: МИЦЕЛЛЫ ДЕТЕРГЕНТОВ, БИЦЕЛЛЫ, ЛИПОСОМЫ И ЛИПИД-БЕЛКОВЫЕ НАНОДИСКИ

Н.Ф. ХАБИБУЛЛИНА<sup>1,2\*</sup>, Е.Н. ЛЮКМАНОВА<sup>1</sup>, Э.О. ШЕНКАРЕВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,

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

На основании полученных данных можно сделать вывод, что использование липид-белковых нанодисков является наиболее перспективным для бесклеточной продукции мембранных белков в нативной конформации и открывает новые возможности для структурно-функциональных исследований этих белков.

**Ключевые слова:** мембранные белки, бесклеточная продукция, мембраномоделирующие среды.

Одна из основных трудностей в исследованиях мембранных белков (МБ) связана с продукцией этих молекул в нативной конформации, сохраняющей функциональную активность. Эти белки могут обладать природной пространственной структурой только в присутствии биологической мембраны или подходящей мембраномоделирующей среды (мембранного миметика). Бесклеточные системы синтеза (БСС) являются альтернативой традиционно используемым для продукции рекомбинантных белков системам, основанным на клеточной экспрессии. БСС имеют несколько преимуществ, позволяют синтезировать белки, токсичные для живых клеток, а также использовать различные кофакторы, лиганды, способствующие синтезу белка в нативной конформации. Для продукции МБ в растворимой форме отдельные компоненты мембраномоделирующих сред могут быть добавлены в трансляционную смесь (ТС).

В настоящей работе проведено сравнение классических мембранных миметиков, таких как мицеллы детергентов, бицеллы и липосомы, и новой мембраномоделирующей среды — липид-белковых нанодисков (ЛБН) — по способности обеспечивать бесклеточный синтез МБ с нативной пространственной структурой.

В исследовании были использованы три белка с различной топологией: гомодимер трансмембранного (ТМ) домена рецепторной тирозинкиназы ErbB3 человека (ТМ-ErbB3, 1 ТМ), вольт-сенсорный домен K<sup>+</sup>-канала бактерии *Aeropyrum pernix* (ВСД, 4 ТМ) и бактериородопсин из археи *Exiguobacterium sibiricum* (ESR, 7 ТМ).

Синтез в присутствии мицелл детергентов приводил к значительному повышению растворимости МБ (1,0–2,0 мг/мл ТС), однако ни в одном из случаев не удалось получить белок в нативной конформации. Добавление в ТС бицелл дало возможность получить ТМ-ErbB3 и ESR в растворимом и структурированном виде, хотя и со значительно более низким выходом по сравнению с мицеллами детергентов. При добавлении в ТС нанодисков происходило значительное увеличение выхода синтеза МБ в растворимой форме. Использование нанодисков позволило синтезировать ESR и ТМ-ErbB3 с нативной структурой с выходом 1,0–1,8 мг/мл ТС. Ни один из тестируемых мембранных миметиков не смог обеспечить синтез ВСД с нативной структурой, что потребовало разработки протокола ренатурации домена из осадка ТС.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что использование ЛБН является наиболее перспективным для бесклеточной продукции МБ в нативной конформации и открывает новые возможности для структурно-функциональных исследований этих белков.

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

© 2011 г. Хабибуллина Н.Ф., Люкманова Е.Н., Шенкарев Э.О.

\* **Автор для переписки:**

Хабибуллина Нелли Хамзуловна, аспирант,

Институт биоорганической химии

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Тел.: +7 (495) 330-69-83

E-mail: nelyakhabibullina@gmail.com

**MEMBRANE-MODELING ENVIRONMENT FOR CELL-FREE PRODUCTION  
OF MEMBRANE PROTEINS: MICELLES OF DETERGENTS, BICELLES,  
LIPOSOMES AND LIPID-PROTEIN NANODISKS**

N.F. HABIBULLINA<sup>1,2</sup>, E.N. LYUKMANOVA<sup>1</sup>, Z.O. SHENKAREV<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *M.M. Shemyakin and Ju.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,*

<sup>2</sup> *Moscow State University named after M.V. Lomonosov, Moscow*

Based on obtained data we can conclude that the use of lipid-protein nanodisks is the most promising for the cell-free production of membrane proteins in native conformation and opens up new opportunities for structural and functional studies of these proteins.

*Keywords:* membrane proteins, cell-free products, membrane-modeling environment.

# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ $\alpha$ -КЕТОГЛУТАРОВОЙ КИСЛОТЫ

М.Н. ЧИГЛИНЦЕВА\*, С.В. КАМЗОЛОВА, И.Г. МОРГУНОВ

Учреждение Российской академии наук, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов  
им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино

Разработана технология синтеза  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты (КГК) с помощью дрожжей *Yarrowia lipolytica*. При всех значениях рН среды (от 3,0 до 8,0) *Y. lipolytica* хорошо росла и синтезировала КГК, интенсивное кислотообразование наблюдалось в интервале рН=3,5–6,0. Рост и биосинтез КГК зависят от уровня насыщения среды кислородом, концентрации этилового спирта и микроэлементов. Максимальный синтез КГК происходил только в условиях интенсивной аэрации среды, при концентрациях в среде ионов  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  и этанола, равных 0,3 мг/л, 1,2 мг/л и 1,6 г/л, соответственно. Биосинтез КГК не зависел от содержания азота в среде. При оптимальных условиях продуцент способен синтезировать 88,7 г/л КГК с выходом 69,97%.

*Ключевые слова:*  $\alpha$ -кетоглутаровая кислота, микробиологический синтез.

$\alpha$ -Кетоглутаровая кислота (КГК) играет ключевую роль в метаболизме каждой живой клетке. КГК является метаболитом ЦТК, а также участвует в белковом и аминокислотном метаболизме. В химической промышленности КГК применяется как исходное сырье для производства различных полимеров, в пищевой — как пищевая добавка и консервирующий агент.

В последние годы КГК стала применяться в здравоохранении при противоопухолевой терапии, лечении шизофрении, алкоголизма и других социально значимых заболеваний, а также в клинической практике для диагностики. Современная спортивная медицина рассматривает КГК в качестве перспективного анаболического средства.

В промышленном масштабе КГК получают методом химического синтеза. Препараты, полученные химическим синтезом, содержат примеси тяжелых металлов и не могут применяться в медицине без дополнительной дорогостоящей очистки. Сейчас наиболее перспективным рассматривается микробиологический синтез КГК, при котором произведенный продукт характеризуется высокой чистотой.

Целью настоящей работы была разработка технологии синтеза КГК с помощью дрожжей *Yarrowia lipolytica*. В качестве источника углерода был выбран этанол. Как субстрат для производства этанол обладает рядом преимуществ. Этанол — это возобновляемое сырье, практически не содержит вредных примесей, что позволяет использовать препараты КГК в медицине и пищевой промышленности.

Показано, что условия культивирования продуцента (рН среды, концентрация растворенного кислорода) и состав питательной среды (концентрация азота, этанола и ионов  $Zn^{2+}$  и  $Fe^{2+}$ ) определяют качественный и количественный состав экскретируемых веществ. При всех значениях рН среды (от 3,0 до 8,0) *Y. lipolytica* хорошо росла и синтезировала КГК, интенсивное кислотообразование наблюдалось в интервале рН=3,5–6,0. Рост и биосинтез КГК зависят от уровня насыщения среды кислородом, концентрации этилового спирта и микроэлементов.

Максимальный синтез КГК происходил только в условиях интенсивной аэрации среды, при концентрациях в среде ионов  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  и этанола, равных 0,3 мг/л, 1,2 мг/л и 1,6 г/л, соответственно. Биосинтез КГК не зависел от содержания азота в среде. При оптимальных условиях продуцент способен синтезировать 88,7 г/л КГК с выходом 69,97%.

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пущино, 14–17 ноября 2011 г.).*

© 2011 г. Чиглинцева М.Н., Камзолова С.В., Моргунов И.Г.

\* **Автор для переписки:**

Чиглинцева Мария Николаевна, магистрант,

Учреждение Российской академии наук

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов

им. Г.К. Скрыбина РАН

142290 Московская область, Пущино, пр-т Науки, 5

Тел: +7 (496) 731-60-48

E-mail: Chiglintseva.mariya@gmail.com

## MICROBIOLOGICAL SYNTHESIS OF $\alpha$ -KETOGLUTARIC ACID

M.N. CHIGLINTSEVA, S.V. KAMZOLOVA, I.G. MORGUNOV

*G.K. Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino*

The technology of synthesis of  $\alpha$ -ketoglutaric acid (KGA) using the yeast *Yarrowia lipolytica*. For all values of pH (from 3.0 to 8.0) *Y. lipolytica* grew well and synthesized KGA, the intense acid formation was observed at pH=3.5–6.0. Growth and biosynthesis of KGA depend on the level of saturation of the medium with oxygen, the concentration of ethyl alcohol and trace elements. Maximum synthesis of KGA occurred only under conditions of intensive aeration of the medium, at concentrations in the environment of the ions  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  and ethanol equal to 0.3 mg/l, 1.2 mg/l and 1.6 g/l, respectively. Biosynthesis of the KGA does not depend on the content of nitrogen in the environment. Under optimal conditions, a producer is able to synthesize 88.7 g/l with the release of KGA 69.97%.

*Keywords:*  $\alpha$ -ketoglutaric acid, microbial synthesis.

## ИММУНОАНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ МОНИТОРИНГА ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА И ТЕРМОЛАБИЛЬНОГО ЭНТЕРОТОКСИНА *E. COLI* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Н.С. ШОШИНА\*, М.А. СИМОНОВА, Е.Э. ПЕТРОВА, О.Е. ЛАХТИНА,  
Р.Л. КОМАЛЕВА, Т.И. ВАЛЯКИНА

*Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

Создана диагностическая тест-система родственных токсинов: холерного токсина и термолабильного энтеротоксина *E. coli* (СТ и LT) на основе мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа по технологии xMAP (Luminex) с пределом детекции менее 1 нг/мл. Чувствительность детекции СТ и LT в модельном буфере составила 0,01 и 0,1 нг/мл, соответственно. Определение СТ и LT в пробах смывов носоглотки человека и молоке при использовании тех же моноклональных антител, что и при определении методом ИФА в формате сэндвич-ELISA, не показало изменения предела детекции СТ.

**Ключевые слова:** холерный токсин, термолабильный энтеротоксин *E. coli*, мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ, моноклональные антитела.

Современная биология использует новейшие высокотехнологичные инструментальные методы анализа, к числу которых относится метод мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа (МИА).

Задачей настоящей работы явилось создание диагностической тест-системы родственных токсинов: холерного токсина и термолабильного энтеротоксина *E. coli* (СТ и LT) на основе МИА по технологии xMAP (Luminex) с пределом детекции менее 1 нг/мл. Гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела (МА) к СТ и LT, были получены при слиянии клеток миеломы SP2/0 и лимфоцитов подколенных лимфатических узлов мышей BALB/c, иммунизированных СТ и LT. Из панелей МА, полученных методом ИФА в формате сэндвич-ELISA, были отобраны пары антител, адекватные для проведения тестирования заданного токсина. Антитела к каждому из токсинов не обладали перекрестной активностью с другим исследуемым токсином (СТ или LT соответственно) и имели достаточно высокую

константу аффинности ( $>1,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ). Был определен тип тяжелых цепей для каждого из отобранных МА. В образцах биологической природы (молоке и смывах носоглотки) чувствительность детекции СТ не изменялась, а LT — снижалась по сравнению с чувствительностью определения токсинов в модельном буфере.

Для создания тест-системы на основе МИА по технологии xMAP, позволяющей одновременно в одной пробе детектировать СТ и LT, были отобраны пары МА, детектирующие токсины с наибольшей чувствительностью и минимальными фоновыми сигналами. Показано, что чувствительность детекции СТ и LT в модельном буфере составила 0,01 и 0,1 нг/мл, соответственно, что на 1–2 порядка превышает чувствительность детекции этих токсинов в формате сэндвич-ELISA. Определение СТ и LT в пробах смывов носоглотки человека и молоке при использовании тех же МА, что и при определении методом ИФА в формате сэндвич-ELISA, не показало изменения предела детекции СТ, тогда как для LT наблюдалось снижение чувствительности в пробах с молоком до 3 нг/мл и смывах носоглотки до 1 нг/мл. Данный факт объясняется, по-видимому, наличием у МА к LT способности неспецифически связываться с эндогенными гетерологичными антителами в образцах молока.

© 2011 г. Шошина Н.С., Симонова М.А., Петрова Е.Э.,  
Лахтина О.Е., Комалева Р.Л., Валякина Т.И.

\* **Автор для переписки:**

Шошина Наталья Сергеевна, мл.н.с.,

Учреждение Российской академии наук

Институт биоорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Тел.: +7 (495) 335-35-22

E-mail: valyakina@ibch.ru

*Материалы Научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.).*

## IMMUNOANALYTIC METHODS FOR MONITORING CHOLERA TOXIN AND HEAT-LABILE ENTEROTOXIN *E. COLI* USING MONOCLONAL ANTIBODIES

N.S. SHOSHINA, M.A. SIMONOVA, E.E. PETROVA, O.E. LAKHTINA,  
R.L. KOMALEVA, T.I. VALYAKINA

*M.M. Shemyakin and Ju.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*

Established diagnostic test-system of related toxins: cholera toxin and heat-labile enterotoxin *E. coli* (CT and LT) based multiplexed immunofluorescent analysis on the technology xMAP (Luminex) with a detection limit of less than 1 ng/ml. Sensitivity of detection of CT and LT in model buffer was 0.01 and 0.1 ng/ml, respectively. Determination of CT and LT in samples of human nasal washings and milk using the same monoclonal antibody as the ELISA when determining the format of sandwich-ELISA, showed no change in the limit of detection of CT.

*Keywords:* cholera toxin, heat-labile enterotoxin *E. coli*, multiplexed immunofluorescence analysis, monoclonal antibodies.

## СОБЫТИЯ ВТОРОЙ ПОЛОВИНЫ 2011 ГОДА

## Некролог

Памяти Х.Г. Кораны\*  
(1922–2011)

**9 ноября 2011 года** в возрасте 89 лет скончался Хар Гобинд Корана, один из выдающихся ученых XX столетия, внесший большой вклад в развитие молекулярной биологии. Это произошло в местечке Конкорд, штат Массачусетс (США), где было его последнее рабочее место в качестве заслуженного профессора в отставке Массачусетского технологического института.

Х.Г. Корана родился в 1922 году в Британской Индии, в небольшом селении Райпур (Пенджаб) — нынешняя территория Пакистана. Семья принадлежала к сикхам, была многодетной: четыре сына и одна дочь (будущий химик был самым младшим). Свое редкое имя Корана получил в честь шестого гуру сикхов — Гуру Хар Гобинда. Отец состоял сборщиком налогов в британской колониальной администрации. Корана вспоминал в своей автобиографии, написанной в период получения Нобелевской премии в 1968 году: «Несмотря на бедность отец занимался воспитанием детей, и мы практически единственными были грамотными в деревне, в которой проживало около 100 человек».

Биографические сведения о Х.Г. Коране уже приводились в «Вестнике биотехнологии и физико-

химической биологии им. Ю.А. Овчинникова» (2007, Т. 3, № 4, с. 71–72) в связи с 85-летием со дня рождения. Поэтому в некрологе будет уделено внимание другим аспектам его творчества.

Важно понять, как из глухой деревни, заброшенной в далекой Индии, он поднялся к вершинам бурно развивавшейся в XX веке химической науки и принес славу своей великой родине, сравнимую разве что с таковой его не менее знаменитого соотечественника физика Рамана, лауреата Нобелевской премии 1930 года. Некоторые его биографы прибегают к метафоре о «восточной сказке», но быть в данном случае превосходит самые изощренные фантазии сказителей и их почитателей.

Прежде всего, помимо генетических задатков, отличная учеба: в 1943 году он получил степень бакалавра с отличием (в Пенджабском университете), в 1945 г. — степень магистра наук с отличием. Это выделило его среди студентов и способствовало предоставлению государственной стипендии для продолжения образования в метрополии: он был командирован в Ливерпульский университет, где изучал органическую химию под руководством Роджера Бира. Здесь в 1948 году им была защищена диссертация на степень доктора философии, посвященная пигменту виолацеину.

Дальше счастливая звезда вела его от успеха к успеху в разных точках мира. При этом ему довелось работать в самых престижных лабораториях, рядом с выдающимися химиками. В 1948–1949 гг. он занимался исследованием химической структуры алкалоидов в пост-докторантуре в Федеральном технологическом институте Цюриха у Владимира Прелога, будущего лауреата Нобелевской премии (1975 г.). Интересно заметить, что сходный старт в большой науку повторил через 20 лет Ю.А. Овчинников, также стажировавшийся у Прелога, будучи начинающим научным работником.

Конечно, решающую роль в судьбе Кораны сыграла работа в 1949–1952 гг. в Кембридже у Александра Тодда, бывшего в те годы одним из главных авторитетов в английской и мировой химии (также будущим Нобелевским лауреатом 1957 г.). Именно здесь с помощью разработанного им нового метода в соавторстве с Дж. Моффатом молодой индиец в 1949 г. синтезировал ацетилкоэнзим А. Публикация этого факта немедленно сделала его имя известным в профессиональной среде. У Тодда он занимался также изучением нуклеиновых кислот и белков — главной темой своих последующих

\* Материал подготовлен Р.Г. Васильевым и В.И. Трубниковым

фундаментальных исследований. Тодд уже тогда хорошо понимал, что будущее органической химии лежит в сфере наук о жизни.

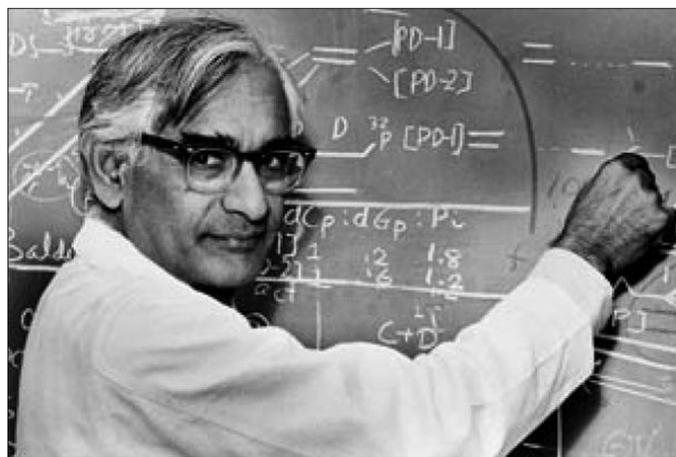


Рис. 1. Х.Г. Корана за чтением лекции

С 1952 года открылась новая эпоха в деятельности Кораны: он покинул евразийский континент и навсегда связал себя с Северной Америкой — сначала с Канадой (Ванкувер), а затем со США. В это время ему удалось сделать очень много, особенно в 1960-е годы, в период расшифровки генетического кода. В 1966 году 44-летний Корана принял гражданство США, так что американские биографы с удовольствием причисляют его к американцам (хотя перед этим он побывал «швейцарцем», «англичанином» и «канадцем»).

1952 год ознаменовался для него кардинальным событием — Корана женился на уроженке Швейцарии Эстер Элизабет Сиблер. Женитьба была очень важна для него, ибо, оторвавшись от своей теплой, экзотической родины, он чувствовал себя одиноким и потерянным в непривычной западной среде. Корана так писал об этом: «Эстер принесла с собой осознание цели жизни в то время, когда я, шесть лет назад покинув родные места, не имел ни дома, ни пристанища». У них родились сын Дейв (1958 г.) и две дочери — Джулия (1953 г.) и Эмилия (1954—1979). Жена умерла раньше мужа (в 2001 году).

В Канаде ученый пробыл 8 лет, работая в Университете Британской Колумбии и занимаясь изучением нуклеиновых кислот, получая пионерские результаты. В 1960 году он перебрался в США, где начал трудиться в Институте исследования ферментов Висконсинского университета (Мэдисон). В 1970 г. Корана стал профессором биологии и химии Массачусетского технологического института (рис. 1), в котором работал до своей отставки в 2007 году.

Именно 1960—1970-е годы стали наиболее продуктивными для Кораны. В этот период он активно включился в так называемую «молекулярно-биологическую гонку», в которой принимали участие лучшие умы того времени (Крик, Очоа, Ниренберг и др.). Речь идет о расшифровке генетического кода, которой занимался ряд коллективов после ошеломляющего открытия М. Ниренбергом и Г. Маттеи полиурацила и синтеза на его матрице полифенилаланина (1961).

Корана с сотрудниками проявили себя здесь с самой наилучшей стороны. Сначала было установлено, что РНК с двумя повторяющимися единицами (UCUCUCU → UCU CUC UCU) продуцирует две чередующиеся аминокислоты. Это в сочетании с экспериментом Ниренберга и Ледера показало, что последовательность нуклеотидов UCU кодирует серин, а CUC — лейцин. РНК с тремя повторяющимися единицами образует три разных последовательности аминокислот. РНК с четырьмя повторяющимися единицами, включая UAG, UAA или UGA, продуцируют только дипептиды и трипептиды, что свидетельствует о том, что UAG, UAA и UGA являются стоп-кодонами.



Рис. 2. Лауреаты Нобелевской премии по физиологии и медицине 1968 г. Слева направо: Р. Холли, М. Ниренберг, Х.Г. Корана

Следует подчеркнуть решающую роль Кораны как химика-синтетика в полной расшифровке генетического кода. Динамика этого процесса была такова: сначала высказался физик (Гамов), затем подключились генетики (Крик и др.), далее — биохимики (Ниренберг, Очоа, Белозерский, Спирин, Жакоб, Моно, Холли и др.), а на завершающей стадии поставил точку Корана с его филигранным мастерством химика-синтетика. Что сделал Корана? Он смог синтезировать короткие фрагменты РНК с заданной последовательностью: сначала

динуклеотиды, а затем — тринуклеотиды. Дальше он стал применять этот метод для более масштабной задачи — синтеза гена. Теперь таким способом с соответствующими усовершенствованиями пользуются для получения искусственных генов и геной инженерии.

Это был существенный вклад в раскрытие генетического кода, что дало повод Нобелевскому комитету вручить в 1968 году Нобелевскую премию главным действующим лицам данного события — Маршаллу Ниренбергу, Роберту Холли и Хар Гобинду Коране (рис. 2).

Очень важными были исследования Кораны, посвященные тРНК. Ему удалось раскрыть вторичную структуру тРНК, напоминающую трехлистный клевер. Им обнаружено, что к хвосту тРНК присоединяется одна из 20 аминокислот. Другой конец тРНК изогнут в виде листа клевера, а средняя часть содержит триплет-антикодон, комплементарный одному из кодонов иРНК. При взаимодействии кодона и антикодона происходит передача принесенной тРНК аминокислоты рибосоме, после чего наступает процесс присоединения данной аминокислоты к строящейся пептидной цепочке.

Найдя свой оригинальный путь на центральной дороге формировавшейся молекулярной биологии, Корана продолжил цепь выдающихся открытий уже после нобелевского триумфа. В 1970 году он с коллегами синтезировал первый искусственный ген (ген аланиновой тРНК дрожжей) — молекулу ДНК, состоящую из 77 нуклеотидов (ими применялся метод с полимеразой и лигазой). Затем им был синтезирован один из генов *E. coli*.

Столь высокая результативность говорит о том, что в лице Кораны воплотился экстраординарный тип ученого, непрестанно мотивированного на первопроходческие исследования, оригинального, изобретательного химика, разрабатывающего новые методы. Есть очень хорошая фотография, изображающая его за работой в лаборатории (рис. 3).

С середины 1970-х годов лаборатория Кораны начала заниматься биохимией мембранного белка бактериородопсина, ответственного за преобразование световой энергии в сетчатке. На этом поле он вступил в соревнование с коллективом, возглавляемым Ю.А. Овчинниковым: российские биохимики в 1978 году чуть-чуть опередили Корану в этой трудной борьбе за приоритет (на несколько месяцев): статья Ю.А. Овчинникова с сотрудниками о полной аминокислотной последовательности бактериородопсина вышла в апрельском номере *FEBS Letters* 1979 года, а статья Х.Г. Кораны с коллегами по этому же вопросу — в октябрьском номере *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (рис. 4А, Б).



Рис. 3. Корана за работой в лаборатории

Биография Кораны окажется неполной, если не будет раскрыта тема его взаимоотношений со специалистами из России и конкретно — с академиком Ю.А. Овчинниковым. В архиве Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН хранятся уникальные фотодокументы, свидетельствующие о тесных контактах между Кораной и Овчинниковым. Один из них представляет их как участников 7-го Международного симпозиума по химии природных соединений в Риге в июне 1970 г. (рис. 5), во время работы которого скоропостижно скончался М.М. Шемякин, после чего Ю.А. Овчинников в качестве его преемника принял на себя нелегкую ношу директорства института и, как оказалось позднее, бремя ответственности за судьбу всей отечественной молекулярной биологии. Корана видел, как профессионально и с энтузиазмом работают биохимики СССР во главе с энергичными молодыми лидерами, полными здорового самолюбия и соревновательного задора. Он хорошо понимал, что на пространстве, где предстоит конкуренция с русскими, нужно будет работать быстро и эффективно. Выше упоминалось, что в случае с бактериородопсином победа оказалась не за ним.

Другим позитивным следствием указанного сотрудничества явилось избрание Х.Г. Кораны иностранным членом Академии наук СССР по Отделению биохимии, биофизики и химии физиологически активных соединений по специальности «органическая химия».

## THE STRUCTURAL BASIS OF THE FUNCTIONING OF BACTERIORHODOPSIN: AN OVERVIEW

Yu. A. OVCHINNIKOV, N. G. ABDULAEV, M. Yu. FEIGINA, A. V. KISELEV and N. A. LOBANOV  
*Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, USSR Academy of Sciences, Moscow 117312, USSR*

Received 12 February 1979

Volume 100, number 2

FEBS LETTERS

April 1979

GLU-ALA-GLN-ILE-THR-GLY-ARG-PRO-GLU-TRP-ILE-TRP-LEU-ALA-LEU-GLY-THR-ALA-LEU-MET-  
40  
GLY-LEU-GLY-THR-LEU-TYR-PHE-LEU-VAL-LYS-GLY-MET-GLY-VAL-SER-ASP-PRO-ASP-ALA-LYS-  
60  
LYS-PHE-TYR-ALA-ILE-THR-THR-LEU-VAL-PRO-ALA-ILE-ALA-PHE-THR-MET-TYR-LEU-SER-MET-  
80  
LEU-LEU-GLY-TYR-GLY-LEU-THR-MET-VAL-PRO-PHE-GLY-GLY-GLU-GLN-ASN-PRO-ILE-TYR-TRP-  
100  
ALA-ARG-TYR-ALA-ASP-TRP-LEU-PHE-THR-THR-PRO-LEU-LEU-LEU-LEU-ASP-LEU-ALA-LEU-LEU-  
120  
VAL-ASP-ALA-ASP-GLU-GLY-THR-ILE-LEU-ALA-ILE-VAL-GLY-ALA-ASP-GLY-LEU-MET-ILE-GLY-  
140  
THR-GLY-LEU-VAL-GLY-ALA-LEU-THR-LYS-VAL-TYR-SER-TYR-ARG-PHE-VAL-TRP-ALA-ILE-SER-  
160  
THR-ALA-ALA-MET-SER-TYR-ILE-LEU-TYR-VAL-LEU-PHE-PHE-GLY-PHE-THR-SER-LYS-ALA-GLU-  
180  
SER-MET-ARG-PRO-GLU-VAL-ALA-SER-THR-PHE-LYS-VAL-LEU-ARG-ASN-VAL-THR-VAL-VAL-LEU-  
200  
TRP-SER-ALA-TYR-PRO-VAL-VAL-TRP-LEU-ILE-GLY-SER-GLU-GLY-ALA-GLY-ILE-VAL-PRO-LEU-  
220  
ASN-ILE-GLU-THR-ALA-LEU-PHE-MET-VAL-LEU-ASP-VAL-SER-ALA-LYS-VAL-GLY-PHE-GLY-LEU-  
240  
ILE-LEU-LEU-ARG-SER-ARG-ALA-ILE-PHE-GLY-GLU-ALA-GLU-ALA-PRO-GLU-PRO-SER-ALA-GLY-  
ASP-GIY-ALA-ALA-ALA-THR-SER

Fig. 1. Complete amino acid sequence of bacteriorhodopsin.

from the structure of the corresponding gene deprives us of important information, perhaps even more important than the primary structure as such. Our structural work with bacteriorhodopsin provided a good example for the above statement, since it yielded valuable knowledge of its topography and mode of action.

### 2. Results and discussion

In the course of the structural analysis of bacteriorhodopsin use was made of splitting the polypeptide chain by chemical means in media effectively solubilizing the delipidized protein. When bacteriorhodopsin was subjected to cyanogen bromide treatment,

10 fragments were identified, 6 of which were obtained in the individual state after gel filtration on Sephadex. Determination of the amino acid sequence of these peptides showed that they comprised the following parts of the polypeptide chain: the N-terminal fragment 1–20 with a pyroglutamic acid residue [5], the fragments 21–32 and the retinal (on Lys 41 [6]) carrying fragment 33–56, the fragments 57–60 and 61–68 and finally the C-terminus (209–247). Attempts to isolate the large fragments 69–118 and 163–208 by all available procedures met with no success. The structure of these peptides was determined by direct analysis of their mixtures on a sequencer in combination with analysis of short peptides obtained by cleavage of large fragments.

A small amount (~100 nM) of peptide 119–144

220

A

Рис. 4. Статьи Ю.А. Овчинникова (А) и Х.Г. Кораны (Б) о структуре бактериородопсина:





Рис. 5. Слева направо: английский химик, лауреат Нобелевской премии 1969 г. Дерек Бартон; Х.Г. Корана; Ю.А. Овчинников.  
7-й Международный симпозиум по химии природных соединений (Рига, июнь 1970 г.)

Это произошло 3 марта 1971 года, когда Ю.А. Овчинников уже был директором Института химии природных соединений АН СССР и занимал определенное положение в Академии — он был избран действительным членом АН СССР 24 ноября 1970 г.

Личные качества Кораны во многом обусловлены его национальными чертами: сдержанный, добрый, внимательный к ученикам (их у него было много, среди них один Нобелевский лауреат по химии 1993 г. Майкл Смит). По свидетельству близких, у него был ряд характерных привычек, например, он не любил разговаривать по телефону. Вообще он был скромным человеком, избегавшим пышных церемоний и словословий, предпочитавшим этому сосредоточенное погружение в научные проблемы.

Корана — автор более 450 работ, часть из которых сейчас имеется в Интернете. Информационные биографические источники об исследователе на русском и иностранных языках известны и доступны — поэтому нет необходимости в его более подробном жизнеописании. Но, наверное, такая личность заслуживает специальной книги: кратких статей и некрологов все-таки мало. Перечислять его почетные звания и знаки отличия вряд ли целесообразно: они непременно сопровождают столь заслуженных людей. Хотя надо упомянуть, что, кроме Нобелевской премии, он удостоен других высоких наград: премия Ласкера (1968), Национальная научная медаль США (1987).

В связи со смертью Кораны вышли подобающие в таких случаях некрологи, выдержанные по тональности и соответствующие рангу усопшего. Больше всего их, вполне понятно, в США. Хотя в наш век, насыщенный информацией и темпом, что значит смерть престарелого, отошедшего от дел ученого, формально — эмигранта, хотя знаменитого и даже Нобелевского лауреата? Для его подлинной родины, безусловно, это — гораздо более значимое событие, поскольку, по сути, умер национальный герой.

Естественный акт ухода из жизни пожилого исследователя, конечно, вызывает сожаление и соболезнование. Однако он заставляет профессиональное сообщество вновь обратиться к суммарной исторической оценке подвижнического, плодотворного труда великого сына Индии, представителя древнейшей цивилизации, давшей так много человечеству и зародившей необыкновенный талант человека со звучной фамилией Корана.

## КОНФЕРЕНЦИИ

**11 октября 2011 года** в Москве, в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН состоялась Десятое вавиловское чтение. С докладом «Исследования дикой пшеницы в Хайфском университете: сбор и оценка генофонда, структурная и функциональная геномика»

выступил профессор Абрам Король, директор Института эволюции (Хайфа, Израиль).

**11–13 октября 2011 года** в Ганновере (Германия) состоялась Международная торговая ярмарка по биотехнологии «BIOTECHNICA-2011».

**Научная конференция  
по биоорганической химии и биотехнологии  
«X чтения памяти академика  
Юрия Анатольевича Овчинникова»  
(Москва-Пушино, 14–17 ноября 2011 г.)**

14–17 ноября 2011 года в Москве и Пушино состоялась Научная конференция по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова». Организаторы — Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Мероприятие прошло в главном здании ИБХ РАН в Москве и его Пуштинском филиале. Структурно конференция состояла из восьми утренних и послеобеденных секционных заседаний: 14, 16, 17 ноября — в Москве, 15 ноября — выездная сессия в Пушино. Тематика секций:

- Структура и функции белков и пептидов. Биокатализ.
- Молекулярные механизмы генетических процессов.
- Молекулярные механизмы узнавания биомолекул и передачи сигналов в клетке.
- Молекулярные и клеточные основы иммунологии и иммуноонкологии.
- Молекулярные механизмы клеточных процессов и межклеточных взаимодействий.
- Физико-химические методы исследования биологически активных соединений.
- Фундаментальные аспекты биотехнологии и бионанотехнологии.
- Промышленная биотехнология.

В рамках конференции был организован конкурс молодых ученых в виде постерной и устной сессий (часть материалов, представленных на конкурс, публикуется в настоящем номере журнала в виде кратких сообщений).

Победители конкурса молодых ученых:

I премия — не присуждалась.

II премия — Билан Д.С., Василевский А.А., Ломакин Я.А., Люкманова Е.Н., Ямпольский И.В.

III премия — Болдырев И.А., Ермошин А.А., Кибанов М.В., Котов А.А., Матюгина Е.С., Метелев М.В., Минеев К.С., Плетнева Н.В., Пупов Д.В., Федосеева Д.М., Чвартацкая О.В.

Были вручены также специальные призы.

Ниже приводится программа конференции.

**14 ноября, понедельник,**

Малый конференц-зал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва.

*Председатель: Овчинникова Т.В.*

10.00–10.15 Открытие конференции

Иванов В.Т. (директор Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН).

Вступительное слово

10.15–10.55 Островский М.А. (Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН). Молекулярная физиология зрительного пигмента родопсина.

11.00–11.40 Свердлов Е.Д. (Институт молекулярной генетики РАН, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Подходы к генетической хирургии рака.

11.45–12.15 Плетнев В.З., Гурская Н.Г., Плетнева Н.В., Горячева Е.А., Мартынов В.И., Чудаков Д.М., Лукьянов К.А. (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Фототоксичный красный флуоресцентный белок KillerRed. Пространственная структура на атомном уровне.

12.20–12.50 Арсеньев А.С. (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Структурная биология мембранных белков. ЯМР-спектроскопия.

12.55–13.25 Ефремов Р.Г. (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Структура и динамика биомолекулярных систем: современные возможности вычислительного эксперимента.

13.30–14.30 Обед

Малый конференц-зал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

*Председатель: Ефремов Р.Г.*

14.30–14.50 Шуваева Т.М., Ильницкая Е.В., Радченко В.В., Липкин В.М. (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Новый хитолектин крысы в животных моделях с синдромом системного воспалительного ответа.

14.55–15.15 Андреев Я.А., Королькова Ю.В., Гришин Е.В. (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Полипептиды с анальгетической активностью из морской анемоны *Heteractis crispa*.

15.20–15.40 Коваленко Е.И., Каневский Л.М. (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Идентификация и характеристика НК-клеток периферической крови человека в проточной цитометрии.

15.45–16.05 Чинарев А.А., Галанина О.Е., Бовин Н.В. (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Гликополимеры с концевыми биотиновыми группами. Синтез и применение в иммуноферментном анализе.

16.10–16.30 Кофе-брейк

16.30–18.00 Конкурс молодых ученых. I тур. Постерная сессия.

**15 ноября, вторник**

9.00 Отъезд в Пушкино от ИБХ РАН

Конференц-зал Филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино

*Председатель: Мирошников А.И.*

11.00–11.30 Бурьянов Я.И., Захарченко Н.С., Рукавцова Е.Б., Лебедева А.А., Пиголева С.В., Пучко Е.Н. (Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Подходы к получению растений нового поколения для биотехнологии.

11.35–12.05 Шестибратов К.А.<sup>1</sup>, Булатова И.В.<sup>1</sup>, Лебедев В.Г.<sup>1</sup>, Лисов А.В.<sup>2</sup>, Леонтьевский А.А.<sup>2</sup>, Канарский А.В.<sup>3</sup>, Новиков П.С.<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино; <sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пушкино; <sup>3</sup>Марийский государственный технический университет, Йошкар-Ола). Трансгенные растения осины с модифицированным метаболизмом азота.

12.10–12.30 Мирошниченко Д.Н., Долгов С.В. (Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино). Биотехнологическая пшеница: состояние и перспективы использования в современном сельском хозяйственном производстве.

12.35–13.05 Трубецкая О.Е.<sup>1</sup>, Шалойко Л.А.<sup>1</sup>, Ришар К.<sup>2</sup>, Демин Д.В.<sup>3</sup>, Трубецкой О.А.<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино; <sup>2</sup>Лабо-

ратория молекулярной фотохимии Национального центра научных исследований Франции, Клермон-Ферран; <sup>3</sup>Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушкино). Супрамолекулярный комплекс природных гуминовых веществ: экспериментальное подтверждение.

13.10–14.10 Обед

Конференц-зал Филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино

*Председатель: Липкин В.М.*

14.10–14.30 Ламан А.Г.<sup>1</sup>, Савинов Г.В.<sup>1</sup>, Шепеляковская А.О.<sup>1</sup>, Бозиев Х.М.<sup>1</sup>, Бровко Ф.А.<sup>1</sup>, Родионов И.Л.<sup>1</sup>, Чулин А.Н.<sup>1</sup>, Елисеева И.А.<sup>2</sup>, Ким Е.Р.<sup>2</sup>, Гурьянов С.Г.<sup>2</sup>, Овчинников Л.П.<sup>2</sup>, Лябин Д.Н.<sup>2</sup>, Иванов В.Т.<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино; <sup>2</sup>Институт белка РАН, Пушкино; <sup>3</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва). Структурно-функциональные исследования пептидного миметика ГМДП. Поиск молекулярных мишеней.

14.35–14.55 Удовиченко И.П.<sup>1,3</sup>, Соболев Е.В.<sup>2</sup>, Тихонов Д.А.<sup>2</sup>, Данилкович А.В.<sup>1,3</sup>, Липкин В.М.<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино; <sup>2</sup>Институт математических проблем биологии РАН, Пушкино; <sup>3</sup>Пушкинский государственный университет, Пушкино). Особенности самоорганизации пептидов в филаментные структуры.

15.00–15.20 Микулинская Г.В.<sup>1</sup>, Одиноква И.В.<sup>2</sup>, Зимин А.А.<sup>3</sup>, Лысанская В.Я.<sup>3</sup>, Феофанов С.А.<sup>1</sup>, Степная О.А.<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино; <sup>2</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино; <sup>3</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пушкино). Эндолизин бактериофага T5: новая металлопептидаза семейства M15.

15.25–15.45 Чернышов С.В. (Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино). Конструирование и использование плазмиды рPF1 для функционального анализа дивергентных промоторов.

15.50–16.10 Кофе-брейк

Конференц-зал Филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино

*Председатель: Бурьянов Я.И.*

16.10–16.30 Митюшкина Т.Ю.<sup>1</sup>, Шульга О.А.<sup>2</sup>, Щенникова А.В.<sup>2</sup>, Скрябин К.Г.<sup>2</sup>, Долгов С.В.<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Фи-

лиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино; <sup>2</sup>Центр «Биоинженерия» РАН, Москва). Участие генов, гомологичных *ARETALA1*, в регуляции инициации цветения у астровых.

16.35–16.55 Фирсов А.П., Тарасенко И.В., Митюшкина Т.Ю., Таранов А.И., Долгов С.В. (Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино). Разработка съедобных вакцин медицинского и ветеринарного назначения на основе растительных платформ на примере пептида M2e вируса гриппа птиц.

17.00–17.20 Таран С.А., Феофанов С.А. (Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино). Трансгликозилирование нуклеозидов термостабильными нуклеозидфосфорилазами *Geobacillus stearothermophilus*.

17.25–17.45 Туховская Е.А.<sup>1</sup>, Скобцова Л.А.<sup>1</sup>, Мурашев А.Н.<sup>1</sup>, Прудченко И.А.<sup>2</sup>, Румш Л.Д.<sup>2</sup>, Фельдман Б.М.<sup>3</sup>, Марквичева Е.А.<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино; <sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; <sup>3</sup>ФГУП «Государственный научный центр «НИОПИК», Москва). Эффекты ДСИП при фокальном инсульте у крыс CD.

18.00 Отъезд в Москву от ФИБХ РАН

**16 ноября, среда**

Малый конференц-зал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

*Председатель: Гришин Е.В.*

10.00–10.30 Петренко А.Г. (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Молекулярные механизмы регуляции кислотно-щелочного равновесия.

10.35–11.05 Пестов Н.Б. (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Лизилоксидаза – перспективная мишень для разработки антиметастических препаратов.

11.10–11.40 Михайлова А.Г., Румш Л.Д. (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Проблемы организации и функционирования протеиназ высокой специфичности. Видовая специфичность энтеропептидазы.

11.45–12.05 Белогуров А.А., Габиров А.Г. (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемяки-

на и Ю.А. Овчинникова РАН). Дegrаdация и презентация основного белка миелина при аутоиммунных патологиях.

12.10–12.30 Смирнов И.В., Габиров А.Г. (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Биокаталитические механизмы деградации фосфоорганических соединений.

12.35–13.30 Обед

Малый конференц-зал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

*Председатель: Габиров А.Г.*

13.30–13.50 Симонова М.А., Валякина Т.И., Петрова Е.Э., Комалева Р.Л., Шошина Н.С., Гришин Е.В. (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва). Применение технологии хМАР в разработке тест-систем для иммунохимической детекции белковых токсинов.

13.55–14.15 Рязанцев Д.Ю., Петрова Е.Э., Валякина Т.И., Гришин Е.В., Завриев С.К. (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва). Детекция токсина *Vibrio cholerae* методом иммуно-ПЦР с использованием микросфер.

14.20–14.40 Федосеева Д.М., Кретьева О.В., Алембеков И.Р., Чуриков Н.А. (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва). Создание технологии генотерапии СПИД с помощью РНК-интерференции: испытание кассетных генетических конструкций, поражающих несколько мишеней в геноме ВИЧ-1.

14.45–15.05 Прохоренко И.А.<sup>1</sup>, Кочергинская П.Б.<sup>1,2</sup>, Романова А.В.<sup>1,3</sup>, Образцова Е.А.<sup>1</sup>, Клинов Д.В.<sup>1</sup>, Устинов А.В.<sup>1</sup>, Зацепин Т.С.<sup>3</sup>, Рязанцев Д.Ю.<sup>1</sup>, Гудилин Е.А.<sup>2</sup>, Формановский А.А.<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; <sup>2</sup>Факультет наук о материалах МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; <sup>3</sup>Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва). Многоцентровая функционализация квантовых точек для получения стабильных конъюгатов с ДНК.

15.10–15.30 Кофе-брейк

Малый конференц-зал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

*Председатель: Воробьев В.С.*

15.30–17.00 Конкурс молодых ученых. II тур. Устные доклады финалистов конкурса (список финалистов будет объявлен конкурсной комиссией по итогам I тура конкурса)

17.00–18.30 Постерная сессия участников конференции

**17 ноября, четверг**

Малый конференц-зал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

*Председатель: Иванов В.Т.*

10.00–10.30 Зубов В.П., Простякова А.И., Капустин Д.В. (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Нанокпозиционные сорбенты как путь к выделению нуклеиновых кислот для биоанализа и диагностики.

10.35–11.05 Акимов М.Г., Грецкая Н.М., Бобров М.Ю., Зинченко Г.Н., Безуглов В.В. (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). От ацилдофаминов к простамидам: липидная вселенная продолжает расширяться.

11.10–11.40 Водовозова Е.Л. (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Противоопухолевые липосомы с липофильными пролекарствами и углеводным лигандом селективов.

11.45–12.15 Шематорова Е.К., Шпаковский Д.Г., Долудин Ю.В., Словохотов И.Ю., Шпаковский Г.В. (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Новые комплексы генной экспрессии и их роль в возникновении и эволюции рода Ното.

12.20–12.50 Есипов Р.С. (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Создание биотехнологий получения рекомбинантных полипептидов на основе экспрессионных интеиновых систем.

12.55–14.00 Обед

Малый конференц-зал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

*Сопредседатели: Василев Р.Г., Дебабов В.Г., Иваненко А.И.*

14.00–14.15 Дебабов В.Г., Яненко А.С. (ФГУП ГНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов). Актуальные проблемы отечественной промышленной биотехнологии.

14.20–14.35 Швец В.Ф. (Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева). Развитие крупнотоннажной биоиндустрии на базе производства молочной кислоты.

14.40–14.55 Василев Р.Г. (НИИ биоэкономики Российского экономического университета им. Г.В. Плеханова). Региональные биотехнологические кластеры как фактор формирования инновационной биоэкономики в России.

15.00–15.15 Гаева Т.Н. (Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова). Анализ отечественного рынка биотехнологической продукции.

15.20–15.40 Кофе-брейк

16.00–16.15 Синеокий С.П. (ФГУП ГНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов). Национальные коллекции микроорганизмов для промышленной биотехнологии.

15.40–15.55 Бирюков В.В. (Московский университет инженерной экологии). Микробиологическое производство лизина.

16.20–16.35 Синицын А.П. (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова). Каталитическая конверсия лигноцеллюлозы в глубокой переработке биомассы.

16.40–16.55 Байрамашвили Д.И. (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Актуальные вопросы биофармацевтического производства.

17.00–17.30 *Овчинникова Т.В.* (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия). *Награждение победителей конкурса молодых ученых.*

*Заключительное слово.*

**28 ноября 2011 года** в Москве, на биофаке МГУ им. М.В. Ломоносова состоялась IX мемориальная лекция Чарльза Джейнсуэя. С лекцией «Структура тимус-зависимого звена иммунной системы и ее восстановление после повреждений» выступил профессор Александр Александрович Ярилин, заведующий отделом клеточной иммунологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, профессор кафедры иммунологии биологического факультета МГУ (этому исследователю в 2011 году исполнилось 70 лет).

**5 декабря 2011 года** в Москве, в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН прошли XXVII чтения памяти В.А. Энгельгардта.

**22 декабря 2011 года** в Москве, в МГУ им. М.В. Ломоносова состоялись XI чтения С.Е. Северина.

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 сведения об авторе (ах): Ф.И.О., место работы, должность, научные степень и звание, адреса для переписки и электронной связи, номера факсов и телефонов). Необходимо сопроводительное письмо из учреждения.
3. Объем рукописи: оригинальные статьи — не более 12–14 стр. (в среднем 22000 знаков), не более 25 цитированных авторов; обзоры — не более 20–24 стр. (в среднем 40000 знаков), 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, резюме на русском и английском языках; 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 в формате TIF или JPEG. 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.



Подписано к печати 27.12.11  
 Формат 60/90<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Бумага офсетная № 1.  
 Печать офсетная. Гарнитура Академия.  
 Печ. л. 5,0. Тираж 1000 экз.

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

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

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. Регулярно 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 57 регионах России и объединяет свыше 3000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

ОБР тесно сотрудничает с Союзом биотехнологов и другими общественными и государственными организациями, научными и образовательными учреждениями по профилю.

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

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

*Контакты: Адрес: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33*

*Тел.: +7 (495) 648-09-13*

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