

ОЧИСТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ НОВОГО БЕЛКА
ФЛАВОПРОТЕИДНОЙ ПРИРОДЫ
ИЗ ХРОМАФФИННЫХ ГРАНУЛПЕТРОСЯН С. А., БОЯДУЖЯН А. С., КАРАГЕЗЯН К. Г.,
АВАКЯН С. А., АБРАМОВ Р. Е.

Институт экспериментальной биологии АН Армении

Сообщается об обнаружении в хромаффинных гранулах электронного переносчика флавопротенидной природы. Описан метод очистки, позволяющий получать этот белок в электрофоретически гомогенном состоянии; определены его основные физико-химические свойства. Исследовано взаимодействие флавопротенида с рядом окислителей и восстановителей. Показано, что *in vitro* флавопротенид способен переносить электроны на цитохром b_{561} из мембран гранул.

Хромаффинные гранулы (ХГ)—специфические субклеточные образования, осуществляющие процессы накопления, хранения и высвобождения катехоламинов и локализованные в основном в мозговом слое надпочечников и окончаниях адренергических нейронов центральной и симпатической нервных систем [1, 2]. В мембранах ХГ был обнаружен ряд белков, способных к участию в окислительно-восстановительных реакциях—цитохром b_{561} , кислый медьсодержащий белок (КМБ), мембранная форма дофамин- β -монооксигеназы (м-ДБМ) и NADH: (акцептор) редуктаза [1—3]. Основываясь на этих данных, мы высказали предположение о наличии в мембранах ХГ цепи переноса электронов. Несмотря на достаточное количество экспериментальных данных и различных гипотез относительно порядка расположения компонентов, природы конечного акцептора и функций этой цепи [4, 5], эти вопросы на сегодняшний день остаются в числе нерешенных.

Нами был обнаружен еще один возможный компонент цепи переноса электронов ХГ—флавопротенид (ФП). Описан метод очистки, позволяющий получить этот белок в электрофоретически гомогенном состоянии; определены его основные физико-химические свойства и сравнены со свойствами соответствующих микросомных и митохондриальных аналогов. Исследовано взаимодействие ФП с рядом окислителей и восстановителей. Показано, что *in vitro* ФП способен переносить электроны на цитохром b_{561} . Ранее нами было установлено, что КМБ может принимать электроны от цитохрома b_{561} и переносить их на м-ДБМ, функционируя в качестве донора электронов в реакциях, катализируемых этим ферментом [6, 7]. Таким образом, при-

нимая во внимание представленные в данной работе и ранее полученные нами результаты, мы предполагаем, что обнаруженный нами ФП может являться одним из компонентов цепи переноса электронов ХГ, конечным акцептором которой является ДБМ; цепь включает следующую последовательность электронных переносчиков: ФП—цитохром b_{561} -мКМБ-мДБМ.

Материалы и методы

ХГ из мозгового слоя надпочечников крупного рогатого скота получали модификацией метода Hoffmann и соавт. [8]. Чистоту ХГ контролировали электронно-микроскопическим способом. Кроме того, нами была определена активность цитохромоксидазы—маркерного фермента мембран митохондрий. Активность цитохромоксидазы определяли ранее описанным методом [9]. Гранулы суспендировали в 1,5 мМ K^+ , Na^+ -фосфатном буфере, pH 6,5, содержащем 1%-ный NaCl и гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера. Лизис проводили трехкратным замораживанием суспензии и последующим размораживанием. Концентрация суспензии составляла 10% (вес/объем). Лизат центрифугировали при 4000 g, в течение 2-х ч, после чего осадок суспендировали в 1/4 части начального объема буфера и снова центрифугировали при тех же условиях. Суммарный надосадочный раствор был далее использован как источник для получения ФП. При отсутствии в буфере 1%-ного NaCl экстракция ФП практически не происходила. В процессе очистки был использован 10 мМ K^+ , Na^+ -фосфатный буфер, pH 6,5. Выход ФП на всех стадиях очистки регистрировали по наличию характерной для данного белка желтой окраски.

Белок определяли по методу Lowry, используя БСА в качестве стандарта [10]. Цитохром b_{561} , мембранные формы КМБ и ДБМ получали ранее описанным методом [11, 12].

Содержание углеводов в препаратах ФП определяли модификацией метода Zacharius, Zell [13]: о наличии углеводов судили по розовой окраске, появляющейся в зафиксированном в геле белке после окисления его 1%-ной йодной кислотой и взаимодействия с реактивом Шиффа. NADH и NADPH: (акцептор) редуктазную активность ФП определяли спектрофотометрически [14] в 50 мМ K^+ -фосфатном буфере, pH 7,6, используя в качестве акцепторов электроноферрицианид, метиленовый синий, КМБ (окисленный) и цитохром b_{561} (окисленный).

При изучении донорно-акцепторных специфичностей ФП, окисление или восстановление соответствующих белковых препаратов проводили инкубацией (в течение 10 мин при комнатной температуре с 10-кратным молярным избытком окислителя или восстановителя, избыток которых удаляли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25. Величину M_r определяли гель-фильтрацией на сефадексе G-100 [15], а также электрофорезом (ЭФ) в 7,5% полиакриламидном геле (ПААГ) с 0,1%-ным ДДС-Na препаратов белка, пред-

варительно инкубированных в течение 2-х ч при 38° в присутствии 2%-ного ДДС-Na или 2%-ного ДДС-Na и 5%-ного β-меркаптоэтанола [16]. В качестве электродного буфера использовали Na⁺-фосфатный буфер, pH 7,0. Нулевой объем колонки определяли по объему выхода декстрана синего (2000 кД). При калибровке колонки и гелей были использованы следующие белки-маркеры: РНКаза (13,7 кД), лактальбумин (14,2 кД), трипсиноген (24 кД), химотрипсиноген (25 кД), глицеральдегидтрифосфат-дегидрогеназа (36 кД), овальбумин (43 кД), БСА (66 кД), β-галактозидаза (116 кД), альдолаза (158 кД), каталаза (232 кД), тиреоглобулин (669 кД). Гели окрашивали Кумасси синим. В качестве низкомолекулярного маркера использовали бромфеноловый синий.

О гомогенности белковых препаратов судили по наличию одноклонового пика в элюционной диаграмме, построенной по поглощению при 280 нм, в ходе гель-фильтрации белка через колонку с сефадексом G-100 и по наличию одной белковой полосы при ЭФ в 7,5%-ном ПААГ, pH 8,9 по методу Davis [17]. В качестве электродного буфера использовали трис-глициновый буфер, pH 8,3.

Качественную и количественную идентификацию простетической группы ФП проводили двумя независимыми методами: 1—методом флуоресцентного анализа, основанным на значительном различии зависимости флуоресценции флавинадениндинуклеотидов (ФАД) и флавимононуклеотидов (ФМН) от pH среды [18]; 2—спектрофотометрическим анализом и ТСХ отделенного от белковой части флавина. ФП (0,6 мг в 1 мл) инкубировали в присутствии 3 мМ ЭДТА при 100° в течение 3 мин. В этих условиях нековалентно связанный флавин отделяется от белковой части молекулы [18, 19]. После инкубации смесь, содержащую апобелок и флавиновый компонент, подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-25 и собирали желтую фракцию, соответствующую флавину. Концентрацию флавина определяли, исходя из величины коэффициента молярной экстинкции полосы при 450 нм ($E_{450} = 11,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$). ТСХ проводили в системе бутанол-уксусная кислота—H₂O (12:3:5) [19] на силифоловых пластинках с силикагелем типа «Silpearl». В обоих методах в качестве стандартов были использованы ФАД и ФМН.

При подготовке к амниокислотному анализу препараты ФП (0,5 мг) подвергали гидролизу 6 М HCl под азотом в вакуумных гидролизных ампулах в течение 24, 48 и 72 ч при 110°. После лиофилизации гидролизаты растворяли в 0,2 М Na-цитратном буфере, pH 2,2. Содержание триптофана и SH-групп определяли ранее описанными методами [20, 21].

Получение экстрактов для выявления наличия фосфо-, глико- и нейтральных липидов в препаратах ФП (0,9 мг) проводили по методу Bligh и Dyer [22]. Идентификацию качественного состава экстрактов осуществляли ТСХ на пластинках с силикагелем типа Н (10—40 мкм), используя для разделения следующие системы растворителей: хлороформ-уксусная кислота-вода (25:15:4:2)—для ФЛ, петroleйный

эфир-диэтиловый эфир-муравьиная кислота (60:40:2) — для нейтральных липидов и хлороформ-метанол-2,5 М аммиак (60:5:8) для ганглиозидов. Пластинки окрашивали в парах йода.

Оптические измерения проводили на спектрофотометре «Specord М-40» и флуорометре «МР-44А» («Perkin-Elmer», Швеция) аминокислотный анализ проводили на приборе «Т-339» («Microtechna», Чехословакия). Электронно-микроскопический анализ проводили на приборе «Тесла Б-413 А» (Чехословакия).

Результаты исследования

В табл. 1 представлены основные этапы очистки ФП. Надосадочный раствор, полученный после лизиса ХГ, диализовали 48 ч против 20 л 1,5 мМ K^+ , Na^+ -фосфатного буфера, содержащего 1%-ный NaCl, с 2-разовой сменой буфера через 24 ч, затем против 20 л 1,5 мМ буфера, 24 ч. После диализа раствор хроматографировали на колонке с ДЭАЭ-ц (2,5×2,6 см), уравновешенной буфером. Через колонку пропускали в среднем по 600 мл раствора (1,48 мг бел-

Таблица 1

Процедура очистки флавопротеида

Стадия	Объем, мл	Концентрация белка, (мг/мл)	A 445/280
Надосадочный раствор, полученный после центрифугирования лизата ХГ	1800	1,5	
Хроматография на ДЭАЭ-ц	330	0,8	0,05
Гель-фильтрация на сефадексе G-50	20	22,0	0,37
Гель-фильтрация на сефадексе G-100	10	0,77	0,62

Примечание. *—объем, полученный после концентрирования фракции.

ка в 1 мл), промывали ее порциями (по 200 мл) 10, 20, 30, 40, 50, 60 мМ NaCl в буфере и желтую фракцию, содержащую ФП, элюировали 100 мМ NaCl в буфере. Элюат подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-50, уравновешенным 200 мМ NaCl в буфере. Фракцию, выходящую в свободном объеме, подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-100, уравновешенным 200 мМ NaCl в буфере. Повторная гель-фильтрация полученной фракции, содержащей ФП, на колонке с сефадексом G-100 приводила к элюции ФП в виде одиночного пика (рис. 1): полученная фракция обнаруживала одну полосу при ЭФ в 7,5%-ном ПААГ (рис. 1). Выход ФП составлял 23 мг из 150 г пасты ХГ. В табл. 2 представлен аминокислотный состав полученного препарата ФП, в табл. 4—основные физико-химические свойства ФП в сравнении со свойствами ряда электронных переносчиков флавопротеидной природы. Согласно полученным данным, обнаруженный нами ФП представляет собой гликопротеид. Качественный анализ липидов в экстрактах ФП показал от-

существование в молекуле белка ФЛ, нейтральных липидов и ганглиозидов. Величина M_r ФП по данным гель-фильтрации, составляет 123 кД. При ЭФ в ПААГ в присутствии 0,1%-ного ДДС-Na препараты ФП, обработанные 2%-ным ДДС-Na, мигрируют в виде двух полос, подвижность которых соответствует M_r 53 и 87 кД (рис. 2). Таким образом, в состав молекулы белка входят две нековалентносвязанные

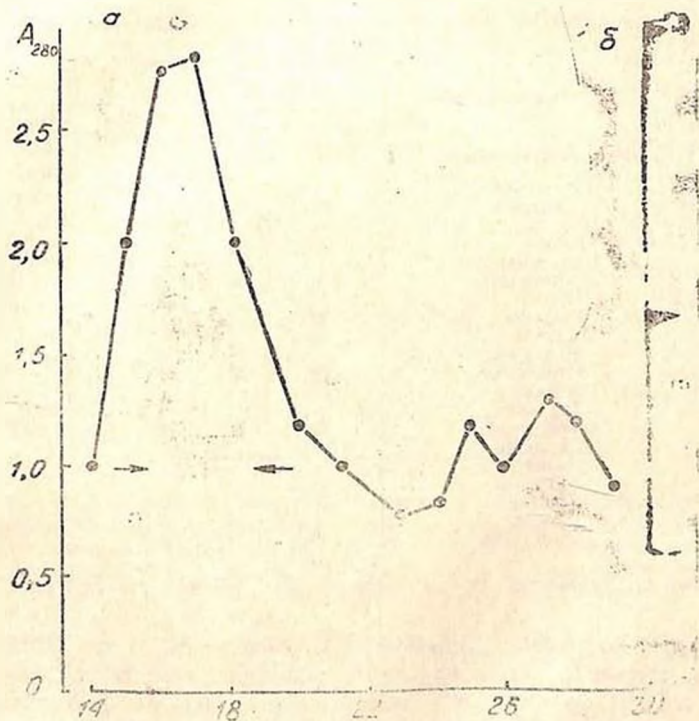


Рис. 1. а. Диаграмма элюции флавопротеинов (ФП) на колонке с сефадексом G-100. Размеры колонки—2,3×48 см, нулевой объем—84 мл. Элюцию проводили 200 мл NaCl в 10 мМ K⁺, Na⁺-фосфатном буфере, pH 6,6. Объем каждой фракции составляет 5 мл. По оси абсцисс указаны номера фракций. б. Электрофореграмма нативного ФП. Гель окрашен Кумаси синим

субъединицы. Величина M_r ФП, определенная при суммировании молекулярных масс субъединиц, составляет 140 кД. При ЭФ препаратов ФП, обработанных 2%-ным ДДС-Na и 5%-ным β-меркаптоэтанолом, подвижность более высокомолекулярной субъединицы возрастает, принимая значение 76 кД (рис. 2). По-видимому, данная субъединица включает в свой состав небольшой полипептидный фрагмент, связанный с остальной частью молекулы дисульфидным

мостиком, который невозможно идентифицировать при окраске гелей. Величина M_r ФП, определенная на основании аминокислотного анализа (табл. 2) с учетом наличия двух молекул ФАД на молекулу белка (см. далее), составляет 115 кД. Согласно данным аминокислотного анализа, 27% молекулы белка составляют кислые аминокислоты; 35% — гидрофобные.

Таблица 2

Аминокислотный состав флавопротеида из хромаффинных гранул

Аминокислота	Количество остатков на молекулу	
	экспериментальное значение	интегральное значение
Аспарагиновая кислота	92,8	93
Треонин	44,2	44
Серин	32,0	32
Глутаминовая кислота	118,2	118
Пролин	31,0	31
Глицин	48,2	48
Аланин	61,2	61
Метионин	0	0
Изолейцин	18,0	18
Лейцин	78,4	78
Тирозин	0,3	0
Фенилаланин	32,8	33
Гистидин	28,2	28
Лизин	98,6	99
Аргинин	32,2	32
Валин	49,8	50
Цистин	2,5	3
Триптофан	39,0	39

Примечание. Приведенные значения соответствуют данным 72 ч гидролиза.

Гель-фильтрация препаратов ФП, обработанных 3 мМ ЭДТА при 100° в течение 3 мин, приводила к отделению характерной для флавина желтой фракции от белковой части молекулы. ТСХ показала, что эта фракция представляет собой ФАД. Эти данные подтвердились при сравнении спектров оптического поглощения полученной фракции в УФ и видимой области со спектрами стандартных растворов ФАД и ФМН. Содержание ФАД в препаратах ФП, рассчитанное с учетом концентрации белка (использованного для денатурации) и ФАД (отделенного от белка), составляло 2 молекулы на одну молекулу ФП. Концентрацию ФАД рассчитывали на основе значения оптической плотности и коэффициента молярной экстинкции полосы при 450 нм. Аналогичные данные получены при использовании метода флуоресцентного анализа, позволяющего осуществлять как качественную, так и количественную идентификацию нековалентно-связанного с белком флавина.

Основные максимумы поглощения полученного препарата ФП (рис. 3, а) в видимой области оптического спектра приходятся на 360

и 445 нм, обнаруживается плечо при 410 нм, препараты имеют желтую окраску. Добавление к ФП метиленового синего не приводило к возрастанию интенсивности отмеченных полос, что свидетельствует о его полностью окисленном состоянии. В табл. 3 представлены данные, полученные при изучении донорно-акцепторных специфичностей ФП. Как следует из представленных данных, в числе неприродных восстановителей и окислителей эффективными оказались дитионит и

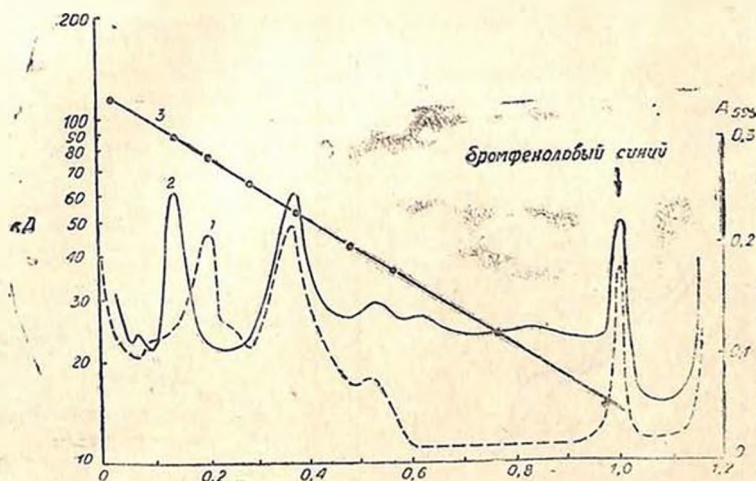


Рис. 2 Денситограммы гелей, полученных при электрофорезе флавопротеидов (ФП) в 7,5%-ном ПААГ с 0,1%-ным ДДС-Na (1, 2) и стандартная кривая для определения M_r ФП, построенная с использованием белков-маркеров (3). Препараты ФП обрабатывали 2%-ным ДДС-Na (2) и 2%-ным ДДС-Na с 5%-ным β -меркаптоэтанолом (1); препараты белков-маркеров—2%-ным ДДС-Na с 5%-ным β -меркаптоэтанолом. Справа налево: лактальбумин, трипсиноген, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, овальбумин, ФП (53 кД), БСА, ФП (76 кД), ФП (87 кД), β -галактозидаза. Гели окрашивали Кумасси синим. По оси абсцисс—относительная подвижность, по оси ординат—величина M_r в кД (3)

метиленовый синий, соответственно; восстановленный препарат ФП бесцветен. Многократное чередование стадий окисления и восстановления не приводило к инактивации ФП. ФП окислялся молекулярным кислородом: инкубация восстановленного белка в течение 24 ч при комнатной температуре приводила к его полному окислению. В числе природных окислителей нами был идентифицирован цитохром b_{561} из мембран ХГ (рис. 3, б).

Обсуждение результатов

Из представленных в табл. 4 данных следует, что обнаруженный нами в ХГ ФП по своим физико-химическим свойствам не соответствует ни NADH: (акцептор) редуктазе ХГ, ни переносчикам электронов флавопротеидной природы микросом и митохондрий. Послед-

ний факт свидетельствует о том, что наличие ФП не является следствием загрязнения препаратов ХГ другими органеллами. Об этом же свидетельствуют тесты на чистоту ХГ: электронно-микроскопический анализ не обнаруживает в препаратах ХГ лизосом или митохондрий; активность маркерного фермента мембран митохондрий—цитохром-оксидазы составляет 5% от исходной его активности в гомогенатах мозгового слоя надпочечников. Кроме того, выход ФП (23 мг из 150 г ХГ; 0,02% от общего веса ХГ) достаточно высокий, для того

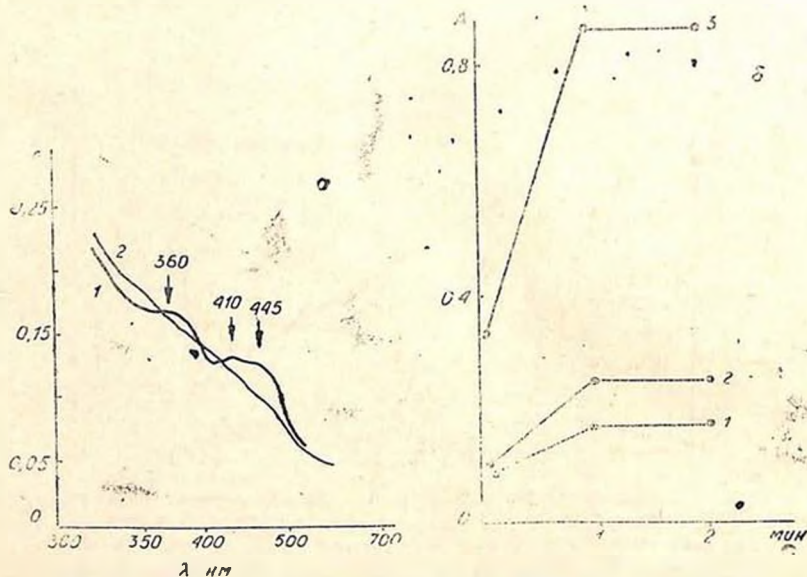


Рис. 3, а. Оптические спектры флавопротеида (ФП) в видимой области. 1—спектр исходного препарата, 2—спектр препарата, восстановленного дитионитом. Концентрация ФП составляла 3,9 мг в мл. Спектр регистрировали в 10 мМ K^+ , Na^+ -фосфатном буфере, pH 6,6. б. Кинетика восстановления цитохрома b_{561} (1, 3) и окисления ФП (2). Концентрация цитохрома b_{561} составляла 1,3 и 6 мг/мл (2); концентрация ФП—1,9 (1, 3) и 3,9 (2). При регистрации кинетик в области 561 (1) и 427 нм (3) нулевой фон (контрольный кювета) устанавливали по ФП; в области 445 нм (2)—по цитохрому b_{561} . Кинетики регистрировали в 10 мМ K^+ , Na^+ -фосфатном буфере, pH 7,5

чтобы предположить, что наличие этого белка в ХГ является следствием присутствия в их препаратах других органелл. Так, для сравнения, выход ДБМ (мембранной и растворимой форм вместе взятых) из 1 кг мозгового слоя надпочечников (приблизительно 100 г ХГ) составляет 60 мг—0,06% от общего веса ХГ, а этот белок является основным компонентом мембранных белков ХГ [23].

Выделенный нами из ХГ белок имеет характерный для ФП спектр оптического поглощения в видимой области (рис. 3, а), и, как показано двумя независимыми методами, содержит 2 молекулы ФАД на

одну молекулу белка с M_r 123—140 кД. Спектр ФП, представленный на рис. 3, а, состоит из трех полос, что типично для ряда ФП. Предполагают, что в подобных случаях для флавина характерно гидрофобное окружение с незначительным количеством водородных мостиков [24]. Нельзя также исключить возможность наличия в препаратах обнаруженного нами ФП двух типов ФАД, различающихся по своему микроокружению. Кроме того, известно, что присутствие, помимо ФАД, его модифицированных форм (6-ОН-ФАД; 8-ОН-ФАД) может приводить к появлению дополнительного максимума в видимой об-

Таблица 3

Воздействие окислителей и восстановителей
на флавопротеиды из хромаффинных гранул

Окислитель	Эффект	Восстановитель	Эффект
Феррицианид	—	Ферроцианид	—
Метил-новый синий	+	Дитионит	+
Кислый медьсодержащий белок (КМБ), окисленная форма	—	КМБ, восстановленная форма	—
Дофамин- β -монооксигеназа (ДБМ), окисленная форма	—	Цитохром b_{561} , восстановленная форма	—
Цитохром b_{561} , окисленная форма	—	Цитохром c_1 , восстановленная форма	—
Цитохром c_1 , окисленная форма	+		—
Цитохром c_1 , окисленная форма	—	Адреналин	—
Молекулярный кислород	+	Дофамин	—
		Норадреналин	—
		НАОН, НАОНН	—
		Аскорбат	—
		Глутатион	—
		ДБМ, восстановленная форма	—

Примечание. Восстановление препаратов КМБ, ДБМ и цитохромов b_{561} и c_1 проводили аскорбатом и дитионитом, соответственно, окисление—феррицианидом. Условия окисления и восстановления описаны в «Материалах и методах».

ласти оптического спектра [25]. Данные по определению M_r ФП двумя независимыми методами (ЭФ в присутствии ДДС-Na, гель-фильтрация) находятся в хорошем соответствии. Более низкое значение величины M_r , рассчитанное исходя из аминокислотного анализа, по сравнению с данными, полученными с помощью вышеотмеченных методов, можно объяснить наличием в молекуле белка углеводов.

Как уже было отмечено, в предыдущих исследованиях нами была показана возможность переноса электронов от цитохрома b_{561} к ДБМ через КМБ [7]. С другой стороны, в настоящем исследовании установлено, что ФП *in vitro* может выполнять роль донора электронов цитохрома b_{561} (рис. 3, б). Таким образом, основываясь на ранее полученных данных и результатах, представленных в настоящей работе, можно с достаточной степенью вероятности предположить, что обнаруженный нами ФП и другие вышеотмеченные переносчики электронов мембран ХГ являются компонентами единой цепи переноса электронов, функционируя в следующей последовательности:

—ФП—цитохром b_{561} —мКМБ—мДБМ.

Поиски природного восстановителя ФП среди компонентов ХГ

Таблица 4

Сравнение основных физико-химических параметров ряда электронных переносчиков
флавопротендной природы

	Флавопротенды из хромофитных гранул (ХГ)	NADH-редуктаза мембран ХГ	NADH-дегидроге- наза митохондрий	NADPH цито- хром P ₄₅₀ редук- таза микросом	NADH: цитохром в ₃ редуктаза ми- кросом
M _r (кД)	123—130	105.0	75.0	79.0	43.0
Число субъединиц	2	2	1	1	1
M _r субъединиц, кД	67,6; 63,0	55.0	70.0	78.0	43,0
Простетическая группа	2 ФАД	не установлено	1 ФН	1 ФАД 1 ФМН	1 ФАД
Наличие углеводов	+	не установлено	не установлено	+	—
Основные максимумы опти- ческого поглощения в видимой области спектра (окисленная форма), нм	360, 445, 410	не идентифици- рованы	370, 450	340, 450, 476	390, 461, 490
Природные доноры элект- ронов	не установлены	NADH	NADH	NADPH	NADH
Природные акцепторы электронов	цитохром b ₅₅₈	не установлены	Fe S белок	цитохром P ₄₅₀	цитохром в ₃
Связь с мембраной	не установлена	интегральная трансмембранная	интегральная	интегральная	интегральная
Литература	настоящая работа	15	16	27	23

(табл. 3), а также ряда других природных соединений не увенчались успехом. В отличие от большинства электронных переносчиков флавопротеидной природы, ФП не оказался способным к окислению NADH и NADPH. Таким образом, остаются открытыми вопросы о природе начального донора цепи переноса электронов мембран ХГ и ее биологической роли.

THE PURIFICATION OF A NEW FLAVOPROTEIN FROM CHROMAFFIN GRANULES AND INVESTIGATION OF ITS PROPERTIES

PETROSIAN S. A., BOYAJIAN A. S., KARAGEOSIAN K. G., AVAKIAN S. A.,
AERAMOV R. E.

Institute of Experimental Biology of Academy of Science of Armenia

The discovery of electron carrier of flavoprotein nature in chromaffin is reported. The purification procedure presented allows to isolated this protein in electrophoretically homogeneous form. The main physicochemical properties of the flavoprotein have been determined. The interaction of flavoprotein with a number of oxidants and reducers has been investigated. The flavoprotein has been shown to reveals in vitro an ability to transfer electrons from the membranes of chromaffin granules to cytochrome b_{561} .

ЛИТЕРАТУРА

1. Winkler H., Westead E. Neuroscience, v. 5, № 11, p. 1809-1823, 1986.
2. Winkler H., Apps D. K., Fisher-Gotlib R. Neuroscience, v. 18, № 2, p. 261-290, 1986.
3. Mikaelyan M. V., Grigoryan N. F., Na'bandyan R. M. 12th International Congress of Biochemistry, Perth, Australia, 15-21 August, p. 326, 1982.
4. Wakefield L. M., Cass A. E. G., Radda G. K. J. Biol. Chem., v. 26, № 21, p. 9746-9752, 1986.
5. Kent U. M., Fleming P. J. J. Biol. Chem., v. 262, № 17, p. 8174-8178, 1987.
6. Petrosyan S. A., Hovanesyan L. L., Boyajyan A. S., Karageuzyan K. G. 8th general meeting "European Society for neurochemistry", Leipzig, GDR, 23-28, July, p. 98, 1990.
7. Оганесян Л. Л., Бояджян А. С., Петросян С. А., Карагеузян К. Г. Молекуляр. биол., т. 25, № 1, с. 99-104, 1991.
8. Hoffman P. G., Zinder O., Bonner W. M., Pollard H. B. Arch. Biochem. and Biophys., v. 176, № 1, p. 375-388, 1976.
9. Smith L. Methods in Enzymology, v. 2, p. 732, 1955.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 265-275, 1951.
11. Петросян С. А., Оганесян Л. Л., Арутюнян М. Г., Бояджян А. С., Карагеузян К. Г. Тезисы III республиканской конф. «Достижения физико-химической биологии и биотехнологии и пути их внедрения» РА, Ереван, 16-17 октября, с. 69, 1989.
12. Бояджян А. С., Набандян Р. М., Буянтян Г. Х. Биохимия, т. 46, № 4, с. 635-640, 1981.
13. Zacharius R., Zell T. Anal. Biochem., v. 30, № 1, p. 148-152, 1969.
14. Terland O., Flatmark T. Biochim. et biophys. acta, v. 305, № 2, p. 206-218, 1973.

15. Andrews P. *Biochem. J.*, v. 51, № 2, p. 222—233, 1964.
16. Weber K., Osborn M. *J. Biol. Chem.*, v. 244, № 16, p. 4406—4412, 1969.
17. Davis B. J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 121, № 3, p. 404—42, 1964.
18. Facker E. J., Siegal I. M. *Anal. Biochem.*, v. 53, № 1, p. 332—336, 1973.
19. Gomes B., Fendrich G., Abeles R. H. *Biochemistry*, v. 20, № 5, p. 1431—1490, 1981.
20. Edelhoch H. *Biochemistry*, v. 6, № 7, p. 1918—1914, 1967.
21. Habeeb A. F. S. *Anal. Biochem.*, v. 56, № 1, p. 60—65, 1973.
22. Bligh E. G., Dyer W. J. *Can. J. Biochem. Physiol.*, v. 37, № 8, p. 911—97, 1959.
23. Ljones T., Skotland T., Flatmark T. *Eur. J. Biochem.*, v. 61, № 2, p. 525—533, 1976.
24. Lederer F. *Eur. J. Biochem.*, v. 88, № 2, p. 425—477, 1978.
25. Ghisla S., Mayhew S. G. *J. Biol. Chem.*, v. 248, № 25, p. 6548—6550, 1973.
26. Zaremba S., Hogue-Angelletti R. *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 219, № 2, p. 297—305, 1982.
27. De Pierre J. W., Ernster L. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 46, № 1, p. 241—262, 1977.
28. French J. S., Guengerich F. P. *J. Biol. Chem.*, v. 255, № 9, p. 4112—4119, 1980.
29. Mihara K., Sato R. *J. Biochem.*, v. 78, № 5, p. 1057—1073, 1975.

Поступила 25. VII 1991

С 6 по 9 марта 1994 г. в Цюрихе состоится III Европейский симпозиум по кальций-связывающим белкам в нормальных и трансформированных клетках ("Third European Symposium on Calcium Binding Proteins in Normal and Transformed Cells", Zurich, Switzerland, March 6—9, 1994).

Желающим принять участие в работе симпозиума обращаться по адресу:

Symposium Secretariat
Dr. C. W. Heizmann
University Children's Hospital
Div. of Clinical Chemistry
Steinwiesstrasse 75
CH—8032 Zurich
Switzerland