

зидов. О функциональной активности надпочечников судили по содержанию кортизола в периферической крови. Эксперименты проводились на крысах - самцах массой 180 - 220 г в возрасте 5-6 месяцев. Острый холодовой стресс моделировали опусканием животных в холодную воду при температуре $6 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Животные были разделены на группы: интактные; получавшие экстракт (содержание ТГ 100 мкг/мл) и гидролизат (содержание ТГ 550 мкг/мл) из кукумарии японской; интактные, стрессированные; стрессированные самцы, получавшие БАД из кукумарии японской.

При сопоставлении ответной реакции коры надпочечников на стресс выявлены существенные различия у интактных и экспериментальных крыс. У интактных животных стрессовое воздействие вызывает значительную активацию функции надпочечников, а именно подъем уровня концентрации кортизола ($85,7 \pm 4,1012193$ nmol/l) в два раза по сравнению с контрольными животными ($45 \pm 1,8384776$).

Развитие стрессового состояния у кормленных крыс также сопровождается напряжением функциональной активности надпочечников. Однако уровень кортизола существенно ниже концентрации гормона в крови интактных крыс при стрессе. Уровень кортизола у опытных стрессированных самцов, получавших экстракт и гидролизат из кукумарии японской составил $67,15 \pm 3,3234018$ nmol/l, $62,9 \pm 7,7781745$ nmol/l соответственно. Таким образом, ТГ из кукумарии японской оказывают положительное влияние на течение стресс – реакции в коре

надпочечников, стабилизируя секреторную активность глюкокортикоидпродуцирующих клеток.

НЕРАВНОМЕРНОСТЬ ДИВЕРГЕНЦИИ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА АЛЬБУМИНОИДНЫХ ГЕНОВ

Терентьев А.А., Молдогазиева Н.Т.

*Российский государственный
медицинский университет,
Москва*

Введение. В настоящее время в семейство белков – продуктов альбуминоидных генов входят: сывороточный альбумин (СА), альфа-фетопротейн (АФП), альфа-альбумин (афамин) и витамин Д-связывающий белок (ВДСБ). Представители этого семейства обладают примерно одинаковой молекулярной массой (от 66 до 82 кДа), при этом различия в их молекулярной массе обусловлены, преимущественно, разным содержанием углеводов. Эти белки демонстрируют относительно высокую степень сходства первичной структуры (например, до 40% идентичности наблюдается между аминокислотными последовательностями СА и АФП) с характерным расположением остатков цистеина [1, 2]. Они имеют также сходную пространственную организацию, представленную тремя гомологичными доменами (I-III), сшитыми равномерно

расположенными межспиральными дисульфидными связями [3].

Альбуминоидные гены расположены последовательно друг за другом в 5-ой хромосоме у мыши и в субцентромерной области q11-22 4-ой хромосомы у человека и их нуклеотидные последовательности обладают высокой степенью сходства [4, 5]. Предполагается, что все гены данного семейства произошли от некоего предкового гена, кодирующего полипептидную цепь, соответствующую одному домену и состоящую примерно из 190 аминокислотных остатков (а.о.) [6, 7]. Путем удлинения (трипликации) предкового гена образовался ген-предшественник, кодирующий трехдоменную полипептидную цепь. Затем произошла серия дупликаций гена-предшественника с образованием четырех независимых генов.

Minghetti и соавт., а затем Gibbs и соавт. [8, 9] определили количество синонимичных и несинонимичных нуклеотидных замен в альбуминоидных генах и выяснили, что белки этого семейства характеризуются разной скоростью эволюции. Наибольшая скорость эволюции была определена для афамина, который накапливает 27.1% замен а.о. за 100 миллионов лет (Мут). Скорость эволюции АФП (22.5% замен а.о. за 100 Мут) выше, чем альбумина (20.2% замен а.о. за 100 Мут) и наименьшая для ВДСБ (18% замен а.о. за 100 Мут). На основании этих расчетов было подсчитано приблизительное время дивергенции этих белков: около 580 Мут назад – ВДСБ, 295 Мут назад – альбумин и 250 Мут назад – АФП и афамин.

Материалы и методы. Нами было осуществлено сравнительное изучение первичных структур методом попарного выравнивания незрелых (полных) и зрелых (после процессинга) аминокислотных последовательностей белков семейства альбуминоидных генов у разных биологических видов и оценена степень сходства между белками по степени идентичности, а также общее сходство с учетом консервативных замен а.о. в каждой паре белков. В современных базах данных первичных структур белков (Swiss-Prot и TrEMBL) нами были обнаружены аминокислотные последовательности всех четырех представителей этого семейства лишь для трех биологических видов – человека, мыши и крысы. Ещё для пяти биологических видов расшифрованы первичные структуры двух белков семейства: свиньи, лошади, собаки и курицы – альбумина и АФП, кролика – альбумина и ВДСБ (табл.1).

Выравнивание аминокислотных последовательностей осуществляли использованием программы ClustalW (версия 1.82). Для выравнивания использовались следующие параметры:

- Матрица – Gonnet,
- Штраф за факт пробела (Gap Open) – 10.0
- Штраф за протяженность пробела (Gap Extension) – 0.2
- ENDGAP = -1
- GAPDIST = 4

Таблица 1. Аминокислотные последовательности, использованные для выравнивания

Название белка	Длина аминокислотной Последовательности (а.о.)	Код доступа в базу данных
АФП человека	609	P02771
АФП мыши	605	P02772
АФП крысы	611	P02773
АФП курицы	615	P84407
АФП свиньи	610	Q8MJ76
АФП лошади	609	P49066
АФП собаки	609	Q8MJU5
Альбумин человека	609	P02768
Альбумин мыши	608	P07724
Альбумин крысы	608	P02770
Альбумин свиньи	607	P08835
Альбумин лошади	607	P35747
Альбумин собаки	608	P49822
Альбумин курицы	615	P19121
Афамин человека	599	P43652
Афамин мыши	611	O89020
Афамин крысы	608	P36953
ВДСБ человека	474	P02774
ВДСБ мыши	476	P21614
ВДСБ крысы	476	P04276

Сходство а.о. в каждой паре аминокислотных последовательностей определяли по формуле:

- степень идентичности = $n_i / n \times 100\%$,

- общее сходство = $(n_i + n_c) / n \times 100\%$, где n_i - количество идентичных а.о.,

- n – длина выравниваемых последовательностей с учетом пробелов (гэпов), n_c - количество консервативных замен.

Результаты и обсуждение. Полученные результаты показывают, что степень идентичности между парами полных (незрелых) последовательностей АФП и альбумина уменьшалась в ряду от курицы (40.3%) к человеку (40.0%), собаке (38.7%), свинье (37.3%), ло-

шадю (34.9%), мышю (34.4%) и крысе (32.3%). Общее сходство между последовательностями уменьшалось также от курицы (64.2%) к человеку (63.9%), собаке (63.6%), лошади (61.8%), свинье (61.5%), мышю (61.3%) и крысе (58.4%). Выравнивание зрелых аминокислотных последовательностей дало аналогичные результаты (за исключением собаки и свиньи, для которых выравнивания зрелых последовательностей не производилось в связи с отсутствием информации о длине сигнального пептида для их СА).

Для других пар белков было осуществлено выравнивание у трех биологических видов – человека, мышю и крысы. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Значения сходства аминокислотных последовательностей для разных пар белков у трех биологических видов

Пары белков	Значения идентичности для разных видов животных (в %). В скобках показано значение общего сходства (в %).		
	человек	мышь	крыса
альбумин-АФП	40.0 (63.9)	34.4 (61.3)	32.3 (58.4)
АФП-афамин	38.7 (65.4)	31.8 (58.1)	31.7 (57.3)
альбумин-афамин	33.8 (60.3)	29.6 (54.7)	28.2 (56.7)
альбумин-ВДСБ	21.4 (47.2)	21.2 (47.3)	20.8 (43.9)
АФП-ВДСБ	15.7 (36.3)	19.1 (41.7)	18.7 (41.5)
афамин-ВДСБ	18.5 (45.4)	16.8 (40.3)	17.1 (41.8)

Видно, что наибольшее сходство у всех биологических видов характерно для пары альбумин-АФП и далее сходство убывает в парах АФП-афамин, альбумин-афамин, альбумин-ВДСБ. Однако в парах АФП-

ВДСБ и афамин-ВДСБ наблюдается неравномерность убывания сходства у человека и у грызунов.

Если в парах АФП-афамин и альбумин-афамин сходство четко уменьшается в ряду человек, мышь,

крыса, то в паре альбумин-ВДСБ значения идентичности мало отличаются у разных биологических видов. Примечательно то обстоятельство, что сходство аминокислотных последовательностей в паре АФП-ВДСБ заметно выше у мыши и крысы, чем у человека. Возможно, здесь имеет место неравномерность дивергенции белков у разных биологических видов.

Согласно концепции молекулярных часов [10, 11] каждый белок обладает характерной и постоянной скоростью эволюции. Механизм, приводящий часы в движение, определяется мутациями, происходящими в генах, кодирующих тот или иной белок и накапливаемых с момента дивергенции генов. Различия в последовательностях ДНК или белка у разных видов могут быть использованы для определения времени их дивергенции от общего предка.

Ранее было показано, что скорость эволюции одного и того же белка может значительно различаться у разных биологических видов [9]. Также было замечено, что скорость эволюции АФП выше у грызунов, чем у других млекопитающих. Наши результаты показывают неравномерность убывания сходства в парах АФП-ВДСБ и афамин-ВДСБ у человека и у грызунов. В паре АФП-ВДСБ сходство заметно выше у мыши и крысы, чем у человека, в то время как в остальных белковых парах сходство аминокислотных последовательностей выше у человека.

Возможно, такие различия определяются скоростью накопления мутаций в аминокислотных последовательностях у разных биологических видов, отличающихся разной скоростью генерации потомства и разными размерами популяций. Чем меньше скорость генерации и чем меньше размер популяции, тем быстрее происходит фиксация мутаций в популяции.

Ход молекулярных часов может определяться также функциями белков. Быстро эволюционирую-

щие белки, видимо, могут претерпевать значительные структурные изменения без существенного влияния на их функции. Большая часть мутаций в этих белках оказываются индифферентными к естественному отбору. Часть мутаций в медленно эволюционирующих белках, приводящая к нарушению их функционирования, элиминируются в процессе естественного отбора, и не фиксируется в популяции. Следовательно, быстро эволюционирующие белки должны сохранять функционально важные участки и специфичность функций, в то время как медленно эволюционирующие белки утрачивают их.

Известно, что сывороточный альбумин не обладает какими-либо специфическими функциями. Он способен неспецифически связывать различные гидрофобные лиганды и ионы металлов, а также играет важную роль в поддержании коллоидно - осмотического давления плазмы крови. ВДСБ является также мультифункциональным белком, который в сыворотке крови транспортирует витамин Д, а также связывает мономеры актина, предотвращая их полимеризацию. Биологическая роль альфа-фетопротейна до конца не выяснена. Однако показано, что АФП обладает рядом специфических функций и в его составе выявлены функционально важные участки, ответственные за те или иные его функции. Активность части из этих участков подтверждена в различных экспериментальных моделях, других – лишь предсказана путем сравнения аминокислотных последовательностей АФП и некоторых факторов роста, белковых гормонов и ряда других белков. Показано, что АФП способен с высокой специфичностью связывать эстрогены и жирные кислоты, выявлены и экспериментально подтверждены участки, ответственные за эти функции.

Таблица 3. Сходство эстрогенсвязывающих участков альфа-фетопротейна и афамина

Названия белков	Аминокислотные последовательности	Степень идентичности	Доля консервативных замен	Суммарное сходство
АФП /афамин крысы (а.о.424-438/425-439)	ELIDLTGKMVSIAS* ELVSLKEMVAALAT	6/15 (40%)	5/15 (33%)	73%
АФП /афамин человека (а.о. 428-452/425-439)	ELMAITRKMAATAAT** ELVSLGEKMTAFTT	5/15 (33%)	6/15 (40%)	73%
АФП /афамин человека (а.о. 458-472/453-467)	AADI IGHLCIRHEM* LADLVFGELCGVNEN	6/15 (40%)	4/15 (27%)	67%
АФП / афамин мыши(424-438/425-439)	ELIDLTGKMVSIAS** ELVSLKEMVAALTT	6/15 (40%)	5/15 (33%)	73%

Нумерация а.о. дана для зрелых (после процессинга) последовательностей белков.

* означает функциональный участок с экспериментально подтвержденной активностью,

** означает функциональный участок с предполагаемой активностью

Функции афамин остаются пока еще мало изученными, в связи с тем, что этот белок обнаружен относительно недавно. Однако есть данные, говорящие в пользу того, что афамин человека способен

специфически связывать и транспортировать витамин Е и совместно с витамином Е или самостоятельно предотвращать апоптоз нервных клеток [12]. Данные о том, что афамин является наиболее быстро эволю-

ционирующим белком данного семейства [9], позволяют предположить, что он должен характеризоваться сохранностью консервативных а.о. в функционально важных участках.

Мы провели сравнительный анализ аминокислотных последовательностей афамина и АФП, для которого экспериментально установлены специфические функционально важные участки. В составе афамина человека, мыши и крысы обнаружены участки, обладающие высокой степенью сходства с эстроген-связывающими участками АФП (табл.3).

Эти данные, наряду с тем, что в составе сывороточного альбумина подобные участки не обнаружены, могут указывать на то, что афамин, возможно, способен связывать и транспортировать эстрогены.

Заключение. Полученные нами результаты демонстрируют неравномерность убывания сходства в парах белков АФП-ВДСБ и афамин-ВДСБ у человека и у грызунов по сравнению с другими парами белков, производных альбуминоидных генов, которую мы не можем объяснить в рамках гипотезы «молекулярных часов». Эти данные могут свидетельствовать о неравномерности дивергенции белков семейства альбуминоидных генов у млекопитающих. Парное сравнение методом выравнивания первичных структур белков с известной функцией с белками, функции которых неизвестны, позволяет с большей степенью вероятности предсказывать возможные функционально-активные участки в первичных структурах изучаемых белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Morinaga T., Sakai M., Wegmann T.G., Namaoki T. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4604-4608.
2. Ruoslahti E., Terry W.D. (1976) Nature, 260, 804-805.
3. He X.-M., Carter D. (1992) Nature, 358, 209-21.
4. Harper M.E., Dugaiczky A. (1983) Amer. J. Hum. Gen., 35, 565-572.
5. Ingram R.S., Scott R.W., Tilghman. S. M. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4694-4698.
6. Gorin M.B., Cooper D.L., Eiferman F., Van de Rijn P., Tilghman S.M. (1981) J. Biol. Chem. 256, 1954-1959.
7. Brown J.R. (1976) Fed. Proc. 35, 2141-2144.
8. Minghetti P.P., Law S. W., Dugaiczky. A. (1985) Mol. Biol. Evol. 2(4), 347-358.
9. Gibbs P. E.M., Witke W. F., Dugaiczky A. J. (1998) Mol. Evol. 46, 552-561.
10. Zuckerkandl E., Pauling L. (1965) In V. Bryson and H. J. Vogel, eds. Evolving genes and proteins, 97-166. Academic Press, New York.
11. Dickerson R. E. (1971) J. Mol. Evol. 1, 26-45.
12. Heiser M., Hutter-Paier B., Jercovic L., Pfranger R., Windisch M., Becker- Angre M., Dieplinger H. J. (2002) Neural Transm. Suppl. 62, 337-345.

УСИЛЕНИЕ АПОПТОЗА CD95⁺-ЛИМФОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА ИЗ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА ЧЕЛОВЕКА (АФП₁₄₋₂₀)

Терентьев А.А., Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Александрова И.А., Тагирова А.К., Молдогазиева Н.Т., Казимирский А.Н.
Российский Государственный
Медицинский Университет,
Москва

Современные наукоемкие технологии в биологии и медицине базируются на фундаментальных исследованиях способных дать новые представления о ключевых процессах в организме. Фундаментальные исследования фетоплацентарных белков человека ведут к лучшему пониманию процессов роста и развития. На основе молекулярных структур, происходящих из этих белков, могут быть созданы новые лекарственные препараты и разработаны диагностикумы.

Один из белков фетоплацентарного комплекса – альфа-фетопротейн человека включен во многие процессы, связанные с ростом и клеточной дифференцировкой. Ранее мы выдвинули предположение о том, что продукты спонтанной протеолитической деградации альфа-фетопротейна и, возможно, некоторых других белков фето-плацентарного комплекса оказывают регулирующее влияние на иммунную систему человека. В частности за счет пептидов из альфа-фетопротейна вполне может осуществляться контроль за иммунологической толерантностью. Ранее нами (Терентьев А.А., 1997; Терентьев и соавт., 1999, 2000, 2002, 2004) был выявлен биологически активный сайт в структуре альфа-фетопротейна (АФП), соответствующий последовательности с 14 по 20 аминокислотных остатков первичной структуры АФП. Предварительные исследования (Терентьев А.А. и соавт., 1999, 2001, 2003, 2005) продемонстрировали иммуномодуляторную активность синтетического пептида, соответствующего этой последовательности с возможным участием механизмов апоптоза в реализации его иммуномодуляторной активности.

Состояние иммунологической толерантности во многом определяется вхождением в апоптоз (программированную клеточную гибель) активированных лимфоцитов. Наиболее естественный путь удаления из организма активированных лимфоцитов способных к синтезу и секреции провоспалительных цитокинов это путь их активационного апоптоза. Активационный апоптоз лимфоцитов развивается как естественное завершение активационного (дифференцировочного) процесса в ходе которого на поверхности лимфоцитов последовательно экспрессируются рецепторы CD25, CD71, HLA-DR и CD95. CD95 – маркер готовности лимфоцитов к запуску активационного апоптоза. Система взаимодействующих рецепторов Fas(CD95) и FasL(CD178) - важнейший механизм активационной элиминации лимфоцитов, благодаря включению которого удаляется большинство лимфоцитов после выполнения ими возложенный на них функций.

Fas-FasL взаимодействие, запускающее активационный апоптоз, играет роль в торможении иммунного ответа, путем удаления активированных аутореактив-