

Медико-биологические проблемы жизнедеятельности

Научно-практический рецензируемый журнал

№ 1(19)

2018 г.

Учредитель

Государственное учреждение
«Республиканский научно-
практический центр
радиационной медицины
и экологии человека»

Журнал включен в Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования диссертационных исследований по медицинской и биологической отраслям науки (31.12.2009, протокол 25/1)

Журнал зарегистрирован

Министерством информации
Республики Беларусь,
Свид. № 762 от 6.11.2009

Подписано в печать 10.04.18
Формат 60×90/8. Бумага мелованная.
Гарнитура «Times New Roman».
Печать цифровая. Тираж 100 экз.
Усл. печ. л. 23,25. Уч.-изд. л. 12,1.
Зак. 42/2.

Издатель ГУ «Республиканский
научно-практический центр
радиационной медицины и
экологии человека»
Свидетельство N 1/410 от 14.08.2014

Отпечатано в КУП
«Редакция газеты
«Гомельская праўда»
г. Гомель, ул. Полесская, 17а

ISSN 2074-2088

Главный редактор, председатель редакционной коллегии

А.В. Рожко (д.м.н., доцент)

Редакционная коллегия

В.С. Аверин (д.б.н., профессор, зам. гл. редактора),
В.В. Аничкин (д.м.н., профессор), В.Н. Беляковский (д.м.н., профессор), Н.Г. Власова (д.б.н., доцент, научный редактор),
А.В. Величко (к.м.н., доцент), И.В. Велякин (к.б.н., доцент),
А.В. Воропаева (к.м.н., доцент), В.В. Евсеенко (к.пс.н.),
С.В. Зыблева (к.м.н., отв. секретарь), С.А. Игумнов (д.м.н., профессор), И.Н. Коляда (к.м.н.), А.В. Коротаев (к.м.н., доцент), А.Н. Лызикив (д.м.н., профессор), А.В. Макавич (к.м.н., доцент), С.Б. Мельнов (д.б.н., профессор), Я.Л. Навменова (к.м.н.), Э.А. Надьров (к.м.н., доцент),
И.А. Новикова (д.м.н., профессор), Э.Н. Платошкин (к.м.н., доцент), Э.А. Повелица (к.м.н.), Ю.И. Рожко (к.м.н., доцент), И.П. Ромашевская (к.м.н.), М.Г. Русаленко (к.м.н.), А.П. Саливончик (к.б.н.), А.Е. Силин (к.б.н.), А.Н. Стожаров (д.б.н., профессор), А.Н. Цуканов (к.м.н.), Н.И. Шевченко (к.б.н., доцент), Ю.И. Ярец (к.м.н., доцент),

Редакционный совет

В.И. Жарко (зам. премьер-министра Республика Беларусь, Минск), А.В. Аклеев (д.м.н., профессор, Челябинск), С.С. Алексанин (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), Д.А. Базыка (д.м.н., профессор, Киев), А.П. Бирюков (д.м.н., профессор, Москва), Е.Л. Богдан (Начальник Главного управления организации медицинской помощи Министерства здравоохранения), Л.А. Бокерия (д.м.н., академик РАН и РАМН, Москва), А.Ю. Бушманов (д.м.н., профессор, Москва), И.И. Дедов (д.м.н., академик РАМН, Москва), М.П. Захарченко (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), Л.А. Ильин (д.м.н., академик РАМН, Москва), К.В. Котенко (д.м.н., профессор, Москва), В.Ю. Кравцов (д.б.н., профессор, Санкт-Петербург), Н.Г. Кручинский (д.м.н., Минск), Т.В. Мохорт (д.м.н., профессор, Минск), Д.Л. Пиневиц (Минск), В.Ю. Рыбников (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), Н.Д. Тронько (д.м.н., профессор, Киев), В.А. Филонюк (к.м.н., доцент, Минск), Р.А. Часнойть (к.э.н., Минск), В.Е. Шевчук (к.м.н., Минск), В.Д. Шило (Минск)

Технический редактор

С.Н. Никонович

Адрес редакции 246040 г. Гомель, ул. Ильича, д. 290,
ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ», редакция журнала
тел (0232) 38-95-00, факс (0232) 37-80-97
<http://www.mbp.rcrm.by> e-mail: mbp@rcrm.by

© Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр
радиационной медицины и экологии человека», 2018

№ 1(19)
2018

**Medical and
Biological Problems
of Life Activity**
Scientific and Practical Journal

Founder

Republican Research Centre
for Radiation Medicine
and Human Ecology

Journal registration
by the Ministry of information
of Republic of Belarus

Certificate № 762 of 6.11.2009

© Republican Research Centre
for Radiation Medicine
and Human Ecology

ISSN 2074-2088

Содержание

Content

Обзоры и проблемные статьи

Reviews and problem articles

- Н.Г. Власова**
Гигиеническая регламентация облучения человека 6
- Е.С. Пашинская, В.В. Поляржин, В.М. Семенов**
Паразитирование токсоплазм и его некоторые медико-биологические аспекты (обзор литературы, часть 1) 14

- N.G. Vlasova**
Hygienic regulation of human radiation 6
- E.S. Pashinskaya, V.V. Pabiarzhyn, V.M. Semenov**
The parasite *Toxoplasma gondii* and some medical and biological aspects (literature review, part 1) 14

Медико-биологические проблемы

Medical-biological problems

- К.Н. Буздалькин**
Облучение персонала в результате ингаляционного поступления радионуклидов при пожарах в зонах отчуждения и отселения Чернобыльской АЭС 25
- Л.А. Горбач**
Риск туберкулеза у детей и подростков с различными заболеваниями в пострадавших от чернобыльской катастрофы районах 33
- М.В. Кадука, Л.Н. Басалаева, Т.А. Бекяшева, С.А. Иванов, Н.В. Салазкина, В.В. Ступина**
Результаты радиационного контроля пищевой продукции на загрязненных территориях российской федерации в отдаленный период после аварии на ЧАЭС 40
- Т.А. Кормановская**
Контроль и учет доз природного облучения населения Российской Федерации 48
- С. Д. Кулеш**
Сравнительный анализ эпидемиологии внутримозгового кровоизлияния в Республике Беларусь и других странах 55
- С.Н. Соколовская, Л.Г. Карпишевич, Н.П. Минько, В.А. Пономарев, В.А. Игнатенко, Б.К. Кузнецов**
Изотопы радона и их использование при водолечении в санатории «Радон» 60

- K.N. Bouzdalkin**
Irradiation of the personnel as a result of radionuclides inhalation during fires in Chernobyl exclusion zone 25
- L.A. Gorbach**
The risk of tuberculosis in children and adolescents with various diseases in affected by the Chernobyl disaster areas 33
- M.V. Kaduka, L.N. Basalajeva, T.A. Bekjasheva, S.A. Ivanov, N.V. Salaskjina, V.V. Stupina**
The results of radiation control of the foodstuffs from contaminated territories of Russian Federation in the remote period after the accident on Chernobyl NPP 40
- T.A. Kormanovskaja**
Control and accounting of the natural exposure doses population Russian Federation 48
- S. D. Kulesh**
Comparative analysis of the epidemiology of intracerebral hemorrhage in the Republic of Belarus and other countries 55
- S.N. Sakaloukaya, L.H. Karpishevich, N.P. Minko, V.A. Panamareu, V.A. Ignatenko, B.K. Kuznecov**
Radon isotopes and their application in hydrotherapy in health center «Radon» 60

- А.С. Соловьев, М.А. Пимкин, Т.А. Анащенко**
Влияние делеции субдомена инозин-5'-монофосфат дегидрогеназы и точечных мутаций гена фермента, ассоциированных с пигментным ретинитом, на её активность и нуклеотидные пулы *Escherichia coli* 66
- Л.А. Чунихин, А.Л. Чеховский, Д.Н. Дроздов**
Обоснование возможности определения критических зон радоноопасности по косвенным показателям радона 72
- Л.Н. Эвентова, А.Н. Матарас, Ю.В. Висенберг, Н.Г. Власова**
Динамика соотношения доз внешнего и внутреннего облучения жителей населенных пунктов, находящихся на территориях с различной плотностью радиоактивного загрязнения 80
- Ю.И. Ярец, И.А. Славников, З.А. Дундаров, Н.Н. Шибасва**
Информативность цитологического и гистологического методов исследования для оценки состояния воспалительной и пролиферативной фаз репарации гранулирующей раны 86

Клиническая медицина**Clinical medicine**

- Р.В. Авдеев, А.С. Александров, Н.А. Бакунина, Д.А. Белая, А.Ю. Брежнев, Н.В. Волкова, Л.М. Габдрахманов, И.Р. Газизова, А.Б. Галимова, В.В. Гарькавенко, А.М. Гетманова, В.В. Городничий, А.А. Гусаревич, Д.А. Дорофеев, Ю.Ф. Дюкарева, П.Ч. Завадский, А.Б. Захидов, О.Г. Зверева, У.Р. Каримов, И.В. Кондракова, А.В. Куроедов, С.Н. Ланин, Дж.Н. Ловпаче, Е.В. Молчанова, З.М. Нагорнова, О.Н. Онуфрийчук, С.Ю. Петров, Ю.И. Рожко, Ж.О. Сангилбаева, А.В. Селезнев, Л.Б. Таштитова, С.В. Усманов, А.С. Хохлова, А.П. Шахалова, Р.В. Шевчук**
Анализ вариантов гипотензивного лечения пациентов с первичной открытоугольной глаукомой по результатам многоцентрового исследования в клиниках шести стран 95
- A.S. Soloviov, M.A. Pimkin, T.A. Anaschenkova**
The subdomain deletion effect of the inosine-5'-monophosphate dehydrogenase and point mutations of the enzyme gene, associated with retinitis pigmentosa, on its activity and *Escherichia coli* nucleotide pools
- L. Chunikhin, A. Chekhovskiy, D. Drozdov**
Justification of the possibility for determining critical zones of radon danger on indirect radon indicators
- L.N. Eventova, A.N. Mataras, Y.V. Visenberg, N.G. Vlasova**
Dynamics of ratio of external and internal exposure doses of residents of settlements in territories with various density of radioactive contamination
- Y.Yarets, I. Slavnikov, Z. Dundarov, N.Shibasva**
Informativeness of cytological and histological research methods for assessing the state of inflammatory and proliferative reparation phases of granulated wounds

- А.В. Бойко**
Дебют моторных проявлений болезни Паркинсона. Роль стресса 112
- А.В. Величко, В.В. Похожай, З.А. Дундаров, С.Л. Зыблев**
Дифференцированный подход к хирургическому лечению первичного гиперпаратиреоза 118
- Н.В. Галиновская**
Состояние синтеза активных форм азота у пациентов с преходящими нарушениями мозгового кровообращения и лакунарным инсультом 129
- А.Ю. Захарко**
Предикторы развития неблагоприятных исходов беременности у женщин с метаболическим синдромом 142
- О.Н. Кононова, А.М. Пристром, А.В. Коротаев, Н.В. Николаева, О.В. Зотова, Е.В. Ковш, Я.Л. Навменова**
Применение суточного мониторингования артериального давления у беременных с метаболическим синдромом: анализ результатов 149
- А.С.Подгорная, Т.С. Дивакова**
Ультразвуковые критерии эффективности применения гистерорезектоскопической абляции эндометрия и левоноргестрелсодержащей внутриматочной системы в лечении меноррагий, ассоциированных с аденомиозом 157
- A.V. Boika**
The debut of motor symptoms of Parkinson's disease. The role of stress
- A.V. Velichko, V.V. Pohozhay, Z.A. Dundarov, S.L. Zyblev**
Differentiated approach to operant therapy of primary hyperparathyroidism
- N.V. Halinouskaya**
Status of active nitric oxide forms synthesis in patients with passing infringements of brain blood circulation and lacunar stroke
- A. Zakharko**
Predictors of development of adverse pregnancy outcome in women with metabolic syndrome
- O. Kononova, A. Pristrom, A. Korotaev, N. Nikolaeva, O. Zotova, E. Kovsh, Y. Navmenova**
Application of daily monitoring of arterial blood pressure in pregnant women with metabolic syndrome: analysis of results
- A.S.Podgornaya, T.S. Divakova**
Ultrasonic parameters of the uterus and ovaries in dynamics in patients with endometriosis of the uterus complicated by menorrhagia under the use of hystereselectoscopic ablation of the endometrium and levonorgestrel-containing intrauterine system

Обмен опытом**Experience exchange**

- М.В. Кажина**
Мозг как эндокринный орган. Биологические эффекты и терапевтические возможности нейростероидов с позиции гинеколога (Клиническая лекция) 167
- M.V. Kazhyna**
The brain as endocrine organ. Biological effects and therapeutic possibilities of neurosteroids (Clinical lecture)

УДК 575.224.2:577.15

А.С. Соловьев, М.А. Пимкин,
Т.А. Анащенкова**ВЛИЯНИЕ ДЕЛЕЦИИ СУБДОМЕНА ИНОЗИН-5'-МОНОФОСФАТ
ДЕГИДРОГЕНАЗЫ И ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ ГЕНА ФЕРМЕНТА,
АССОЦИИРОВАННЫХ С ПИГМЕНТНЫМ РЕТИНИТОМ, НА ЕЁ
АКТИВНОСТЬ И НУКЛЕОТИДНЫЕ ПУЛЫ *ESCHERICHIA COLI***ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет», г. Смоленск, Россия
Онкологический центр Fox Chase, Филадельфия, США

Исследована активность инозин-5'-монофосфат дегидрогеназы (ИМФДГ), содержащая пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов при делеции домена Бейтмана (субдомена) фермента и точечных мутациях, ассоциированных с пигментным ретинитом. Мутантные формы *E. coli* были получены с применением технологии двухэтапного рекомбинирования. Удаление субдомена ИМФДГ не оказывало влияния на каталитическую активность фермента *in vivo*. *In vitro* было обнаружено снижение активности фермента в экстрактах мутантного штамма по сравнению с активностью ИМФДГ в экстрактах *E. coli* дикого типа. Снижение ферментативной активности ИМФДГ *in vitro* связано со снижением количества белка-фермента в клеточных экстрактах, что было определено иммуноблоттингом. Исследование пулов нуклеотидов в клеточных экстрактах мутантных форм выявило повышение пула аденозин-5'-трифосфата (АТФ) при одновременном снижении пулов гуаниловых нуклеотидов. В противоположность полному удалению субдомена ИМФДГ точечные мутации гена ИМФДГ, ассоциированные с пигментным ретинитом, вызывали снижение пула АТФ штаммов-мутантов. Пулы гуаниловых нуклеотидов при этом не изменялись у всех мутантов. Это может свидетельствовать о двустороннем влиянии субдомена ИМФДГ на синтез адениловых нуклеотидов у *E. coli*.

Ключевые слова: инозин-5'-монофосфат дегидрогеназа, нуклеотиды, аденозин-5'-трифосфат, мутации, субдомен

Введение

Инозин-5'-монофосфат дегидрогеназа (ИМФДГ; КФ 1.1.1.205) играет ключевую роль в обмене пуриновых нуклеотидов, катализируя превращение инозин-5'-монофосфата в ксантин-5'-монофосфат с последующим образованием гуаниловых нуклеотидов [4, 14]. Гуаниловые нуклеотиды – важнейшие компоненты клетки, участвующие в процессах хранения и передачи наследственной информации, энергообеспечения клетки, процессах сигнальной трансдукции [1]. Ингибиторы ИМФДГ снижают клеточный пул гуаниловых нуклеотидов и обладают антипролиферативным действием, что лежит в основе их клинического применения как противоопухолевых и иммуносупрессивных препаратов [10].

В структуре ИМФДГ в дополнение к каталитическому домену выделяют домен Бейтмана (субдомен). Несмотря на почти абсолютную консервативность у представителей всех четырёх царств клеточных организмов, функциональное назначение домена недостаточно исследовано [4, 14]. В тоже время известно, что точечные мутации в последовательности гена ИМФДГ-1 человека, кодирующей субдомен, приводят к наследственным болезням, включая наследственную форму пигментного ретинита – тяжёлого дегенеративного заболевания сетчатки, приводящего к слепоте [4, 13].

Более глубокое понимание процессов, протекающих с участием ИМФДГ, регуляторной роли её субдомена может способствовать не только раскрытию патогене-

тических механизмов некоторых заболеваний, но и стать основой для разработки лекарственных препаратов [14].

Целью настоящего исследования явилось изучение активности инозин-5'-монофосфат дегидрогеназы, пулов пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов при делеции субдомена ИМФДГ и точечных мутациях гена фермента, ассоциированных с пигментным ретинитом.

Материал и методы исследования

Мутант *E. coli* с удалённой последовательностью субдомена ИМФДГ штамм MP101 *guaB^{ΔCBS}* был сконструирован на основе штамма *E. coli* BW25113 с применением технологии двухэтапного рекомбинирования [3, 8]. На первом этапе нуклеотидная последовательность, кодирующая субдомен в структуре хромосомного гена *guaB* (аминокислотные остатки №№ 116-238 в структуре ИМФДГ), замещалась геном канамицин фосфотрансферазы (*kan*), фланкированным сайтами распознавания FRT-рекомбиназы. Для этого ген *kan*, фланкированный FRT-последовательностями, ПЦР-амплифицировали с плазмиды pKD4. При этом использовали химерные праймеры, содержащие на 5'-концах ДНК-последовательности, гомологичные последовательностям, фланкирующим сайт рекомбинации в хромосоме.

На втором этапе рекомбинации ген канамицин фосфотрансферазы удаляли действием FRT-рекомбиназы. Рекомбинанты селективировали на минимальной среде как колонии, вновь приобретшие способность к прототрофии. Полученный штамм, обозначенный MP101 (*guaB^{ΔCBS}*), содержал делецию субдомена ИМФДГ с сохранением рамки считывания каталитического домена.

Для получения штаммов *E. coli*, несущих точечные мутации в хромосомном гене *guaB*, вновь была использована технология двухэтапного рекомбинирования [3, 8]. В качестве материнского штамма был использован канамицин-резистентный гуанин ауксотрофный штамм MP41. На первом этапе использовали технологию сайт-направленного

мутагенеза для внесения нужных мутаций в плазмидный вектор, содержащий ген *guaB* дикого типа. В качестве матрицы для сайт-направленного мутагенеза использовалась плазида *pGUAB*. На втором этапе мутированные гены ПЦР-амплифицировались с полученных плазмид. После этого очищенные ПЦР-продукты использовались для рекомбинирования в хромосому штамма MP41, который в результате терял устойчивость к канамицину, но возвращался к прототрофии. Рекомбинанты были селективированы на минимальной среде без гуанина. Для верификации мутаций ген *guaB* рекомбинантов ПЦР-амплифицировали и подвергали автоматическому секвенированию.

Измерение внутриклеточных концентраций нуклеотидов (нуклеотидных пулов) проводили методом мечения экспоненциально-растущих клеток *E. coli* в минимальной среде с добавлением радиоактивного изотопа фосфора в виде $H_3^{33}PO_4$ [5, 15]. Клеточные экстракты получали методом кислотной экстракции без отделения клеток от среды [4]. Для разделения, визуализации и измерения меченых нуклеотидов в смеси применялись методы одно- и двухмерной тонкослойной жидкостной хроматографии на фосфоэтилениминцеллюлозных пластинах [5]. Радиоавтографы получали экспозицией хроматографической пластины с радиочувствительным экраном компании Fujifilm. Для измерения и нормализации сигнала «пятен» хроматограмм, соответствующих индивидуальным нуклеотидам, использовалась компьютерная программа MultiCaugel компании Fujifilm. Абсолютные клеточные концентрации АТФ измеряли люциферазным анализом с использованием набора Enliten® (компания Promega, США). Концентрации других нуклеотидов определяли путём сравнения интенсивности радиосигналов, полученных от соответствующих «пятен», с интенсивностью сигнала от АТФ [5].

Активность ИМФДГ определяли в белковых экстрактах клеточной культуры *E. coli*. Для получения белковых экстрактов клеточную культуру, находящуюся в экс-

потенциальной фазе роста, осаждали центрифугированием. Полученную клеточную массу промывали раствором для экстракции, вновь осаждали центрифугированием, ресуспензировали в том же растворе до плотности ~ 10¹¹ КОЕ/мл. Клетки лизировали аппаратом French pressure cell press производства компании American Instrument Company, США. Полученный лизат фильтровали через 0,2-микронный вакуумный фильтр (Millipore, США) и подвергали диализу с использованием раствора для экстракции при 4°C в течение 12-16 часов. Общую концентрацию белка в препаратах определяли методом Bradford assay (BioRad, США) [6]. Для измерения активности ИМФДГ использовали 0,02-0,03 мг белка клеточного экстракта *E. coli* в реакционной смеси, содержащей 100 мМ трис-НСl рН 8,1, 10мМ КСl, 0,1мМ НАД, 0,1 мМ ИМФ. Формирование продукта реакции ксантин-5'-монофосфата определяли спектрофотометрически по увеличению поглощения при 290 нм [9].

Ошибки изменений физиологических параметров (пулы нуклеотидов, активность фермента) анализировали путем расчета стандартного отклонения [2]. Статистическую достоверность различий измеряемых параметров оценивали путем расчета t-критерия Стьюдента в программе Sigma Plot v.10.10. Различия считали достоверными при p<0,05.

Результаты исследования

Полученный мутантный штамм *E. coli* MP101 (*guaB^{ΔCBS}*) характеризовался идентичной дикому типу скоростью роста как на насыщенных, так и минимальных средах. Это свидетельствовало, что несмотря на делецию субдомена в гене фермента каталитическая функция ИМФДГ *in vivo* сохраняется. В то же время *in vitro* было обнаружено снижение активности фермента в экстрактах штамма MP101 (*guaB^{ΔCBS}*) по сравнению с активностью ИМФДГ в экстрактах *E. coli* дикого типа (таблица 1).

Для установления причин снижения активности ИМФДГ *in vitro* был проведен им-

Таблица 1 – Активность фермента ИМФДГ в клеточных экстрактах *E. coli* штаммов BW25113 и MP101

Активность фермента (нмоль/мг белка)		
Штамм BW25113	Штамм MP101	p
25,55±3,43	11,83±1,4	<0,001

муноблоттинг белковых клеточных экстрактов штаммов BW25113 и MP101 с поликлональными антителами к ИМФДГ. Было обнаружено, что снижение ферментативной активности ИМФДГ сопровождается снижением количества белка-фермента, регистрируемого иммуноблоттингом (рисунок 1).

При этом наблюдалось накопление низкомолекулярных продуктов детектируемых анти-ИМФДГ антителами в белковых экстрактах штамма *E. coli* MP101(*guaB^{ΔCBS}*).

Таким образом, удаление субдомена снижает внутриклеточную стабильность ИМФДГ и предрасполагает белок к протеолизу, что регистрируется иммуноблоттингом как накопление низкомолекулярных продуктов протеолиза.

Измерение внутриклеточной концентрации (пулов) нуклеотидов в клеточных экстрактах штаммов BW25113 и MP101(*guaB^{ΔCBS}*) показано, что резко отли-

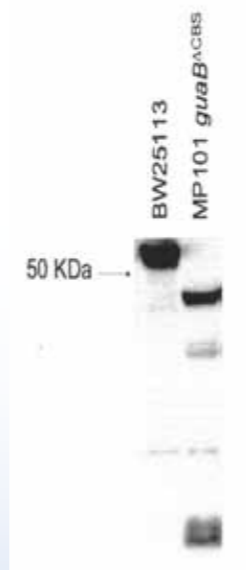


Рисунок 1 – Иммуноблоттинг белковых экстрактов штаммов BW25113 и MP101(*guaB^{ΔCBS}*) с поликлональными анти-ИМФДГ антителами

чающимся между мутантным и диким типом является пул АТФ, содержание которых значительно выше у *E. coli* MP101 (таблица 2). Концентрации других нуклеотидов, включая гуанилаты и пиримидиновые нуклеотиды, изменялась в меньшей степени.

Снижение пулов гуаниловых нуклеотидов в клеточных экстрактах штамма MP101 можно объяснить повышением синтеза АТФ и возникающим вследствие этого дефицита 5'-фосфорибозил-1-пирофосфата.

Таким образом, несмотря на то, что ИМФДГ является ферментом биосинтеза гуаниловых нуклеотидов и не участвует непосредственно в синтезе аденилового пула, удаление субдомена ИМФДГ приводит к значительному повышению внутриклеточных концентрации АТФ.

Наблюдаемые изменения пулов нуклеотидов мутанта *E. coli* позволяет предположить, что эффект удаления субдомена ИМФДГ может распространяться не только на активность этого фермента, но и на другие ферменты обмена пуриновых нуклеотидов, в частности, на ферменты синтеза аденилатов. Можно полагать, что субдомен ИМФДГ может являться трансрегулятором аденилового синтеза.

Для исследования влияния точечных мутаций, ассоциированных с пигментным ретинитом, на пулы нуклеотидов *E. coli* была создана коллекция штаммов, несущих соответствующие мутации на хромосомном гене *guaB E. coli* (таблица 3).

При получении мутантных штаммов мы опирались на имеющиеся данные, что все аминокислотные остатки ИМФДГ – 1 человека, замены которых приводят к пигментному ретиниту, консервативны или полуконсервативны в ИМФДГ *E. coli* [11].

Измерение нуклеотидных пулов рекомбинантов показало неожиданный результат. В противоположность полному удалению субдомена некоторые точечные мутации гена ИМФДГ, ассоциированные с пигментным ретинитом, вызывали снижение пулов АТФ штаммов-мутантов. Пулы гуаниловых нуклеотидов не изменялись у всех мутантов (рисунок 2).

Таблица 2 – Внутриклеточные концентрации (пула) нуклеотидов штаммов *E. coli* MP101 и *E. coli* BW25113 (мМ)

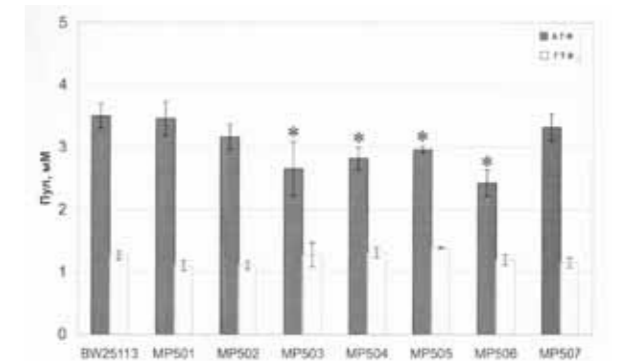
Нуклеотиды	Штаммы <i>E. coli</i>	
	BW25113	MP101
АТФ	3,500±0,200	6,190±0,270**
АДФ	0,220±0,022	0,264±0,057
АМФ	0,215±0,078	0,255±0,090
ГТФ	1,726±0,132	1,228±0,179*
ГДФ	0,069±0,011	0,060±0,014
ИМФ	0,386±0,064	0,513±0,153
УТФ	1,163±0,253	0,732±0,150*
ЦТФ	0,662±0,119	0,443±0,068*

Примечание: * – p<0,05; ** – p<0,01

Таблица 3 – Коллекция мутантных штаммов *E. coli* и соответствующие им аминокислотные замены в структуре ИМФДГ *E. coli*, ассоциированные с пигментным ретинитом

Мутантные штаммы <i>E. coli</i>	Аминокислотные замены в ИМФДГ мутантов
MP501	R84W
MP502	T95M
MP 503	D138N
MP504	D200N
MP505	E205P
MP506	K212E
MP507	V242I

Таким образом, точечные мутации гена ИМФДГ, ассоциированные с пигментным ретинитом, имеют эффект противоположный полному удалению субдомена. Это мо-



Примечание: * – пулы, показавшие статистически достоверные различия (p<0,05) с соответствующим значением дикого типа (пул АТФ BW25113)

Рисунок 2 – Влияние мутаций, ассоциированных с пигментным ретинитом, на нуклеотидные пулы *E. coli*

жет свидетельствовать о двустороннем эффекте субдомена ИМФДГ на синтез адениловых нуклеотидов *E. coli*.

Выводы

Удаление субдомена ИМФДГ не оказывает влияние на каталитические параметры фермента *in vivo*, но снижает его количество в клетке, что регистрируется как снижение ферментативной активности *in vitro* в клеточных экстрактах.

Полное удаление субдомена фермента ИМФДГ приводит к увеличению пула АТФ *E. coli* МР101(*guaB^{ΔCBS}*). В противоположность удалению субдомена точечные мутации в гене *guaB* ИМФДГ, ассоциированные с пигментным ретинитом, вызывают снижение пулов АТФ штаммов-мутантов, что может свидетельствовать о двустороннем эффекте субдомена на синтез пуриновых нуклеотидов *E. coli*.

Точечные мутации в последовательности гена ИМФДГ, кодирующей субдомен, не оказывают влияния на пулы гуаниловых нуклеотидов, что может свидетельствовать об отсутствии регуляторного влияния субдомена ИМФДГ на гуаниловый синтез.

Библиографический список

1. Бауков, Ю.И. Биоорганическая химия. / Ю.И. Бауков, Н.А. Тюкавкина, С.Э. Зурбян. – М.: Гэотар-Медицина, 2009. – 416 с.
2. Медик, В.А. Статистика в медицине и биологии. / В.А. Медик, М.С. Токмачев, Б.Б. Фишман. – М.: Медицина, 2000. – 412 с.
3. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli* / D. Yu [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2000. – V. 97. – N. 11. – P. 5978-5983.
4. A nucleotide-controlled conformational switch modulates the activity of eukaryotic IMP dehydrogenases / R.M. Buey [et al.] // *Scientific reports*. – 2017. – V. 7. – P. 2648.
5. Bochner, B.R. Complete analysis of cellular nucleotides by two-dimensional thin layer chromatography / B.R. Bochner, B.N. Ames // *J Biol Chem*. – 1982. – V. 257, N. 16. – P. 9759-9769.

6. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Anal Biochem*. – 1976. – V. 72, N. – P. 248-254.

7. Crystallographic studies of two variants of *Pseudomonas aeruginosa* IMPH with impaired allosteric regulation / G. Labesse [et al.] // *Acta crystallographica section D-Structural biology*. – 2015. – V. 71, N. 9. – P. 1890-1899.

8. Datsenko, K.A. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PSR products / K.A. Datsenko, B.L. Wanner // *Proc Natl Acad USA*. – 2000. – V. 97, N. 12. – P. 6640-6645.

9. Expression, purification and characterization of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase from *Borrelia burgdorfi* / X. Zhou [et al.] // *J Biol Chem*. – 1997. – V. 272, N. 35. – P. 21977-21981.

10. Guanine nucleotide binding to the Bateman domain mediates the allosteric inhibition of eukaryotic IMP dehydrogenases / R.M. Buey [et al.] // *Nature communications*. – 2015. – V. 6. – P. 8923.

11. Hedstrom, L. IMP dehydrogenase – linked retinitis pigmentosa / L. Hedstrom // *Nucleosides Nucleotides Acids*. – 2008. V. 27, N. 6. – P. 839 – 849.

12. High efficiency mutagenesis, repair and engineering of chromosomal DNA single-stranded oligonucleotides / H.M. Ellis [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2001. – V. 98, N. 12. – P. 6742-6746.

13. On the molecular pathology of neurodegeneration in IMPDH1-based retinitis pigmentosa / A. Aherne [et al.] // *Hum. Mol Genet*. – 2004. – V. 13, N.6. – P. 641-650.

14. Synthesis of the inosine – 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) inhibitors / G. Cholewinski et al. // *J Enzyme Med Chem*. – 2015. – V. 30, N. 4. – P. 550-563.

15. Thin – layer chromatographic methods to isolate 32 p-labeled 5-phosphoribosyl-alpha-1-pyrophosphate (PRPP): determination of cellular PRPP pools and assay of PRPP synthetase activity / K.F. Jensen [et al.] // *Anal Biochem*. – 1979. – V. 98, N. 2. – P. 254-263.

A.S. Soloviov, M.A. Pimkin, T.A. Anaschenkova

THE SUBDOMAIN DELETION EFFECT OF THE INOSINE-5'-MONOPHOSPHATE DEHYDROGENASE AND POINT MUTATIONS OF THE ENZYME GENE, ASSOCIATED WITH RETINITIS PIGMENTOSA, ON ITS ACTIVITY AND *ESCHERICHIA COLI* NUCLEOTIDE POOLS

We investigated the activity of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, the content of purine and pyrimidine nucleotides during the deletion of the Bateman domain (subdomain) of IMPDH and point mutations associated with the retinitis pigmentosa. Mutant forms of *E. coli* were obtained using the two-step recombination technology. Deletion of the subdomain of IMPDH does not affect the catalytic activity of the enzyme *in vivo*. *In vitro*, the decrease in the activity of the enzyme in extracts of mutant strain was found in comparison with the activity of IMPDH in *E. coli* extracts of wild type. The reduction of the enzymatic activity of IMPDH *in vitro* is associated with the decrease in the amount of enzyme protein in cellular extracts, which was detected by immunoblotting. The investigation of nucleotide pools in cell extracts of mutant forms revealed the increase in the pool of ATP with simultaneous decrease in the pool of guanine nucleotides. In contrast to the complete deletion of the IMPDH subdomain, the point mutations of the IMPDH gene associated with the retinitis pigmentosa caused a decrease in the ATP pools of mutant strains. The pools of guanine nucleotides did not change in any mutants. This may indicate a bilateral influence of the IMPDH subdomain on the synthesis of adenine nucleotides in *E. coli*.

Key words: *inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, nucleotides, adenosine-5'-triphosphate, mutations, subdomain*

Поступила 28.03.2018