

References

1. Zamaraeva M.V., Hagelgans A.I., Abramov A.Y., Ternovsky V.I., Merzlyk P.G., Tashmukhamedov, Saidkhodjaev A. *Cell Calcium*, 1997, 22, 235.
2. Abramov Yu.A., Zamaraeva M.V., Hagelgans A.I., Azimov R.R., Krasilnikov O.V. 2001, *Biochim. Biophys. acta*, 1512 (1), 98.
3. Zamaraeva M.V., Hagelgans A.I., Lubnina A.I., Abramov A.Y., Ahmedhodjaeva H.S., Saidhodjaev A.I., Glazyrina N.G. *Cell Moll. Biol. Lett*, 1999, 4 (2) 189.
4. Zavatti M., Bertoni L., Maraldi T., Resca E., Berreti F., Guida M., La Sala G.B., De Pol A. *Life Science*, 2015, 121, 174.
5. Arghiani N., Matin M.M., Bahrami A.R., Iranshashi M., Sazgarnia A., Rassouli F.B. *Life Science* , 2014, 109, 87.

FRET BIOSENSORS FOR SECOND MESSENGERS

Majoul I.¹, Bukauskas F.², Butkevich E.³, Duden R.⁴

¹*Institute of Biology, Center for Structural and Cell Biology in Medicine, University of Lübeck, 23562 Lübeck, Germany*

²*Dominick P. Purpura Department of Neuroscience, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461*

³*Drittes Physikalisches Institut, Biophysik, Georg-August-Universität, 37077 Göttingen, Germany*

⁴*Institute of Biology, Center for Structural and Cell Biology in Medicine, University of Lübeck, 23562 Lübeck, Germany*

Biosensors based on the principle developed by Theodor Förster (i.e. using fluorescence resonance energy transfer commonly known as FRET) in the 21 century allowed to resolve the intra-molecular spatiotemporal dynamics in living cells. Relatively few molecules are used by cells to transfer the information across different organs and non-invasive and live-cell friendly property of FRET based sensors allowed us to understand the metabolic state of cells in health and disease. Currently, the intra-molecular FRET biosensors have been increasingly used due to their high sensitivity in cellular microenvironments and recovery after bleaching.

We performed time-consuming optimizations of biosensors by trial and errors allowing us to develop sensors that can be co-expressed with transmembrane connexin channels that are permeable to the second messenger molecules.

Our developments in expression of intramolecular FRET biosensors optimized to connexin expression level allowed to follow the propagation and effects of cAMP permeability, IP3 and Ca^{2+} waves. The crucial approaches for intracellular FRET biosensors is to diminish the so called orientation dependent anisotropy component of FRET and to render the biosensors that they work as Stryer's "Spectroscopic ruler" by using long flexible linkers.

We will provide examples of highly sensitive intramolecular FRET based distance-dependent biosensors revealing metabolic cooperation of gap junction coupled cells under bacterial toxin induced increase PKA activity and Ca^{2+} signal propagation.

ВЛИЯНИЕ КЕТОКАНАЗОЛА НА БЕЛОК-БЕЛКОВОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФОСФОЛИПАЗЫ A_2 И ЦИТОХРОМА P-450

Антончик Г.Н., Гудко Т.Г., Ивуть Г.С., Литвинко Н.М.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Ранее нами с использованием спектроскопии кругового дихроизма (КД) показано неаддитивное изменение результирующего спектра КД смеси фосфолипазы A_2 (КФ 3.1.1.4, ФЛА $_2$) и изоформы P-450 (КФ 1.14.14.1, CYP) - CYP3A4 по сравнению со спектрами КД индивидуальных белков, что свидетельствует о наличии их прямого белок-белкового взаимодействия, которое обеспечивается преимущественно гидрофобными связями. [1]. Производное имидазола – кетоканазол согласно литературным данным [2], является ингибитором CYP 3A4. Влияние кетоканазола на активность ФЛА $_2$ или смеси с CYP 3A4 не изучалось. Сравнение интенсивности гидролиза фосфатидилхолина в присутствии ксенобиотика, CYP3A4, а также смеси последних, позволяет оценить степень влияния ксенобиотиков на белок-белковое взаимодействие между ФЛА $_2$ и CYP3A4.

Задача настоящего исследования состояла в изучении скорости ферментативных реакций, катализируемых ФЛА $_2$ и цитохромом P450, в присутствии кетоканазола с целью возможной оценки биобезопасности фунгицидов с помощью сопряжения реакций монооксигеназного катализа и фосфолиполиза.

Имеются данные по сравнению кристаллических структур CYP3A4 с кетоканазолом (ингибитор) и эритромицином (субстрат), которые показывают, что при связывании с данными соединениями CYP3A4 подвергается