

результатів по кластерам, часу відповіді в тестових завданнях та наявності/відсутності помилки при відповіді. Можна зробити припущення, що складність когнітивного навантаження проявляється в розкиді автоколивальних процесів, які представлені в динаміці ЧСС по певним фіксованим станам, які можуть не проявлятися при не дуже складних тестових завданнях.

Висновки. Вейвлет на основі функцій Кравчука є дискретним ортогональним вейвлетом, який дозволяє дослідити тонкі структури ЕКГ та з високою точністю представити локальні особливості сигналів у часі. Використання функцій Кравчука та методу гіперкомплексних систем при вейвлет – аналізі забезпечує інваріантність виділення інформативних ознак сигналу. Кластеризація динаміки ЧСС людини за нейронною мережею Кохонена та вейвлет-аналізом на основі функцій Кравчука виявила зміну стану обстежуваного при зміні типу та складності когнітивного навантаження впродовж обстеження.

1. Блаттер К. Вейвлет-анализ. Основы теории. Серия: "Мир математики". – М.: Изд-во ТЕХНОСФЕРА РИЦ, 2004 г. – 280 с. 2. Бойцов С.А. Анализ сигнал-усредненной ЭКГ (по данным вейвлет-преобразования) у здоровых и больных ИБС / С.А. Бойцов и др. // Вестник аритмологии. № 23. 2001. – с. 32 – 36. 3. Філімонова Н., Макачук М., Мірошник Т.,

Качуріна К. Взаємозв'язки між показниками асоціативної і оперативної пам'яті у жінок та чоловіків // Вісник Київського університету. Серія Біологія. – 2008. – Вип.54. – С. (у друці). 4. Krawtchouk M. Sur une generalisation des polynomes d'Hermite // C.R. Acad. Sci., Paris. – 1929, v. 189. – P.620 – 622. 5. Vainerman L.I. and Filimonova N.B. Signal processing and polynomials of discrete argument // Systems and Networks: Mathematical Theory and Applications. – Berlin: Akademie Verlag, 1994, Vol.II. – P. 889-890. 6. Vainerman L. and Filimonova N. Hyperspectral imagery with the application of Krawtchouk polynomials // Algorithms for Multispectral and Hyperspectral Imagery. A.Evan Iverson, Editor, Proc. SPIE. – 1994, V.2231 – P.148-155. 7. Забара С.С., Філімонова Н.Б., Зеленський К.Х. Метод виділення інваріантних ознак сигналів // Доповіді Національної академії наук України. – 2009. – №3. – С. 55-59. 8. Ubeyli E.D. Wavelet/mixture of experts network structure for EEG signals classification // Systems with Applications: An International Journal. – V. 34, Issue 3 (April 2008). – P. 1954-1962. 9. Каллан Р. Основные концепции нейронных сетей. – М.: Издательский дом "Вильямс", 2001. – 287 с. 10. Нейронные сети. STATISTICA Neural Networks. – М.: Горячая линия. – Телеком, 2000. – 182 с.

Надійшла до редколегії 28.10.09

УДК 579.222:577.217.32

Ю. Кондратюк, асп., М. Бабарик, студ.,
Л. Сидорик, канд. біол. наук, О. Корнелюк, д-р біол. наук

ОПТИМІЗАЦІЯ ПРОЦЕСУ БІОСИНТЕЗУ КАТАЛІТИЧНОГО МОДУЛЯ ТИРОЗИЛ-ТРНК СИНТЕТАЗИ ССАВЦІВ ТА ЙОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ІМУНОХІМІЧНИМИ МЕТОДАМИ

Проведено оптимізацію умов бактеріальної експресії N-кінцевого каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази. Досліджено вплив концентрації індуктора синтезу цільового білка на його кінцевий вихід, а також встановлено оптимальний час культивування бактеріальної культури до та після додавання індуктора. Запропоновано оптимальну схему культивування культури E. coli BL21(DE3)pLysE для досягнення високого рівня виходу рекомбінантного білка. Методом імуноблотингу виявлено імунологічний перехрест між двома формами тирозил-тРНК синтетази – повнорозмірною та її каталітичним модулем.

The optimization of the conditions of bacterial expression of N-terminal catalytic module of tyrosyl-tRNA synthetase was conducted. The influence of the concentration of inductor synthesis of target protein at its final output and the best time of cultivation bacterial culture before and after adding inductor was investigated. The optimal conditions for cultivation culture E. coli BL21 (DE3) pLysE to achieve a high level expression of recombinant protein was proposed. As it has been shown by immunoblotting the polyclonal antibodies against tyrosyl-tRNA synthetase reacted both with the native enzyme and with its catalytic form.

Вступ. Аміноацил-тРНК синтетази (АРСази) є ключовими ферментами дорибосомного етапу біосинтезу білків, які каталізують реакцію приєднання певної амінокислоти до відповідної тРНК. Крім своєї основної функції, АРСази можуть виконувати неканонічні функції, які безпосередньо не пов'язані з біосинтезом білка [2].

Тирозил-тРНК синтетаза (TyrRS, КФ 6.1.1.1) ссавців є найбільш вивченою АРСазою ссавців, і складається з каталітичного та некаталітичного доменів, яким властиві деякі неканонічні функції. Так ізольований N-кінцевий каталітичний модуль (39K TyrRS), що відповідає вкороченій формі ферменту ("мінімальна" TyrRS), має повну ферментативну активність в експериментах *in vitro* і в той же час може функціонувати як цитокін (подібний до інтерлейкіну-8) та стимулювати ангиогенез. COOH-кінцевий модуль TyrRS теж має подвійну функцію: бере участь у взаємодії з тРНК як фактор, що підсилює специфічність зв'язування тРНК з синтетазою, та після протеолітичного розщеплення функціонує як цитокін (подібний до цитокіну EMAP II), що стимулює хемотаксичну активність моноцитів, підсилює прокоагуляційну активність ендотеліальних клітин [1, 3, 8, 9].

Вивчення процесу біосинтезу еукаріотичних білків в прокаріотичних клітинах приваблювало значну увагу дослідників [4]. Значною мірою це зумовлено потребою оптимізації процесів біотехнологічного виробництва, розробкою та створенням медичних препаратів нового

покоління на основі цих білків [11, 13], яким може являтися і досліджуваний нами, а з огляду на те, що окремі модулі та мутантні форми тирозил-тРНК синтетази мають унікальні властивості, тому оптимальні умови експресії необхідно підбирати індивідуально для кожного модифікованого білка.

Імунохімічні методи дослідження значно розширюють можливості вивчення як традиційних, так і неканонічних функцій клітинних компонентів. Вони дають можливість вивчати структуру та функції білків на молекулярному та клітинному рівнях, тому зараз при вивченні структурно-функціональної організації ферментів, у тому числі і АРСаз, широкого застосування набули імунохімічні методи з використанням як полі-, так і моноклональних антитіл [6, 7].

В даній роботі нами проведено дослідження впливу умов культивування на вихід каталітичного модуля повнорозмірної TyrRS, з метою отримання даного білка у великих кількостях, здійснено його афінну очистку та проведено імунохімічне дослідження за допомогою поліклональних антитіл до повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази для виявлення імунологічного перехресту між двома формами тирозил-тРНК синтетази – повнорозмірною та її каталітичним модулем.

Об'єкт та методи досліджень. В роботі використаний штам-продуцент рекомбінантного білка, одержаний на основі реципієнта *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE.

Штам трансформований за загальноприйнятою методикою [5] відповідним сконструйованим плазмідним вектором pET30a-39K TyrRS, у якого під контролем промотора фага T7 містяться гени, що кодують синтез відповідного білка: N-кінцевий каталітичний модуль тирозил-тРНК синтетази (39K TyrRS). Генетичним маркером плазмідної pET30a є ген *kan*, що забезпечує стійкість трансформованих клітин до канаміцину. Штам-продуцент вирощували на середовищі Luria-Bertani з додаванням антибіотика канаміцину до кінцевої його концентрації в розчині 30 мкг/мл. Культуру інкубували при температурі 37 °C та інтенсивній аерації (130 об/хв) до досягнення нею оптичної густини 0,3-1,3 (залежно від часу культивування культур). Оптичну густину (OD_{600}) визначали спектрофотометрично (спектрофотометр BioMate-5, Велика Британія) при довжині хвилі 600 нм.

Для індукції синтезу рекомбінантного білка в культуральне середовище додавали ізопропіл- β -тіогалактопіранозид, ІПТГ, до кінцевої концентрації: 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5 мМ. Підбирали час культивування культури до (1, 2, 3 год) та після (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 год) індукції. Рекомбінантний білок отримували із супернатанту лізованих клітин методом металхелатуючої хроматографії на Ni-NTA-агарозній колонці. Клітини руйнували ультразвуком. Освітлювали лізат центрифугуванням. Супернатант наносили на колонку з Ni-NTA-агарозою (Qiagen, США). Цільовий білок елюювали буфером для елюції (50 мМ натрій-фосфатного буферу, 150 мМ NaCl, 200 мМ імідазолу, 5 мМ β -меркаптоетанолу). Фракції, що містили цільовий білок діалізували. Аналіз бактеріальних білків проводили з допомогою SDS-гель-електрофорезу по Леммлі в денатуруючих умовах (12%-ий розділюючий гель) [10], використовуючи суміш маркерних білків фірми Fermentas (Литва). Гелі фарбували Coomassie blue R-250. Вміст білків визначали денситометрично (денситометр LKB UltroScan XL, Швеція). При статистичній обробці результатів дослідження використовували пакет статистичних програм STATISTICA 7.0.

Поліклональні антитіла до повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази (отримана нами за схемою, аналогічною розробленій для експресії каталітичного модуля повнорозмірної TyrRS) одержували згідно методики, розробленій раніше [12], використовуючи кроликів-самців масою тіла 2-3 кг. Імунізацію проводили препаратом тирозил-тРНК синтетази в повному ад'юванті Фрейда з розрахунку 50 мкг ферменту на одного кролика. Через 8-10 тижнів проводили повторну імунізацію такою ж кількістю антигена, а через 4 тижні кроликів імунізували втретє дозою 100 мкг фермента в неповному ад'юванті Фрейда. На 8 день після третьої імунізації визначали вміст специфічних антитіл в сироватці крові кроликів. Титр антитіл визначали імуноферментним методом (ELISA). Фракцію імуноглобулінів отримували трикратним висолюванням антисироватки насиченим розчином сульфату амонію до кінцевої концентрації 50%. Очищення поліклональних антитіл проводили на DEAE-целюлозі. Пікові фракції об'єднували і чистили методом афінної хроматографії на протеїн-G сефарозі. Ефективність очищення антитіл контролювали за допомогою електрофорезу.

Специфічність отриманих антитіл до тирозил-тРНК синтетази визначали методом імуноблотингу (Western-blot) для повнорозмірної синтетази та для N-кінцевого каталітичного модуля. Білкові препарати розділяли електрофорезом в ПААГ в денатуруючих умовах по методу Леммлі [10] і переносили на нітроцелюлозні фільтри ("Amersham", Велика Британія) пасивною дифузією. Фільтри відмивали в буфері PBST і блокували вільні

сайти адсорбції. Фільтри інкубували з антитілами (50 мкг/мл) протягом 1,5 год, відмивали буфером PBST, обробляли протягом 1 год антитілами проти цілої молекули IgG кроля, кон'югованої з пероксидазою хрому. Блот фарбували розчином кумарової кислоти і люмінолу в 100 мМ трис-НСІ з 0,05 % H_2O_2 .

Результати та обговорення. Показано, що кінцевий вихід цільового білка в значній мірі залежить від таких умов культивування, як кількість індуктора синтезу білка, що вноситься в культуральне середовище, час культивування культури до та після додавання індуктора. Нами було досліджено вплив даних факторів на синтез N-кінцевого каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази. При підвищенні концентрації індуктора до 1 мМ спостерігалось чітке зростання рівня експресії білка. При подальшому збільшенні кількості ІПТГ така тенденція втрачалась і навпаки відмічався спад рівня експресії. Максимальна кількість білка спостерігалась за умови додавання в середовище культивування індуктора на другу годину росту культури ($OD_{600}=0,7-0,9$), що пояснюється імовірним досягненням культурою найбільш сприятливої фази росту. При дослідженні рівня експресії білка залежно від часу культивування культури після індукції показана максимальна його кількість в культуральному середовищі на четверту годину росту. За наступного культивування культури також спостерігали деякий приріст кількості цільового білка, але він був незначним в порівнянні зі стрімким збільшенням кількості білка при вирощуванні бактеріальної культури протягом перших чотирьох годин. Згідно до підібраних умов культивування проведено бактеріальну експресію та афінну очистку білка 39K TyrRS, отримано необхідну для подальших досліджень кількість даного білка високого ступеня чистоти (більше 95%).

Проведено бактеріальну експресію повнорозмірної рекомбінантної тирозил-тРНК синтетази, отримано поліклональні антитіла до цього білка та проведено їх афінну очистку. Методом імуноблотингу показано імунологічний перехрест між двома формами тирозил-тРНК синтетази – повнорозмірною та "мінімальною" TyrRS (рис. 1). Аналогічні результати були отримані для природної тирозил-тРНК синтетази та її вкороченої форми [7], що підтвердило спільне походження обох форм ферменту.

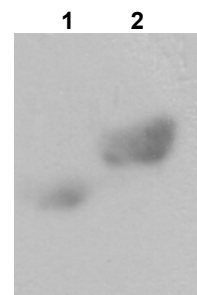


Рис. 1. Дані по імунохімічному перехресті між двома формами рекомбінантної тирозил-тРНК синтетази

1 – N-кінцевий каталітичний модуль тирозил-тРНК синтетази
2 – повнорозмірна тирозил-тРНК синтетаза

З даних літератури відомо, що триптофаніл-тРНК синтетази еукаріот, еубактерій та архебактерій мають подібну антигенну детермінанту, не суттєву для каталітичної активності цих ферментів. Еволюційна консервативність цього елемента дозволяє припустити можливість інших функцій у триптофаніл-тРНК синтаз, крім утворення триптофаніл-тРНК [7]. З іншого боку, для серил-тРНК синтетази з печінки бика за допомогою поліклональних афінно очищених антитіл було показано

міжвидовий перехрест між серил-тРНК синтетазою різних представників класу еукаріот, що не відмічалось у випадку з прокариотичними ферментами. Це свідчить про відсутність гомології в антигенних детермінантах серил-тРНК синтетаз еукаріот та прокариот [12].

Висновки. Таким чином, встановлено, що оптимальна кількість ІПТГ для експресії N-кінцевого каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази становить 1 мМ, а час культивування бактеріальної культури до та після індукції синтезу цільового білка – дві та чотири години відповідно.

В результаті проведеного імунохімічного дослідження за допомогою афінно очищених поліклональних антитіл показано, що рекомбінантна тирозил-тРНК синтетаза та її вкорочена форма, N-кінцевий каталітичний модуль, мають спільні структурні детермінанти, очевидно, пов'язані з ідентичними структурними послідовностями.

1. Гнатенко Д.В., Корнелюк А.И., Курочкин И.В. и др. Выделение и характеристика функционально активной протеолитически модифицированной формы тирозил-тРНК синтетазы из печени быка // Украинский биохимический журнал. – 1991. – 63, № 4. – С. 61-67. 2. Корнелюк А.И. Структурно-функциональное исследование тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих // Биополимеры и клетка. – 1998. – т. 14, № 4. – С. 349-359. 3. Леванец О.В., Найденов В.Г., Одынец К.А. и др. Гомология C-концевого некаталитического домена тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих с цитоксином ЕМАРІІ и некаталитическими доменами мети-

онил- и фенилаланил-тРНК синтетаз // Биополимеры и клетка. – 1997. – Т.13. – № 16. – С. 474-478. 4. Малишко С.В., Скороходова А.Ю., Зименов Д.В. и др. Использование метаболической регуляции для оптимизации экспрессии генов в бактериальных клетках – новое направление XXI века // Биотехнология. – 2002. – № 4. – С. 3-14. 5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 479с. 6. Рибкинская Т.А., Корнелюк А.И., Берестень С.Ф. и др. Иммунохимический подход к изучению структуры тирозил-тРНК синтетазы из печени быка // Биополимеры и клетка. – 1991. – т. 7, № 5. – С. 33-36. 7. Рожко О.Т., Корнелюк А.И., Рибкинская Т.А. и др. Получение поликлональных антител к тирозил-тРНК синтетазе из печени быка и характеристика двух форм фермента // Укр. биохим. журн. – 1997 – т. 69, №3. – С. 9-16. 8. Ivanov K.A., Moor N.A., Lavrik O.I. Non-canonical functions of aminoacyl-tRNA synthetases // Biochemistry (Moscov). – 65 (2000). – P. 888-897. 9. Jia, Li, Y. Jin, T.P. Wang. Expression, purification, and characterization of human tyrosyl-tRNA synthetase // Protein Expr. and Purif. – 27 (2003). – P. 104-108. 10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – V. 227, № 259. – P. 680-685. 11. Salde V.S., Khattar S.K., Singh Srinii K. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: review of the existing biotechnology strategies // Mol. Cell Biochem. – 307 (2008). – P. 249-264. 12. Sidorik L.L., Gudžera O.I., Dragovoz V.A. et al. Immuno-chemical non-cross-reactivity between eukaryotic and prokaryotic seryl-tRNA synthetases // FEBS Letters – V. 292, № 1, 2. – P. 76-78. 13. Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Applied Microbiology and Biotechnology. – 72 (2008). – P. 211-222.

Надійшла до редколегії 23.11.09

УДК 615.038

А. Полякова, студ., О. Вороніна, канд. біол. наук

МЕЛАНІН: НОВИЙ ЗАСІБ ПРОФІЛАКТИКИ РАКУ ШЛУНКА

На сьогодні рак є другою провідною причиною смертності людей після хвороб серця. Тому профілактика передракових захворювань є актуальною проблемою, далекою від вирішення. Останнім часом отримані дані про фармако-терапевтичні ефекти меланіну при патологіях різного генезу, однак роль меланіну в профілактиці передракових станів шлунка залишається нез'ясованою.

Cancer is estimated as a second major cause of human death worldwide, and the problem of its effective prevention is not resolved yet. Melanin was recently found to have a wide range of pharmacotherapeutic preventive actions in various pathologies. Despite this, its role in gastro-protection and stomach cancer is still not known.

Вступ. Рак шлунка складає значну проблему для сучасної онкології. В структурі онкозахворюваності рак цієї локалізації в Україні займає четверте місце і складає біля 30%.

Важливими факторами, що призводять до розвитку передракових хвороб, є інфекція *Helicobacter pilory* (Нр), нерегулярне харчування, вживання грубої їжі, знаходження сучасного суспільства у постійно спресованому стані, зловживання алкоголем, а також важливу роль відіграє генетична схильність до самої хвороби. Люди з генетичною схильністю знаходяться у групі ризику і потребують частого обстеження та відмови від шкідливих факторів [1].

В основі процесів розвитку гастроантропогенезу лежить порушення процесів регенерації, що в подальшому призводить до розвитку дисплазії. Під дисплазією розуміють стійкі морфофункціональні зміни оболонки, що заключаються в порушенні диференціювання та дозрівання клітин епітелію з появою нетипичних форм разом зі зміною структури епітеліальної поверхні [3].

Передракові захворювання шлунка. На сьогодні існує цілий спектр передракових захворювань шлунка та причин подальшого утворення раку шлунка:

– поліпи слизової оболонки шлунка: в цю групу включають аденоматозні поліпи, поліпи фундальних залоз та фіброїдні утворення. Гіперпластичні поліпи складають 25-40% всіх поліпів шлунка, але вони рідко здатні до ракової трансформації, тоді як аденоми, які рідше зустрічаються, значно частіше малигізуються. Так звані поліпозні синдроми (Пейтца-Джигерса, Гард-

нера, Кронкайта-Канада) також можуть послужити базою для раку шлунка, особливо синдром Гарднера [8].

– особливе місце в гастроантропогенезі займає проблема генетичної схильності до раку шлунка. Недавнє повне вивчення геному хворих на рак шлунка показало, що хромосома 2q33-q33 являється локусом для проксимального раку. Разом з тим склалося уявлення про 2 типи гастроантропогенезу – інтестинальний та дифузний. Перший розвивається за схемою: гастроіританти> хронічне запалення> атрофія> інтестинальна метаплазія> рак, другий за схемою: генетична схильність> мутації> дисплазії> аденоми> рак. Початковим етапом альтерації являються процеси де- та гіперметилування ДНК за рахунок зміни активності ДНК-метилтрансферази. При цьому виділяють 2 типи метилування генів – тип А (пов'язаний з віковими змінами) та тип С (тумор-специфічний). Зрозуміло, що процес гастроантропогенезу характеризується багатоступінчатістю і різним проявленням різних генів на різних етапах [8].

Також до факторів, що мають спадкову природу можна віднести: вміст пепсиногену 2 в сировотці крові; порушення в процесах секреції НСІ; вроджений дефіцит альфа-1-антитрипсину та альфа-2-макроглобуліну, що являються інгібіторами протеолітичних ферментів шлункового та панкреатичного соків, що захищають слизову оболонку від самоперетравлювання і беруть участь в фізіологічних процесах регенерації; відсутність 3-ї фракції холінестерази; відсутність в плазмі крові кишечно-го компоненту і зниження індексу В лужної фосфатази; змінена властивість відчувати смак фенілтіокарбаміду [9]; 1 група крові та позитивний резус-фактор. Роль