

дважды депротонированной формы с ионами цинка. Сравнение концентрационных диапазонов по ацетату цинка, которые требуются для комплексообразования свободного основания и дважды депротонированной формы, показывает, что для образования $ZnTPPBr_4$ по ионному механизму требуется в четыре раза меньшая концентрация ацетата цинка, чем при получении аналогичного комплекса по молекулярному механизму при той же концентрации порфиринового лиганда.

Литература

1. Березин Б.Д. Металлопорфирины. - М.: Наука, 1988. – 159 с.
2. Пожарский А.Ф. Нафталиновые «протонные губки» // Успехи химии. - 1998. - Т. 67, №1. - С. 3 – 27.

СОХРАНИЛИСЬ ЛИ ГИСТИДИН-КИНАЗЫ В ХЛОРОПЛАСТАХ РАСТЕНИЙ?

**Лысенко Е.А.¹, Пшибытко Н.Л.², Каравайко Н.Н.¹,
Кузнецов В.В.¹**

¹*Институт физиологии растений РАН,
Москва, Россия, genlysenko@mail.ru*

²*Институт биофизики и клеточной инженерии НАНБ, Минск, Беларусь*

Пластиды являются эволюционными потомками цианобактерий и сохранили многие цианобактериальные белки. Протеин-киназы являются важнейшими компонентами регуляторных систем. Цианобактерии и растения имеют две различные группы протеин-киназ: гистидин-киназы и серин/треониновые киназы. У цианобактерий гистидин-киназы являются основной группой протеин-киназ, тогда как высшие растения, напротив, обладают большим семейством серин/треониновых киназ и гораздо меньшей группой гистидин-киназ.

Растения приобрели большое количество генов от цианобактериального эндосимбионта [1], и, по-видимому, все гистидин-киназы растений были получены от цианобактерий. [2, 3]. Однако все эти хорошо известные гистидин-киназы функционируют вне современных пластид. Кроме того, некоторые белки растений, ведущие свое происхождение от гистидин-киназ, утратили свой фосфоакцепторный мотив и функционируют как киназы другого типа [3-5]. Поэтому неясно сохранили ли пластиды растений какие-либо цианобактериальные регуляторные системы

His/Asp типа или все они были замещены эукариотическими Ser/Thr сигнальными системами?

Для ответа на этот вопрос были получены антитела к участку гистидин-киназа, который очень консервативен у всех гистидин-киназ растений и у некоторых цианобактерий. Полученная антисыворотка была названа Н1. В хлоропластах кукурузы антисыворотка Н1 визуализирует два мажорных полипептида с молекулярными массами около 26 и 28 кДа и третью минорную полосу с молекулярной массой около 27,5 кДа. Во фракциях, содержащих белки стромы и энвелопа и белки, удаленные с тилакоидных мембран раствором высокой ионной силы, не наблюдалось визуализации полипептидов. Однако все три эти полосы выявлялись во фракции отмытых тилакоидных мембран.

Далее тилакоидные мембраны солубилизировали Тритоном X-100 и фракционировали посредством последовательного центрифугирования при 35000 g и 70000 g. Одна из полученных фракций была обогащена ФС1, а значит обогащена стромальными участками тилакоидных мембран. Вторая фракция была обеднена ФС1 и обогащена ФС2 и, следовательно была обогащена гранальными участками тилакоидов. Антисыворотка Н1 четко выявляла все три полосы во фракции, обогащенной ФС1, а во фракции, обогащенной ФС2, была едва заметная полоса, соответствующая мажорному полипептиду 28 кДа. Поэтому можно заключить, что белки, выявляемые данными антителами, преимущественно локализованы в не стыкованных участках тилакоидных мембран и могут быть экспонированы в строму.

Было проведено фосфорилирование *in organello* с последующим вестерн-анализом всех хлоропластных белков. Известно, что фосфогистидин стабилен в щелочной и лабилен как в кислой среде, так и при повышенной температуре; фосфо-серин и –треонин же, наоборот, стабильны как в кислой среде, так и при повышенной температуре, но лабильны в щелочных растворах (во всех этих условиях фосфо-аспартат лабилен, а фосфо-тирозин стабилен) [6]. Поэтому после фосфорилирования *in organello* и вестерн-анализа визуализированные полосы вырезали из мембраны PVDF и инкубировали 16 ч в нейтральном, щелочном или кислом растворе при комнатной температуре или в нейтральном растворе при 45°C. Затем полоски мембран удаляли и измеряли радиоактивность каждого раствора в сцинтилляционном счетчике. Полученные данные свидетельствуют о том, что в зоне полос, выявляемых антителами, имеются фосфорилированные Ser/Thr, His и даже Tug. Радиоактивность, удаленная кислотой и повышенной температурой, меньше чем в щелочных условиях, но больше, чем в контрольном нейтральном растворе. По-

видимому, белки, выявляемые антисывороткой Н1, фосфорилируются по His и могут функционировать как гистидин-киназы.

В дальнейшем, были проанализированы хлоропласты нескольких одно- и двудольных растений. В тилакоидных мембранах всех исследованных растений антисыворотка Н1 визуализировала две полосы с молекулярной массой от 26 до 28 кДа. У всех изученных растений во фракциях белков стромы и энвелопа, и среди белков, слабо связанных с тилакоидными мембранами, не было выявлено ни одной явной полосы.

Был проведен биоинформационный поиск генов, которые могли бы кодировать белки, детектируемые антисывороткой Н1. Такие гены должны кодировать полипептиды не более 350-400 ак. Однако у цветковых растений (*A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays*) известные гены гистидин-киназ кодируют гораздо большие полипептиды. Поиск в базах данных показал, что для некоторых из этих генов характерны не только полноразмерные, но и сильно укороченные транскрипты, кодирующие полипептиды из 359 или 321 ак. После удаления транзитного пептида такой белок может иметь молекулярную массу около 25-28 кДа.

Таким образом, показано, что в хлоропластах цветковых растений, по-видимому, сохранилось небольшое количество гистидин-киназ, которые находятся в не стыкованных участках тилакоидных мембран и могут передавать сигнал к транскрипционному комплексу, находящемуся в строме.

Исследование было поддержано грантами РФФИ (10-04-90052) и БРФФИ (Б10Р-171).

Литература

1. Martin W., Rujan T., Richly E., Hansen A., Cornelsen S., Lins T., Leister D., Stoebe B., Hasegawa M., Penny D. Evolutionary analysis of arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus // Proc. Natl. Acad. Sci. USA - 2002. – Vol. 99. - P.12246 – 12251.
2. Mount S.M., Chang C. Evidence for a plastid origin of plant ethylene receptor genes // Plant Physiol. – 2002. – Vol. 130. – P.10 - 14.
3. Yeh K.-C., Lagarias J.C. Eukaryotic phytochromes: Light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1998. – Vol. 95. – P.13976 – 13981.
4. Moussatche P., Klee H.J. Autophosphorylation activity of the arabidopsis ethylene receptor multigene family // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279. – P. 48734 – 48741.

5. Puthiyaveetil S., Kavanagh T.A., Cain P., Sullivan J.A., Newell C.A., Gray J.C., Robinson C., van der Giezen M., Rogers M.B., Allen J.F. The ancestral symbiont sensor kinase CSK links photosynthesis with gene expression in chloroplasts // Proc. Natl. Acad. Sci. USA - 2008. – Vol. 105. – P. 10061 – 10066.
6. Wei Y.-F., Matthews H.R. Identification of phosphohistidine in proteins and purification of protein-histidine kinases // Methods Enzymol. – 1991. – Vol. 200. – P. 388 - 414.

ЭФФЕКТЫ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО СВЕТА ПРИ ЭНДОТОКСИЧЕСКОМ ШОКЕ

Мачнева Т.В., Буравлев Е.А., Осипов А.Н.

*Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия, machneva_tv@mail.ru*

Низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ) нашло широкое применение в различных областях современной медицины. Однако подбор доз и выбор вида излучения осуществляется в основном эмпирическим путём, и результаты лазерной терапии не всегда оказывают положительный эффект. Важную роль в этом процессе играют акцепторы лазерного излучения в клетках и тканях. При этом фотоакцепторами могут являться, например, эндогенные и экзогенные порфирины и другие соединения [1]. Количество эндогенных порфиринов (ЭП) возрастает при целом ряде патологических состояний, в том числе и при эндотоксическом шоке [2]. Выявление роли ЭП может позволить добиться большего эффекта при профилактике и лечении многих патологических состояний.

Одним из таких применений может быть профилактика или часть в терапии эндотоксического шока - сложного патологического состояния, оказывающего значительное влияние на физиологические процессы в организме [3, 4].

Целью работы было исследование роли ЭП в действии лазерного излучения в норме и при экспериментальном эндотоксическом шоке. В работе использовали модель эндотоксического шока, получаемого интраперитонеальным введением липополисахарида. Использовали лазерное излучение длиной волны 632нм (доза облучения 1,5 Дж/см²).