
МЕЖДУНАРОДНАЯ АССОЦИАЦИЯ АКАДЕМИЙ НАУК (МААН)
СОЮЗ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЩЕСТВ СТРАН СНГ
ФЕДЕРАЦИЯ ЕВРОПЕЙСКИХ БИОХИМИЧЕСКИХ ОБЩЕСТВ (FEBS)
РОССИЙСКОЕ ОБЩЕСТВО БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
РОССИЙСКИЙ ФОНД ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
РОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ФОНД
РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ
ИНСТИТУТ ИММУНОФИЗИОЛОГИИ

НАУЧНЫЕ ТРУДЫ

V СЪЕЗД ФИЗИОЛОГОВ СНГ ♦ V СЪЕЗД БИОХИМИКОВ РОССИИ ♦ КОНФЕРЕНЦИЯ ADFLIM

Под редакцией

А.И. Григорьева, Ю.В. Наточина, Р.И. Сепиашвили

А.Г. Габибова, В.Т. Иванова, А.П. Савицкого

Сочи – Дагомыс, Россия
4–8 октября 2016

УДК 612(06)
ББК 28.707.3
НЗ4



НАУЧНЫЕ ТРУДЫ V Съезда физиологов СНГ V Съезда биохимиков России Конференции ADFLIM

*Под редакцией
А.И. Григорьева, Ю.В. Наточина, Р.И. Сепиашвили,
А.Г. Габиева, В.Т. Иванова, А.П. Савицкого*

Содержание

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

Химия и биология нуклеиновых кислот	3
Белки: разнообразие функций	30
Омиксные технологии	110
Биохимия и молекулярная медицина	129
Биоинженерия: фундаментальные основы и приложения	197
Общая биохимия	см. т. 1

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

245

Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM. — АСТА NATURAE | СПЕЦВЫПУСК Том 2 — Под ред. А.И. Григорьева, Ю.В. Наточина, Р.И. Сепиашвили, А.Г. Габиева, В.Т. Иванова, А.П. Савицкого — 2016. — 253 с.— ISBN 978-5-9902238-4-4.

Сборник научных трудов включает материалы актов и пленарных лекций, симпозиальных докладов, выступлений на заседаниях круглых столов и стендовых докладов, представленных на V Съезде физиологов СНГ, V Съезде биохимиков России и Конференции ADFLIM, состоявшихся в рамках единого научного форума в Сочи–Дагомысе, 4–9 октября 2016 года.

Книга рассчитана не только на специалистов, работающих в разных областях биомедицинских наук, но и на студентов, аспирантов, преподавателей и научных работников, интересующихся проблемами наук о жизни.

ISBN 978-5-9902238-4-4

ББК 28.0707.3

© Союз физиологических обществ стран СНГ, 2016

© Российское общество биохимиков и молекулярных биологов

ХИМИЯ И БИОЛОГИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

МЕХАНИЗМЫ УКЛАДКИ ХРОМАТИНОВОЙ ФИБРИЛЛЫ В ТОПОЛОГИЧЕСКИ-АССОЦИИРОВАННЫЕ ДОМЕНЫ

С.В. Ульянов^{1,2}, Е.К. Храмева^{3,4}, А.А. Гаврилов¹, И.М. Флямер^{1,2}, П. Кос², Е.А. Михалева⁵, А.А. Пенин^{2,3}, М.Д. Логачева^{2,3}, М.В. Имакаев⁶, А. Чертович², М.С. Гельфанд^{2,3}, Ю.Я. Шевелев⁵, С.В. Разин^{1,2} ¹Институт биологии гена РАН, Москва, Россия; ²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; ³Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва, Россия; ⁴Сколковский институт науки и технологий (СИНТ) (Сколтех), Сколково, Россия; ⁵Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия; ⁶Массачусетский технологический институт, Кембридж, США

Ранее рядом авторов было продемонстрировано, что интерфазные хромосомы млекопитающих и дрозофилы разделены на топологически-ассоциированные домены, в рамках которых предпочтительно реализуются пространственные контакты между удаленными геномными элементами. Механизмы формирования топологически-ассоциированных оставались неизвестными. В нашей работе были построены карты разделения хромосом на топологически-ассоциированные домены в 4 линиях культивируемых клеток Дрозофилы. Сравнение карт друг с другом и с профилями распределения эпигенетических модификаций хроматина и ассоциированных с хроматином белков позволило сделать ряд важных заключений: 1. Продemonстрировано, что консервативность разделения хромосом на ТАДы не является абсолютной (при попарном сравнении линий лишь 67% ТАДов было локализовано в одних и тех же позициях, и лишь 47% ТАДов имели общие позиции во всех клеточных линиях). 2. Секвенирование и анализ транскриптомов изучаемых клеточных линий продемонстрировали, что активные гены сосредоточены преимущественно в пограничных участках ТАДов (интер-ТАДах). При сравнении клеточных линий было отмечено, что возникновение новых границ ТАДов часто коррелирует с активацией транскрипции в соответствующем участке хромосомы. 3. Продemonстрировано, что характерной особенностью интер-ТАДов является присутствие модификаций гистонов, типичных для транскрипционно активного хроматина, и белков, участвующих в транскрипции и ремоделировании хроматина. 4. Выявлено соответствие интер-ТАДов меж-дискам политемных хромосом. На основании всей совокупности полученных результатов сформулирована модель, согласно которой ТАДы являются преимущественно неактивными сегментами хромосомы, которые собираются спонтанно благодаря взаимодействиям нуклеосомных частиц. Эти взаимодействия утрачиваются в активном хроматине в связи с высоким уровнем ацетилирования гистонов. Соответственно, активный хроматин физически не может быть организован в ТАДы. Правильность данной модели подтверждена с помощью компьютерного моделирования. Работа выполнена при поддержке грантов РНФ 14-14-01088 и 14-24-00022.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ РЕПЛИКАЦИИ В ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ

А.А. Гаврилов¹, А.В. Артемов², О.Л. Кантидзе¹, М.С. Гельфанд³, С.В. Разин¹ ¹Институт биологии гена РАН; ²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова; ³Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва, Россия

С использованием метода фиксации конформации хромосомы изучена пространственная организация участков начала репликации ДНК в культивируемых клетках млекопитающих. Показано, что участки начала репликации характеризуются повышенной частотой взаимодействия друг с другом в ядерном пространстве. Области преимущественных контактов коррелируют с временными зонами репликации, плотностью генов и метками активного/репрессивного хроматина. Объединение нескольких участков начала репликации в единый функциональный комплекс («репликационную фабрику») может обеспечивать координацию работы репликационного аппарата и облегчать доставку факторов репликации. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-14-01088).

РОЛЬ ГИСТОНА H2AX В КЛЕТОЧНОМ ОТВЕТЕ НА СТРЕСС

А.К. Величко, С.В. Разин, О. Л. Кантидзе Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

Гистон H2AX является одной из первых обнаруженных вариантных форм гистонов. На протяжении долгого времени считалось, что фосфорилированная форма гистона, названная γ H2AX, участвует в регуляции процессов репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Фосфорилирование происходит при возникновении в клетке двуцепочечных разрывов ДНК непосредственно в участке повреждения. С момента открытия этой модификации, непрямая иммунофлуоресценция с помощью антител к γ H2AX стала наиболее удобной техникой детекции двуцепочечных разрывов ДНК в клетке. Образование хорошо различимых фокусов обусловлено тем, что в месте разрыва фосфорилируется не одна молекула H2AX, а множество (вплоть до нескольких тысяч), таким образом, фосфорилирование распространяется на сотни т.п.н. от разрыва. Однако в последнее время появляется все больше данных о том, что масштабное фосфорилирование H2AX может происходить в клетке и без возникновения двуцепочечных разрывов ДНК. Так, независимое от повреждения ДНК фосфорилирование H2AX может происходить на начальных стадиях митоза, в эмбриональных стволовых клетках, на определенных стадиях раннего эмбрионального развития, при механическом стрессе и т. д. Во всех этих случаях совершенно не ясна необходимость и роль образования доменов γ H2AX. Целью этой работы было исследование функциональной роли фосфорилирования H2AX. Мы использовали две основных модели индукции γ H2AX, не связанной с повреждением ДНК – тепловой стресс клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла, и механический клеточный стресс, который заключается в кратковременной инкубации клеток в гипотоническом растворе. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что фосфорилирование H2AX необходимо для восстановления структуры и эпигенетического статуса хроматина после возвращения клеток в нормальные условия.

ИССЛЕДОВАНИЕ Su(Hw)-ЗАВИСИМОЙ РЕПРЕССИИ У ПЛОДОВОЙ МУШКИ DROSOPHILA MELANOGASTER

А.К. Головин, Л.С. Мельникова, М.В. Костюченко, В.В. Молодина Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

Экспрессия эукариотических генов контролируется различными регуляторными элементами, в том числе инсуляторами. В определенных тканях инсуляторы могут выступать в роли репрессоров, подавляющих экспрессию неспецифических генов. Это свойство инсуляторов изучено мало, однако его значение в регуляции экспрессии генов очевидно. Один из наиболее

изученных инсуляторов *Drosophila*, Su(Hw), включает 12 сайтов связывания белка Su(Hw). В работе Su(Hw)-инсуляторов участвуют ещё 3 белка, привлекаемые на хроматин через взаимодействие с Su(Hw) – Mod(mdg4)-67.2, CP190 и E(y)2/Sus1. Основные цели проекта – исследование механизма, обеспечивающего инсулятор-зависимую репрессию генов и идентификация новых белков, поддерживающих репрессию в разных тканях. В ходе работы было показано, что в Su(Hw)-зависимой репрессии участвуют белки EAST и HP1. Ранее мы доказали, что белок EAST напрямую взаимодействует с Su(Hw)-зависимым комплексом и участвует в репрессии. Мы выявили, что с EAST потенциально способны взаимодействовать белки Bonus и ADD1. С помощью дрожжевой двугибридной системы и коиммунопреципитации белков из лизата культуры клеток S2 определены домены данных белков, ответственные за их взаимодействия друг с другом или с белками CP190, Su(Hw), Mod(mdg4), EAST. Мы обнаружили, что малоизученный белок HIPPI тоже способен взаимодействовать с основными белками Su(Hw)-инсулятора. С помощью X-ChIP-анализа был протестирован состав инсуляторных комплексов на различных сайтах генома. Влияние изучаемых белков на Su(Hw)-зависимую репрессию тестировалось генетическими методами. Мутации в генах, кодирующих найденные белки, приводили либо к частичной потере репрессии (EAST и HP1), либо к полной потере репрессии и восстановлению инсуляции (bonus и ADD1). Совокупность полученных данных позволяет предположить, что сайты связывания Su(Hw)-зависимых комплексов являются «платформой» на которую рекрутируются как белки-активаторы, так и белки-репрессоры. В зависимости от ткани и стадии развития активность Su(Hw)-инсулятора и его роль в регуляции транскрипции могут изменяться. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ – проект № 14-04-00266-а.*

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ БЕЛКА CP60 В ГЕНОМЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Л.С. Мельникова, М.В. Костюченко, В.В. Молодина, Т.А. Ивлиева *Институт биологии гена РАН, Москва, Россия*

Известно, что белок CP60 находится в общем комплексе с белком CP190, компонентом инсулятора Su(Hw). Нами получено большое количество совершенно новых данных, доказывающих взаимодействие белка CP60 с формируемыми на Su(Hw)-зависимых сайтах белковыми комплексами. Представленная работа направлена на детальное описание механизма взаимодействия между белком CP60 и основными инсуляторными белками и выявление функциональной роли такого взаимодействия в эукариотическом геноме. С помощью дрожжевой двугибридной системы мы показали, что белок CP60 напрямую взаимодействует с белком CP190, но не взаимодействует с другими известными компонентами инсулятора Su(Hw): белками Su(Hw) и Mod(mdg4)-67.2. С помощью экспериментов по коиммунопреципитации белка CP60 с другими компонентами инсуляторного комплекса мы доказали, что белки CP60, Mod(mdg4)-67.2 и Su(Hw) входят в состав общего комплекса. Также, было исследовано распределение CP60 в эмбриональных клетках и в клетках имагинальных дисков личинок дрозофилы. Выяснилось, что в ядре клетки CP60 в значительной степени, но не полностью, колокализуется с инсуляторными тельцами, формируемыми белками Su(Hw)-инсулятора. С помощью метода X-ChIP протестировано присутствие белка CP60 на Su(Hw)-зависимых сайтах. Показано, что белок CP60 присутствует на сайтах эндогенных инсуляторов, однако он не способен связываться с хроматином в отсутствие белка CP190. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что именно белок CP190 обеспечивает связь белка CP60 с инсуляторным комплексом. Взаимодействие белка CP60 с Su(Hw)-зависимым инсуляторным комплексом также было подтверждено при окрашивании политенных хромосом из клеток слюнных желез личинок дрозофилы. С помощью метода задержки в геле комплекса ДНК-белок установлено, что белок CP60 способен непосредственно связываться с ДНК. Кроме того, мы провели полногеномное секвенирование сайтов связывания CP60. Полученные результаты свидетельствуют, что белок CP60 взаимодействует не только с Su(Hw)-зависимыми инсуляторами. Анализируя совокупность полученных данных, мы впервые можем утверждать, что белок CP60 способен входить в состав Su(Hw)-инсулятора и, возможно, обеспечивать его взаимодействие с другими регуляторными комплексами. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ – проект № 16-04-00580.*

МОЛЕКУЛЯРНОЕ РЕЙДЕРСТВО: КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ ТЕПЛОВОГО ШОКА ЗАХВАТИЛ СИСТЕМУ РЕГУЛЯЦИИ ЦИКЛА ВЫСУШИВАНИЕ-РАЗМАЧИВАНИЕ У ЛИЧИНКИ КОМАРА *POLYPEDILUM VANDERPLANKI*

П. Мазин^{1,2}, Е. Шагимарданова³, А. Черкасов³, Р. Сутормин⁴, В. Степанова^{1,2}, А. Ступников⁵, М. Логачева^{2,3}, А. Пеннин^{2,3}, Richard Cornette⁶, Takahiro Kikawada⁶, О. Гусев^{3,7}, М. Гельфанд^{1,2,8,9}

¹СколТех; ²ИППИ РАН; ³ИФМБ КФУ; ⁴LBNL, США; ⁵Королевский университет Белфаста; ⁶Национальный институт агробиологических наук, Тцукуба; ⁷RIKEN, Йокогама; ⁸ФКН НИУ ВШЭ, ⁹ФББ МГУ

Polypedilum vanderplanki – уникальный пример насекомого, которое в качестве естественного компонента жизненного цикла переживает практически полное высыхание на стадии личинки. Анализ транскриптомов *P. vanderplanki* и родственного, не выживающего при засыхании вида *P. nubifer* на различных стадиях цикла высыхания-размачивания позволило описать множество генов с дифференциально экспрессией и сплайсингом. Анализ промоторных областей генов, активирующихся при засыхании, выявил мотив TCTAGAA, похожий на известный мотив связывания транскрипционного активатора теплового шока (Hsf) *Drosophila melanogaster*. Сайты TCTAGAA значимо часто встречаются в промоторах генов, индуцируемых высыханием, таких как LEA, тиоредоксины, гены метаболизма тегалозы, причем это наблюдается у *P. vanderplanki*, но не *P. nubifer*. Более того, парные сайты TCTAGAA имеются в промоторной области самого гена Hsf, что, видимо, объясняет его активацию при высыхании за счет формирования положительной обратной связи. Таким образом, транскрипция генов системы выживания при высыхании у *P. vanderplanki* в значительной степени регулируется фактором, которых у других насекомых отвечает за реакцию на тепловой шок, и это является эволюционно молодым механизмом.

РЕГУЛЯЦИЯ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР БЕЛКОМ RIF1 ДРОЖЖЕЙ *HANSENULA POLYMORPHA*

А.Н. Малякко, О.А. Петрова, В.И. Польшаков, М.Э. Зверева, О.А. Донцова

Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Теломеры (концевые участки хромосом) играют важнейшую роль в поддержании стабильности генома, защищая хромосомы от деградации и слияния. Также эти структуры являются ключевой детерминантой, определяющей количество делений, на которое способна клетка. Теломерная ДНК состоит из коротких повторяющихся участков, синтезируемых особым ферментом теломеразой. Поддержание длины теломер за счёт теломеразы является основным механизмом обеспечения не-

ограниченного пролиферативного потенциала половым, стволовым и раковым клеткам, а также одноклеточным эукариотам. Контроль работы теломеразы – сложный многофакторный процесс, изучение которого осложняется значительными отличиями между аспектами функционирования теломеразы у различных организмов. С другой стороны, сравнительный анализ может выявить консервативные и видоспецифические принципы, поэтому исследование регуляции длины теломер у разных видов представляет собой особый интерес. Мы используем в качестве модельного организма для изучения теломер термотолерантные дрожжи *Hansenula polymorpha*. В *H. polymorpha* было обнаружено необычное свойство матричного участка теломеразной РНК, которое приводит к ограничению синтеза теломерной ДНК, что говорит об особенностях системы поддержания длины теломер этого организма. Мы проанализировали влияние на длину теломер *H. polymorpha* белков гомологичных известным регуляторам теломеразы классического модельного организма – дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Сравнению механизмов контроля работы теломеразы в этих двух видах дрожжей, а в частности, обсуждению механизма регуляции длины теломер посредством белка Rif1 и будет посвящён данный доклад.

Полногеномный анализ белка CG9890, содержащего домены цинковых пальцев, в геноме *D. melanogaster*

А.Н. Краснов, Н.А. Фурсова, М.Ю. Мазина, Ю.В. Николенко, Н.Е. Воробьева *Институт биологии гена РАН, Москва, Россия*

В ходе предыдущих исследований мы обнаружили, что инсуляторный белок Su(Hw), содержащий домен цинковых пальцев, взаимодействует с ENY2 и привлекает ENY2-содержащие комплексы на Su(Hw)-зависимые инсуляторы дрозофилы, участвуя одновременно в регуляции транскрипции и в позиционировании ориджинов репликации. В ходе данного проекта мы изучаем взаимодействие ENY2 с еще одним белком CG9890, который содержит домен цинковых пальцев, как и Su(Hw). Мы предполагаем, что по аналогии с Su(Hw), белок CG9890 является ДНК-связывающим белком, который привлекает ENY2-содержащие комплексы на свои сайты связывания, организуя, таким образом, регуляторные элементы генома, необходимые для функционирования клетки. В ходе данного проекта было подтверждено взаимодействие с белком ENY2. Анализ внутриклеточной локализации CG9890 показал, что этот белок локализован преимущественно в ядре. С помощью полногеномного анализа ChIP-Seq была определена локализация белка CG9890 в геноме дрозофилы. Установлено, что сайты посадки изучаемого белка в геноме преимущественно ассоциированы с промоторными областями генов. С использованием нескольких биоинформатических подходов нам удалось продемонстрировать наличие геномной колокализации белка CG9890 с субъединицами ENY2-содержащих комплексов SAGA и ORC, а также комплекса ремоделирования хроматина dSWI/SNF. Биохимическими методами также показано взаимодействие с комплексами SAGA, ORC, dSWI/SNF, TFIID и TPO. Взаимодействие с белком Xmas-2 (комплекс AMEX) показать не удалось. Кроме того, мы установили, что сайты посадки белка CG9890 в геноме являются областями с низкой нуклеосомной плотностью. Таким образом, CG9890 взаимодействует с транскрипционными комплексами, вовлеченными в инициацию и элонгацию транскрипции, но не взаимодействует с комплексом AMEX, участвующем в экспорте мРНК из ядра в цитоплазму, что указывает на работу CG9890 в первых стадиях транскрипционного цикла. Кроме того, CG9890 взаимодействует с комплексом ORC, который необходим для позиционирования точек начала репликации. Возможно, CG9890 может также принимать участие в синхронизации транскрипции и репликации. Таким образом, белок CG9890 может являться новым регуляторным фактором дрозофилы, участвующим в привлечении вышеуказанных комплексов на промоторы определенной группы генов. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-04-01453.*

Частично собранные нуклеосомные структуры: полноатомные модели и интерпретация экспериментов

Г.Н. Рычков^{1,2}, А.В. Илатовский^{1,3}, И.Б. Назаров⁴, А.В. Швецов^{1,2}, Д.В. Лебедев¹, А.Ю. Конев¹, В.В. Исаев-Иванов¹, А.В. Онуфриев⁵

¹Петербургский институт ядерной физики, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина; ²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия; ³Калифорнийский университет в Сан-Диего, Ла Хойя, США; ⁴Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия; ⁵Вирджинский политехнический университет, Блэксбург, США

Экспериментальные данные последнего десятилетия свидетельствуют о том, что нуклеосома является не единственной статичной структурой, а представлена динамическим семейством дискретных структурных состояний, в которых отсутствует один или несколько гетеродимеров гистонов – так называемые частично собранные нуклеосомные структуры (ЧНС). Наряду с канонической структурой нуклеосомы, знания о ЧНС важны для понимания механизмов регуляции доступности ДНК для белковых факторов в процессах репликации, транскрипции, репарации и т. п. Мы применили методы молекулярного моделирования в комбинации с атомной силовой микроскопией для создания полноатомных моделей трёх ключевых ЧНС, наблюдаемых в процессах сборки/разборки нуклеосомы: гексасомы (H2A·H2B)·(H3·H4)₂, тетрасомы (H3·H4)₂ и димомы (H3·H4). Несмотря на высокую конформационную подвижность свободных плеч ДНК таких структур, протяжённость защищённых гистоновым кором участков ДНК остаётся стабильной. Созданные полноатомные модели ЧНС были использованы для анализа разносторонних экспериментальных данных (атомная силовая микроскопия, резонансный перенос энергии флуоресценции в одиночных частицах, малоугловое рентгеновское рассеяние). На основе полученных результатов предложена альтернативная интерпретация современных полногеномных исследований защищённости ДНК в активном хроматине. Проведённый анализ длин защищённых фрагментов ДНК позволил сделать заключение, что в активно транскрибируемом хроматине присутствует значительное количество ЧНС. Наличие ЧНС может являться не только следствием, но и необходимым условием быстрого прохождения процесса транскрипции *in vivo*.

Аллельный вариант Rs12722489 определяет способность к связыванию эстрогенового рецептора с участком первого интрона гена IL2RA

М.А. Афанасьева, А.М. Шварц *Институт молекулярной биологии РАН, Москва, Россия*

Полногеномные исследования ассоциаций (Genome-Wide Association Studies, GWAS) позволяют выявить однонуклеотидные полиморфизмы в геноме человека, ассоциированные с определенными фенотипическими характеристиками, в том числе предрасположенностью к определенным заболеваниям. Это позволяет проникнуть в их патогенетические механизмы и

искать новые подходы к лечению. Однако выявленные в ходе GWAS полиморфизмы не обязательно являются истинно задействованными в патогенезе, а могут быть лишь генетически сцеплены с таковыми. Большинство выявляемых в GWAS полиморфизмов находятся в некодирующих областях генома и, как ожидается, должны оказывать свое влияние через изменение связывания белковых факторов. С помощью программы PERFECTOS-APE [Vorontsov I. et al. (2015). PERFECTOS-APE – Predicting Regulatory Functional Effect of SNPs by Approximate P-value Estimation. In Proceedings of the International Conference on Bioinformatics Models, Methods and Algorithms (BIOSTEC 2015), pp102-108] мы оценили способность полиморфизмов, ассоциированных с рассеянным склерозом и находящихся в пределах 10 тыс. пар нуклеотидов выше старта транскрипции и в первых интронах иммунологически релевантных генов, изменять связывание транскрипционных факторов. Для альтернативных аллелей полиморфизма rs12722489, находящегося в первом интроне гена IL2RA, наблюдалась значимая разница в силе связывания эстрогеновых рецепторов (ER) α и β . С помощью метода задержки в нуклеопротеиновом геле (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA) мы показали, что аллельный вариант Rs12722489 действительно влияет на связывание очищенного ER α человека в контексте 32-нуклеотидного фрагмента. По данным люциферазного теста участок интрона длиной 1 тыс. пар нуклеотидов, содержащий только один из вариантов полиморфизма, является эстроген-зависимым энхансером по отношению к промотору IL2RA. Эффект зависел от трансфицируемой клеточной линии. *Работа поддержана грантом РНФ №14-14-01140.*

ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОВ ЦИСТЕИНОВЫХ КАТЕПСИНОВ У НАСЕКОМЫХ

Е.Н. Элпидина¹, А.Г. Мартынов², М.А. Климова³, Е.А. Воротникова¹, Б. Опперт⁴, И.Ю. Филиппова³

¹Химический факультет, ²Факультет биоинженерии и биоинформатики, ³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; ⁴Центр исследования зерна и здоровья животных, Манхэттен, Канзас, США

Цистеиновые катепсины семейства C1 папаина являются важными участниками лизосомальной деградации белков, а также вовлечены в ряд нормальных и патологических физиологических процессов. Одна из специфических функций цистеиновых катепсинов была выявлена у насекомых, где у некоторых таксономических групп они являются главными пищеварительными ферментами. Появление новых функций ферментов привело к изменениям в структуре генов и, соответственно, к образованию новых видов пептидаз. Мы провели аннотацию и детальный анализ цистеиновых пептидаз в геномах 12 насекомых в рамках глобального проекта i5K (5000 геномов насекомых и других членистоногих). Различные виды насекомых содержали от пяти генов катепсинов у паразитического перепончатокрылого *Orussus abietinus* до 50 у жука фитофага *Leptinotarsa decemlineata*. На основании филогенетического анализа мы определили восемь консервативных групп генов-ортологов и несколько видоспецифичных неконсервативных групп генов пептидаз. Консервативные группы генов представлены катепсинами B, F, L, O и тремя новыми видами пептидаз, подобных, но отличных от катепсина L (катепсины I, LI и La). Видоспецифичные группы генов были найдены в виде кластеров генов у жуков *L. decemlineata*, *Tribolium castaneum*, *Tenebrio molitor*, у таракана *Blattella germanica* и у ручейника *Cataglyphis aquilonaris*. Эти кластеры содержали гены катепсин B- и/или катепсин L-подобных пептидаз. Эволюция неконсервативных групп генов предположительно базировалась на дупликации одного или нескольких генов независимо у разных организмов. Подробное исследование пищеварительных пептидаз жуков-требрионид *T. castaneum* и *T. molitor* показало, что их главные пищеварительные цистеиновые пептидазы являются ортологами и относятся к группе специфичных для этих жуков катепсин L-подобных пептидаз. Рекombинантный препарат главной пищеварительной катепсин L-подобной пептидазы *T. castaneum* значительно эффективнее гидролизует трудногидролизуемые пептиды главных пищевых белков этого насекомого по сравнению с консервативным лизосомальным катепсином L человека, что указывает на приспособительную эволюцию видоспецифичных цистеиновых пептидаз. *Работа поддержана грантом РФФИ №15-04-08689_а.*

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ СЕМЕЙСТВА NF1 В ХРОМАТИНЕ ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА ТРИПТОФАНДИОКСИГЕНАЗЫ КРЫСЫ В АКТИВНО ТРАНСКРИБИРУЕМОМ И РЕПРЕССИРОВАННОМ СОСТОЯНИИ

Е.В. Романовская, М.В. Вихнина, Ю.В. Нужина, Г.И. Чихиржина Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

Формирование компетентной к транскрипции структуры хроматина промоторных областей индуцибельных генов, характеризующейся нарушенной нуклеосомной структурой, является необходимым условием для успешной регуляции их экспрессии. Для регуляторной области глюкокортикоид-зависимого гена триптофандиоксигеназы (tdo) крысы было показано наличие нескольких участков гиперчувствительности к ДНКазе I, при этом с помощью биоинформатического анализа было обнаружено несколько сайтов связывания транскрипционного фактора NF1 (nuclear factor 1), ассоциированных с зонами гиперчувствительности. Дальнейшие исследования подтвердили специфическое связывание белков семейства NF1 с промоторной областью гена tdo крысы *in vitro*. Основываясь на этих данных, было выдвинуто предположение, что белки семейства NF1 могут участвовать в поддержании компетентной к транскрипции структуры хроматина регуляторных областей глюкокортикоид-зависимых генов. Цель данной работы состояла в исследовании распределения *in vivo* транскрипционных факторов семейства NF1 в хроматине промоторной области тканеспецифического гена tdo крысы, экспрессирующегося в тканях печени. В рамках поставленной цели был проведен сравнительный количественный анализ степени обогащения фактором NF1 хроматина регуляторной области гена tdo в состоянии активной и репрессированной транскрипции, которые представлены хроматином печени и почек крыс соответственно. Фрагменты хроматина после иммунопреципитации были проанализированы методом ПЦР в реальном времени с использованием пересчёта данных на исходное количество ДНК, не подвергавшейся иммуноосаждению. В результате были выявлены статистически достоверные различия в уровне обогащения фактором NF1 регуляторной области гена tdo (-259/-135 п.о.) между печенью и почками при $p < 0,05$. В случае референсной последовательности регуляторной области гена actb статистически достоверные отличия между уровнем обогащения фактором NF1 для печени и почек не были выявлены при $p < 0,05$, что является ожидаемым результатом для референсной последовательности, показатели для которой не зависят от типа ткани. Полученные результаты подтверждают наше предположение, что транскрипционные факторы семейства NF1 способны участвовать в процессе ремоделирования хроматина и установлении тканеспецифичной экспрессии генов.

РОЛЬ ТРЕХМЕРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМА И КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИИ ЯДРА В РЕКОМБИНАЦИИ ЛОКУСА ГЕНОВ ТЯЖЕЛЫХ ЦЕПЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

О.В. Яровая¹, А.М. Пичугин², И.В. Скляр^{1,2}, С.В. Разин¹, Е.С. Васецкий²

¹Институт биологии гена РАН, Москва, Россия; ²Институт канцерогенеза им. Густава Руса, Вильгельмф, Франция

Ядерное пространство разделено на целый ряд компартментов, в которых секвестрируются специфические процессы, связанные с той или иной активностью генома. С точки зрения исследования функциональной компартментализации эукариотического ядра и генома особый интерес представляют гены тяжелых цепей иммуноглобулина (IGH), многократно пере-страивающиеся на разных этапах дифференцировки В-лимфоцитов. Для изучения компартментализации рекомбинационных процессов в пространстве ядра мы использовали искусственную систему дифференцировки наивных В-лимфоцитов, разработанную в лаборатории Т. Феста (Ренн, Франция). В использованной модельной системе наивные В-лимфоциты стимулируют к пролиферации и далее к соматической гипермутации и переключению изотипа иммуноглобулинов. С использованием 3D-FISH мы продемонстрировали, что в ходе дифференцировки В-лимфоцитов происходит перемещение локуса IGH в околядрешковое пространство, причем это перемещение по времени совпадает с активацией рекомбинационных процессов. Была обнаружена колокализация локуса IGH с AICDA (основным ферментом, направляющим рекомбинационные процессы) на границе ядрышка в В-лимфоцитах, проходящих на стадии соматической гипермутации и переключения изотипа антител. Мы проанализировали перемещения локуса IGH относительно гетерохроматинового компартмента и транскрипционных фабрик и показали, что перемещения локуса обусловлены именно рекомбинационными процессами, но не активацией или репрессией транскрипции генов тяжелых цепей иммуноглобулинов. Была охарактеризована ядерная локализация генов-партнеров IGH по лейкозогенным транслокациям. Продemonстрировано, что сближенные аллели с-туса и IGH – генов-партнеров по транслокациям – преимущественно локализуются в околядрешковом пространстве. Сближение в околядрешковом компартменте в ходе рекомбинационных процессов может существенно повышать вероятность транслокации и последующего развития лимфомы Беркитта. Предложена гипотеза о том, что процессы рекомбинации локуса генов тяжелых цепей иммуноглобулинов в ходе созревания В-лимфоцитов регулируются не только на молекулярном уровне, но и на уровне организации особого ядерного компартмента, в котором секвестрированы процессы соматической гипермутации и смены изотипов антител.

ИЗУЧЕНИЕ ПЕРЕКЛЮЧЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ИЗОФОРМ БЕЛКА RHIF10 – СУБЪЕДИНИЦЫ РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО КОМПЛЕКСА PBAF В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШИ

Ю.П. Симонов, В.В. Татарский, С.Г. Георгиева, Н.В. Сошников *Институт биологии гена РАН, Москва, Россия*

Развитие мозга млекопитающего происходит в эмбриогенезе и продолжается после рождения. Ремоделирующие комплексы BAF и PBAF принимают активное участие в регуляции экспрессии генов, реализующих клеточные программы. Одним из способов регуляции является изменение состава ремоделирующих комплексов в зависимости от стадии дифференцировки и окружения клетки. Данная работа посвящена изучению RHIF10 — субъединицы PBAF комплекса, ремоделирующего хроматин. Белок RHIF10 в клетках млекопитающих представлен четырьмя изоформами, отличающимися по своим свойствам и доменной структуре. Известно, что более длинные изоформы RHIF10 экспрессируются на ранних стадиях развития головного мозга мыши и сразу после ее рождения и связаны с пролиферацией нейрональных предшественников. Было определено, что в процессе дифференцировки нейрональных предшественников в зрелые нейроны происходит переключение экспрессии RHIF10 на другой тип изоформ — короткие. С помощью иммуногистохимии было определено, что короткие изоформы RHIF10 в сформировавшемся головном мозге мыши наиболее представлены в клетках Пуркинье. Было выполнено фракционирование ядерных экстрактов мозгов мышей разных стадий развития и установлено, что разные типы изоформ входят в состав комплекса PBAF, при этом некоторые субъединицы этого комплекса были отличными. С помощью специфических коиммунопреципитаций было определено, что вместе с длинными изоформами RHIF10 в состав PBAF комплекса входит BRD7, в то время как с короткими изоформами RHIF10 преципитируются некоторые субъединицы TFIIID комплекса, инициирующего транскрипцию. Также было показано, что PBAF комплекс, включающий в состав короткие изоформы RHIF10, контролирует экспрессию генов, специфичных для клеток Пуркинье, посредством привлечения TFIIID инициирующего комплекса на их промоторы. Таким образом, было выяснено, что переключение экспрессии изоформ белка RHIF10 влияет на состав PBAF комплекса, а также установлены возможные механизмы регуляции экспрессии специфических генов, контролируемые PBAF комплексом в клетках Пуркинье.

РОЛЬ РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО ХРОМАТИН КОМПЛЕКСА SWI/SNF ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ КЛЕТОК КРОВИ ПО МИЕЛОИДНОМУ ПУТИ

Г.М. Вирясова¹, Н.В. Сошникова²

¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

Нейтрофилы являются клетками иммунной системы, обеспечивающими первичный неспецифический иммунный ответ. Дифференцировка нейтрофилов происходит в костном мозге из гематопозитических стволовых клеток по миелоидному пути. При этом происходят изменения в экспрессии генов, которые приводят к значительной специализации клеток и изменению морфологии. При нарушениях и сбоях процессов дифференцировки возникают серьезные заболевания, например, различные формы лейкомии. Ремоделирующий хроматин комплекс SWI/SNF, является одним из наиболее важных мультибелковых комплексов, контролирующих транскрипцию генов и влияющих на дифференцировку клеток. Его состав, за счет различных изоформ субъединиц, отличается в разных тканях организма и определяет паттерн регулируемых им генов и программу развития организма. SWI/SNF комплекс участвует в развитии нейтрофилов из промиелоцитов. Целью данной работы было изучить субъединичный состав ремоделирующего хроматин комплекса SWI/SNF и его влияние на экспрессию генов, играющих важную роль в ходе дифференцировки клеток по миелоидному пути. На модели раковой линии HL-60 и нейтрофилах человека было доказано, что процессе дифференцировки клеток по миелоидному пути происходит изменение субъединичного состава комплекса SWI/SNF. С помощью иммунопреципитации нами было показано, что в пролиферирующих клетках HL-60 в состав специфического модуля комплекса SWI/SNF входит P1 изоформа субъединицы RHIF10, в то время как в

конечно дифференцированных нейтрофилах здоровых доноров в комплексе содержалась PHF10-Ss изоформа. Общее количество субъединиц SWI/SNF комплекса в процессе дифференцировки резко падает, что коррелирует с общим уменьшением транскрипционной активности нейтрофилов по сравнению с пролиферирующими предшественниками, однако специфические гены CD66a, CD66b, CD66d начинают активно экспрессироваться. Мы изучили распределение SWI/SNF комплекса на промоторах этих генов и показали, что экспрессия специфических генов сопровождается замещением изоформ PHF10 в составе комплекса SWI/SNF. В процессе дифференцировки клеток крови по миелоидному пути в составе ремоделирующего хроматин комплекса SWI/SNF происходит замена изоформы PHF10-P1 на PHF10-Ss, что коррелирует с экспрессией специфических генов нейтрофилов.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОМНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ α/β -ГЛОБИНОВОГО ДОМЕНА *DANIO RERIO* И АНАЛИЗ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ.

А.П. Ковина, Н.В. Петрова, С.В. Разин, О.В. Яровая

Институт биологии гена РАН; Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Функцию переноса кислорода у позвоночных выполняет молекула гемоглобина, состоящая из двух α и двух β -полипептидных цепей, которые кодируются соответственно α и β -глобиновыми генами. У теплокровных животных α - и β -глобиновые гены организованы в хроматиновые домены разного типа, и их экспрессия регулируется посредством разных механизмов. У холоднокровных позвоночных, в частности у тропической рыбы *Danio rerio*, α - и β -глобиновые гены кластеризованы. Главный локус глобиновых генов *Danio rerio* расположен на хромосоме 3 и включает α - и β -глобиновые гены эмбрионально-личиночного и взрослого типов, разделенные участком длиной 9 т.п.н.. Перед локусом находится ген C16orf35, внутри которого у теплокровных позвоночных животных находится главный регуляторный элемент (MRE) домена α -глобиновых генов. В настоящей работе с использованием техники транзientной трансфекции эритроидных клеток генетическими конструкциями, содержащими репортерный ген под контролем потенциальных регуляторных элементов домена, были охарактеризованы промоторы взрослых и эмбрионально-личиночных глобиновых генов главного локуса. Далее, было продемонстрировано, что в 5 интроне гена C16orf35 присутствует функциональный аналог MRE теплокровных животных, который проявляет энхансерную активность в отношении промоторов как взрослых, так и эмбрионально-личиночных α - и β -глобиновых генов. Однако с использованием метода фиксации конформации хромосом было показано, что MRE *Danio rerio*, расположенный в интроне гена C16orf35, сближен только с промоторами генов, которые экспрессируются в эритроцитах взрослых рыб, но не взаимодействует с промоторами глобиновых генов в эритроцитах на личиночной стадии развития. Более того, мы обнаружили, что между субдоменами взрослых и эмбрионально-личиночных глобиновых генов располагается инсуляторный элемент, который колокализуется с сайтом связывания CTCF.

ПОЛИ(АДФ-РИБОЗА)ПОЛИМЕРАЗЫ КАК КЛЮЧЕВЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ПРОЦЕССОВ РЕПАРАЦИИ ДНК

О.И. Лаврик *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

Белки семейства поли(АДФ-рибоза)полимераз (PARP) катализируют синтез полимера АДФ-рибозы (PAR), ковалентно присоединенного к белкам-акцепторам, используя в качестве субстрата никотинамид аденин динуклеотид (NAD⁺). Наиболее эффективными катализаторами синтеза поли(АДФ-рибозы) являются PARP1 и PARP2, которые при взаимодействии с разрывами ДНК осуществляют поли(АДФ-рибозил)ирование (PAR-илирование) самих себя и других белков-акцепторов, регулируя таким образом их функции в различных процессах. Катализируемое PARP1 авто-PAR-илирование и модификация других ядерных белков активируются при воздействии оксидативного стресса, ионизирующей радиации и других агентов. Ковалентно присоединенный к белкам полимер PAR, имеющий сложную разветвленную структуру, придает отрицательный заряд PARP, гистонам и другим белкам, что приводит к ослаблению их связывания с ДНК за счет электростатического отталкивания. Согласно существующим гипотезам, PARP1 и PARP2 регулируют процессы репарации ДНК, привлекая белки систем репарации в места повреждений. Широкое распространение белков PARP в эукариотах и их необычная активность в посттрансляционной модификации могут быть также связаны с тем, что эукариотическая ДНК плотно упакована в виде хроматина. Структура хроматина затрудняет ДНК-белковые взаимодействия, в частности, было показано, что поврежденные участки ДНК в составе хроматина трудно доступны для белков репарации. Доклад будет посвящен роли PARP1 и PARP2 в регуляции процессов репарации ДНК. Будет рассмотрена специфичность взаимодействия этих белков со структурами ДНК, несущими повреждения, исправляемые различными системами репарации, такими как эксцизионная репарация оснований, эксцизионная репарация нуклеотидов и репарация двойных разрывов. Будет рассмотрена роль взаимодействия PARP1 и PARP2 с белками систем репарации ДНК, а также новые мишени и механизмы PAR-илирования, катализируемого PARP1 и PARP2, в связи с ролью ДНК как активатора и субстрата процессов PAR-илирования. Ключевая роль PARP1 и PARP2 в регуляции процессов метаболизма ДНК позволяет рассматривать их в качестве универсальных мишеней для создания эффективных препаратов для лечения онко- и нейродегенеративных заболеваний. *Работа поддержана Российским научным фондом (проект 14-24-00038).*

ЭКСЦИЗИОННАЯ РЕПАРАЦИЯ НУКЛЕОТИДОВ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ. АНАЛИЗ СУБСТРАТНЫХ СВОЙСТВ МОДЕЛЬНЫХ ДНК *IN VITRO*

Н.В. Лукьянчикова, И.О. Петрусева, О.И. Лаврик

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

В ДНК живых организмов постоянно появляются повреждения, являющиеся результатом воздействия факторов экзогенного и эндогенного характера. Эксцизионная репарация нуклеотидов (ЭРН) является основным путем удаления поврежденных ДНК, дестабилизирующих структуру ДНК-дуплекса. Такие модификации ДНК вызываются УФ-облучением, мутагенами окружающей среды и некоторыми химиотерапевтическими агентами. Одним из подходов к изучению процесса ЭРН является использование синтетических аналогов субстрата ЭРН – ДНК, содержащих объемные модификации. Проведена оценка свойств ряда модельных ДНК, содержащих флуоресцентные и фотоактивные повреждения. Оценено влияние повреждений на стабильность ДНК и их сродство к ХРС–HR23В, инициаторному белку системы ЭРН. Показано, что появление вто-

рого повреждения в некоторых положениях противоположной цепи дуплекса увеличивает сродство модельного субстрата к ХРС–HR23В. Проведена оценка субстратных свойств ДНК-дуплексов, содержащих модельные повреждения в обеих цепях, в реакции специфической эксцизии, катализируемой белками системы ЭРН. Показало, что при появлении второй модификации в противоположной цепи дуплекса, напротив первого повреждения, уровень специфической эксцизии резко снижается. Смещение данной модификации в направлениях 5' и 3' относительно позиции первого повреждения также оказывает существенное влияние на субстратные свойства ДНК. Анализ взаимодействия синтетических аналогов поврежденной ДНК с белками комплекса ЭРН позволяет лучше понять механизм распознавания повреждения и то, как скорость удаления повреждения связана с его структурой. Такое понимание важно как в фундаментальном, так и в прикладном аспекте: действие многих химиотерапевтических препаратов основано на введении в ДНК объемных повреждений. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 142400038.*

МОЛЕКУЛЯРНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПОИСКА И УДАЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В ПРОЦЕССЕ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ

Н.А. Кузнецов, О.С. Федорова *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

В процессе функционирования клеточная ДНК постоянно подвергается воздействию различных факторов, таких как повышенный уровень загрязнения окружающей среды, ультрафиолетовое и ионизирующее излучение, действие токсических веществ, приводящих к окислению, дезаминированию, алкилированию и другим типам модификации гетероциклических оснований. Повреждение ДНК и накопление мутаций приводят к преждевременному старению, ускоренному развитию дегенеративных процессов организма, опухолевой трансформации клеток и ряду заболеваний. Чтобы противодействовать накоплению мутаций в ДНК, живые организмы имеют специальную защитную систему – систему репарации ДНК, включающую десятки ферментов, ответственных за поиск и удаление поврежденных участков ДНК, и восстановление исходной нуклеотидной последовательности. Основной целью данной работы являлось определение кинетических закономерностей специфического узнавания повреждений ДНК и образования каталитически активных комплексов в процессах, катализируемых про- и эукариотическими ДНК-гликозилазами и AP-эндонуклеазами. Для этого методом остановленного потока с регистрацией изменений интенсивности флуоресценции остатков Tgr в ферментах и флуорофоров в ДНК проводили анализ конформационных изменений биополимеров в процессе их взаимодействия. На основании полученных данных установлены механизмы узнавания поврежденных участков ДНК важнейшими ферментами репарации человека и *E. coli*, и определены ключевые стадии ферментативных процессов, обеспечивающие высокую субстратную специфичность и ответственные за дискриминацию поврежденных нуклеотидов. Кроме того, детализирована и дополнена функциональная роль различных аминокислотных остатков активного центра ферментов, участвующих, как в узнавании повреждения, так и в каталитических стадиях. *Работа поддержана грантами РФФИ (16-04-00037, 14-04-00531, 15-04-00467 и 15-34-20121), МКБ 6.11. Часть работы, включающая анализ данных, полученных для ДНК-гликозилаз, поддержана грантом РФФИ № 14-14-00063. Часть работы, включающая анализ данных, полученных для AP-эндонуклеаз, поддержана грантом РФФИ № 16-14-10038.*

БЕЛОК MutL ИЗ СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ ДНК-«МИСМАТЧЕЙ»: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С МОЛЕКУЛЯРНЫМИ ПАРТНЕРАМИ

М.В. Монахова¹, А.И. Пенкина¹, Е.С. Шилкин¹, А.В. Павлова¹, П. Фридрихс², Е.А. Кубарева¹

¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и химической факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

²Институт биохимии, Университет имени Ю. Либиха, Гиссен, Германия

Система репарации неканонических пар нуклеотидов или «мисматчей» (MMR) существует во всех живых организмах и обеспечивает воспроизведение генетического материала в неизменном виде. Центральную роль в координации различных этапов MMR выполняет белок MutL, который «получает сигнал» об обнаружении «мисматча» от белка MutS и направляет эксцизионную репарацию в дочерней цепи ДНК. В клетках *E. coli* дочернюю цепь гидролизует сайт-специфическая эндонуклеаза MutH. Полагают, что внесение разрыва в ДНК в большинстве других организмов выполняют гомологи MutL, у которых обнаружен эндонуклеазный мотив. Однако механизм этого процесса практически не исследован. Одним из таких организмов является бактерия *Rhodobacter sphaeroides*, которая способна выживать в различных стрессовых условиях. Нами впервые выделен белок MutL из *R. sphaeroides* (rsMutL). Показано, что он обладает эндонуклеазной функцией. Степень расщепления ДНК rsMutL увеличивается в ряду $Cd^{2+} < Mg^{2+} < Co^{2+} < Mn^{2+}$. Продemonстрировано, что АТФ значительно ингибирует способность rsMutL расщеплять ДНК. Исследования взаимодействия MutL с ДНК затруднены из-за динамического характера структуры этого белка, принимающего множество различных конформаций. Нами разработан подход, позволяющий фиксировать MutL на ДНК при взаимодействии тиольной группы остатка Cys этого белка с пиридилдитиогруппой в составе синтетического ДНК-дуплекса. Этот подход был использован для зондирования ДНК-связывающего центра MutL из *E. coli*. Продemonстрировано, что аминокислотные остатки MutL в позициях 218 и 251 наиболее сближены с ДНК-лигандом. Показано, что присутствие белка MutS увеличивает выход и скорость образования конъюгатов мутантных форм MutL с модифицированной ДНК. С использованием метода FRET изучена кинетика образования комплекса MutL с MutS из *E. coli* для разных конформационных состояний белка MutL. Для этого в гомогенном состоянии получены конъюгаты мутантных форм MutS с ДНК. Показано, что «закрытая» форма MutL с высокой скоростью взаимодействует с конъюгатом MutS(N497C)-ДНК. В этом случае дуплекс зафиксирован в ДНК-связывающей области MutS, не участвующей в узнавании «мисматча». Образование комплекса MutS-MutL-ДНК, по-видимому, сопровождается конформационной перестройкой MutL. *Работа проводилась при поддержке гранта РФФИ (№ 16-04-00575).*

ВКЛЮЧЕНИЕ РИБОНУКЛЕОТИДОВ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫМИ ДНК-ПОЛИМЕРАЗАМИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ СИНТЕЗЕ ДНК

К.А. Козырева, А.В. Игнатов, А.В. Кульбачинский, А.В. Макарова *Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия*

Рибонуклеотиды являются наиболее частыми неканоническими нуклеотидами, которые встречаются в геноме эукариот. Концентрации рибонуклеозидтрифосфатов (pНТФ) в клетках эукариот превышают концентрации дезоксирибонуклеозид-

трифосфатов (дНТФ) в десятки раз, что может являться причиной достаточно высокой частоты включения рНТФ многими ДНК-полимеразами. В ходе эволюции ДНК-полимеразы приобрели способность к дискриминации между дезокси- и рибонуклеотидами при синтезе ДНК, но эффективность дискриминации даже у высокоточных репликативных ДНК-полимераз не является абсолютной. Специализированные ДНК-полимеразы человека участвуют в репликации поврежденной ДНК и обладают крайне низкой точностью синтеза. Вследствие особого строения активного центра, не требовательного к структуре ДНК-матрицы и нуклеотидов, потенциально эти ферменты могут осуществлять ошибочное включение рибонуклеотидов с очень высокой частотой. Мы провели исследование эффективности включения рНТФ специализированными Pol *iota*, Pol *karra* и Pol *beta* человека при репликации на неповрежденных ДНК-матрицах и ДНК-матрицах, содержащих наиболее часто встречающиеся в геномной ДНК повреждения (АП-сайты, 8-оксо-Г, тимидин гликоль и др). Было показано, что при использовании концентраций рНТФ и дНТФ, близких к физиологическим, специализированные ДНК-полимеразы осуществляют включение рНТФ с высокой эффективностью напротив некоторых повреждений ДНК. Например, напротив АП-сайтов, которые являются самыми распространенными повреждениями ДНК и блокируют работу большинства ДНК-полимераз при репликации, Pol *iota* осуществляет преимущественное включение рНТФ, а не дНТФ. Хотя рибонуклеотиды в составе ДНК потенциально могут приводить к появлению мутаций, поскольку нарушают геометрию сахарофосфатного остова ДНК и подвержены гидролизу с образованием разрывов, включение рибонуклеотидов специализированными ДНК-полимеразами при репликации поврежденных участков ДНК может служить важным биологическим механизмом, позволяющим эффективно преодолеть репликативный блок, быстро восстанавливая способность клетки к репликации. *Исследование выполнено при поддержке Программы Президиума РАН МКБ «Новые группы», РФФИ 15-04-08398 и фонда Д. Зимина «Династия».*

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ИОНОВ МАРГАНЦА НА КЛЕТКИ

К.А. Захарчева, Л.В. Генинг, В.З. Тарантул Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Ионы марганца являются необходимыми микроэлементами для нормальной жизнедеятельности организмов, включая человека. Однако в больших концентрациях ионы марганца могут оказывать токсический эффект на клетки, приводя к различным заболеваниям нервной системы организмов, в частности к манганизму. До сих пор молекулярные механизмы марганцевой токсичности точно не изучены. Существует гипотеза, согласно которой повышенная концентрация ионов марганца может активировать некорректное включение нуклеотидов некоторыми из ДНК-полимераз. Наиболее вероятным кандидатом на роль такого фермента является ДНК-полимераза йота (Pol *i*), которая, в отличие от других ДНК-полимераз, преимущественно активируется ионами марганца и крайне некорректно осуществляет синтез ДНК. Нами была получена линия клеток SKOV-3, устойчивая к 200 мкМ ионов марганца, в то время как значение IC₅₀ исходной линии составляло 80 мкМ. Активность Pol *i* в экстрактах устойчивых к ионам марганца клетках сохранялась. Было предположено, что активация Pol *i* в клетках, устойчивых к ионам марганца, может нейтрализоваться повышенной активностью поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (ПАРП). Проведенный анализ показал, что уровень активности фермента ПАРП в устойчивых к ионам марганца клетках в 1,7 раз выше, чем в исходной линии. Вероятно, именно ПАРП ликвидирует ошибки Pol *i* в процессе синтеза ДНК, что и позволяет устойчивым к ионам марганца клеткам выживать в присутствии токсических концентраций этих ионов. Повышенная активность ПАРП может негативно сказываться на пролиферации клеток и, в итоге, приводить к их гибели по механизму, получившему название «партанатоз». Полученные нами клетки, устойчивые к высоким концентрациям ионов марганца, и в самом деле обладали низкой скоростью роста по сравнению с исходными клетками. Полученные данные позволили нам предположить, что повышенная концентрация ионов марганца вызывает в клетках возникновение большого числа повреждений ДНК из-за активации Pol *i*, что в свою очередь приводит к активации ПАРП и, в конечном итоге, вызывает гибель клеток по механизму партанатоза.

ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗА МЛЕКОПИТАЮЩИХ DNMT3A: МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ И МУТАЦИИ ПРИ РАКЕ

Е.С. Громова, А.А. Толкачева, О.В. Лукашевич, Н.А. Черепанова

Химический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Метилирование ДНК по остаткам цитозина в CpG-сайтах является эпигенетической модификацией, играющей важную роль в регуляции экспрессии генов и в других процессах. Создание правильного распределения метилированных и неметилированных CpG-сайтов у млекопитающих (рисунка метилирования) – важнейший процесс, в котором ключевую роль играет *de novo* ДНК-метилтрансфераза (MTазa) Dnmt3a. Недавно обнаружены многочисленные мутантные формы DNMT3a (обозначение этого фермента у человека) при гематологических злокачественных заболеваниях. Вместе с тем, механизмы функционирования Dnmt3a изучены недостаточно, а механизмы, которые объяснили бы вклад мутаций в DNMT3a в развитие опухолей, практически отсутствуют. Объектом нашего исследования явился каталитический домен МТазы мыши Dnmt3a-CD. В общепринятом для МТаз каталитическом механизме метилирования основная роль отводится двум консервативным аминокислотным остаткам: C120 из мотива IV и E166 из мотива VI. Мы впервые показали, что ключевую роль в процессе катализа играют еще и два консервативных остатка аргинина из VIII-го мотива: R200 и R202. Для этого использовали серию мутантных форм по этим остаткам и исследовали их роль на отдельных этапах реакции, катализируемой Dnmt3a-CD: способность связываться с ДНК-субстратом, метилирующую активность, способность «выщелчивать» цитозин-мишень из двойной спирали и образовывать переходный ковалентный комплекс с ДНК. Показано, что эти остатки участвуют в «выщелчивании» цитозина-мишени и совместно с E166 и C120 – в создании и стабилизации реакционноспособного ковалентного интермедиата, взаимодействующего с S-аденозил-L-метионином. Этот вывод носит фундаментальный характер для понимания механизма действия других МТаз. Далее проведен анализ мутантных форм DNMT3a человека, найденных при онкологических заболеваниях. Оказалось, что мутации по охарактеризованным нами функционально значимым остаткам аргинина (они соответствуют R790 и R792 в DNMT3a) обнаружены при острой миелоидной лейкемии и в «долейкемических» стволовых клетках (2015: J. Clinical Oncol и Nature Reviews Cancer). Можно предположить, что в раковых клетках, содержащих мутанты по R790 и R792, полностью нарушается каталитическая функция DNMT3a (и, как следствие, меняется рисунок метилирования). *Работа поддержана грантом РФФИ 16-04-01087.*

ВОДОРАСТВОРИМОЕ ПРОИЗВОДНОЕ ФУЛЛЕРЕНА [C60] АКТИВИРУЕТ NOX4-ОКСИДАЗУ, ИНТЕНСИВНО СВЯЗЫВАЯ АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТАХ ЛЕГКОГО ЧЕЛОВЕКА

В.А. Сергеева, Е.С. Ершова, Л.В. Каменева, Е.М. Малиновская, П.А. Трошин, Н.Н. Вейко, С.В. Костюк

Медико-генетический научный центр, Москва; Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка, Россия

В последнее время в мире уделяется все большее внимание наноматериалам в связи с их уникальными свойствами. Одним из таких наноматериалов являются фуллерены, производство которых уже достигло промышленных масштабов, несмотря на то, что их влияние на организм пока исследовано мало. Известно, что [C60] фуллерены и их производные обладают антиоксидантной активностью, противовирусными свойствами и могут быть использованы как векторы для доставки лекарств в клетку. Однако необходимо более тщательное исследование влияния этих соединений на клетки человека. Была исследована кинетика влияния водорастворимого фуллерена [C60], содержащего пять остатков 3-фенилпропионовой кислоты и хлора (F-828) на эмбриональные фибробласты легкого человека (ФЛЭЧ). Был обнаружен новый механизм регуляции фуллеренами уровня активных форм кислорода (АФК) в клетках человека. Через 15 минут после добавления исследуемого производного F-828 к ФЛЭЧ уровень АФК на поверхности клеток резко снижается. Снижение уровня АФК приводит к активации транскрипции гена NADPH-оксидазы NOX4 и уже через час после добавления происходит усиление синтеза активных форм кислорода. Через 3 часа уровень NOX4 и АФК значительно снижается. На данном этапе частицы производного фуллерена находятся в среде и взаимодействуют с поверхностью клеток. Через 24 часа исследуемое соединение проникает в цитоплазму клеток и связывается с внутриклеточными АФК, что вызывает усиление экспрессии гена NOX4 в ответ на недостаток АФК в клетке и новую активацию синтеза АФК приводя ко вторичному окислительному стрессу. Окислительный стресс приводит к появлению двунитевых разрывов ДНК, уровень экспрессии гистона H2A.X увеличивается. В присутствии ингибитора NOX4 плумбагина усиления синтеза АФК не наблюдается. Таким образом, производное фуллерена [C60] обладает мощной способностью связывать АФК, что приводит к недостатку АФК в клетках и активацией NOX4-оксидазы. Избыточная активность NOX4 развивает окислительный стресс и повреждения ДНК. Однако при непродолжительном действии соединения снижает уровень АФК в среде культивирования и на поверхности клеток, в связи с чем его можно потенциально использовать как мощный антиоксидант для быстрого блокирования острого окислительного стресса, например, при воздействии ионизирующей радиации.

РОЛЬ ПОЛИ(АДФ-РИБОЗИЛ)ИРОВАНИЯ В ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ НУКЛЕОТИДОВ

Н.И. Речкунова, Е.А. Мальцева, М.В. Суханов, Ю.С. Красикова, О.И. Лаврик

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Генетическая стабильность живого организма в значительной степени определяется функционированием систем репарации повреждений в ДНК. Один из важнейших путей репарации ДНК в клетках эукариот – эксцизионная репарация нуклеотидов (NER), обеспечивает удаление из ДНК множества структурно различных повреждений, таких как пиримидиновые димеры, возникающие под действием УФ-излучения, и объемные химические аддукты, образующиеся при попадании в клетку канцерогенов или некоторых химиотерапевтических средств. Регуляция функционирования систем репарации является важным элементом в поддержании необходимого уровня защиты генома при возникновении генотоксического воздействия. Один из ключевых механизмов регуляции функций систем репарации ДНК – поли(АДФ-рибозил)ирование белков (синтез полимера АДФ-рибозы (PAR), ковалентно присоединенного к белкам), катализируемое поли(АДФ-рибоза)полимеразами (PARP). Поли(АДФ-рибозил)ирование белков может изменять эффективность их взаимодействия с ДНК за счет отрицательно заряженного PAR. Из 18 известных белков семейства PARP клеточный ответ на повреждение ДНК путем реакции синтеза PAR опосредует в основном PARP1. Исправление повреждений системой NER – сложный многостадийный процесс, протекающий с образованием множества промежуточных комплексов, сборка и функционирование которых осуществляются за счет ДНК-белковых и белок-белковых взаимодействий, требующих четкой координации и регуляции. Исследовано влияние PARP1 и реакции синтеза PAR на взаимодействие с поврежденной ДНК ключевых факторов NER – XPC-RAD23B, XPA и RPA. Показано, что PARP1 конкурирует с XPA за связывание с ДНК и практически не влияет на связывание XPC-RAD23B и RPA. Все белки связывают PAR, средство к которому возрастает с увеличением длины цепи; высокомолекулярные фракции PAR конкурируют с ДНК за связывание с белками. В присутствии NAD⁺ эти белки подвергаются ковалентной модификации, эффективность которой зависит от структуры ДНК. Уровень модификации XPC-RAD23B значительно возрастает в присутствии УФ-облученной ДНК. Белки XPC-RAD23B и PARP1 взаимодействуют между собой с высоким сродством. Полученные данные позволяют предположить участие PARP1 в регуляции процесса NER. Работа поддержана грантами РФФИ 15-54-16003 и 16-54-76010.

ПРИМЕНЕНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОВ ПОЛИ(АДФ-РИБОЗО)ПОЛИМЕРАЗ 1(2) С РАЗРЫВАМИ ДНК

М.В. Суханова¹, Л. Хамон², С. Абрахи², В. Джоши², Р.О. Анарбаев¹, М.М. Кутузов¹, Н.А. Лебедева¹, П. Курми², О.И. Лаврик¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия; ²Университет Эври-Валь-д'Эссонна, Еври, Франция

Ядерные белки поли(АДФ-рибоза)полимераза 1 и 2 (PARP1(2)) связываются с одноцепочечными (ОЦР) и двухцепочечными (ДЦР) разрывами ДНК, образующимися как при воздействии генотоксических соединений, так и при функционировании ферментов во время репарации ДНК. При связывании с разрывом ДНК проявляется ферментативная активность PARP1(2), когда в присутствии NAD⁺ данные ферменты катализируют синтез поли(АДФ-рибозы) (PAR), и тем самым осуществляют ковалентную модификацию ряда клеточных белков, участвующих в метаболизме ДНК, в том числе собственную. Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) была исследована специфичность взаимодействия PARP1 и PARP2 с ОЦР и ДЦР. Взаимодействие PARP1 и PARP2 с одиночным повреждением ДНК, ОЦР или ДЦР, было оценено с использованием статистического анализа АСМ-изображений локализации данных белков на одиночных протяженных молекулах ДНК. На основании анализа АСМ-изображений комплексов PARP1(2) с ДНК была проведена оценка специфичности и Кд взаимодействия данных белков с ДЦР, ОЦР и неповрежденными сайтами (НС) ДНК. Показано, что PARP2 связывается с ДЦР и НС,

примерно в пять раз менее эффективно, чем PARP1, однако оба белка проявляют более высокое сродство и специфичность к ОЦР в сравнении с ДЦР и НС. Таким образом, для связывания PARP2 с ДНК важно наличие ОЦР в структуре, а эффективность связывания PARP1 зависит от присутствия ОЦР и ДЦР. Полученные результаты позволяют предположить, что оба белка могут играть важную роль в узнавании и регуляции репарации ОЦР ДНК. Разрывы в ДНК стимулируют синтез PAR, катализируемый PARP1(2). Методом АСМ проанализирован уровень синтеза PAR в зависимости от сайта локализации PARP1(2) на ДНК. Увеличения уровня авто-PAR-илирования белков в зависимости от сайта их локализации выглядит следующим образом: ОЦР~ДЦР>НС для PARP1, ОЦР>ДЦР для PARP2. Таким образом, степень активации PARP1 и PARP2 зависит от их начального сродства к сайту повреждения, то есть достаточно высокое сродство белка к определенному повреждению приводит к более интенсивному синтезу PAR. *Работа выполнена в рамках проектов: РФФИ 16-54-76010 и 15-54-16003.*

ДНК, СОДЕРЖАЩИЕ ОБЪЕМНЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ И ФОТОАКТИВНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ, КАК СУБСТРАТЫ ЭРН И ЗОНДЫ ДЛЯ АФФИННОЙ МОДИФИКАЦИИ

И. Петрусева^{1*}, А. Евдокимов¹, Н. Лукьянчикова^{1,2}, О.И. Лаврик^{1,2,3}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²Новосибирский государственный университет Минобрнауки РФ, Новосибирск; ³Алтайский государственный университет Минобрнауки РФ, Барнаул, Россия

Система ЭРН млекопитающих удаляет из ДНК широкий спектр объемных повреждений, удаляя их в составе 20-32-звенного фрагмента поврежденной цепи. При этом эффективность двойной инцизии может различаться десятки раз. Взаимосвязь между структурой повреждения и скоростью его удаления активно исследуется.

Целью данной работы также было понимание структурных черт, определяющих эффективность узнавания объемных повреждений. Создана серия синтетических ДНК, содержащих флуоресцентные и фотоактивируемые (nAnt, nFlu, Flu-dT, Far-dC, Far-dU, Fab-dC) аналогов аддуктов, образующихся под действием активных метаболитов компонентов табачного дыма. Проанализировано влияние этих повреждений на геометрию, термостабильность, сродство к белкам ЭРН; оценены их субстратные свойства в реакции эксцизии. Полученные характеристики – углы изгиба дуплексов, возникающие при введении повреждения (12°–25°); изменения температуры плавления ΔT_m (–3°–8°C) и сродство к ХРС (1,5–3,5 nM, по данным равновесного титрования) были типичными для субстратов ЭРН. Наиболее выраженные субстратные свойства продемонстрировали ДНК, содержащие нуклеозидные вставки nFlu и nAnt, а также фотоактивный Fab-dC.

Проанализированы изменения паттернов модификации белков при изменении структуры и размеров ДНК-зондов. С помощью техники, основанной на использовании специфических антител, среди мишеней модификации идентифицирована большая субъединица белка RPA. Кроме того, применение функционального теста позволило в качестве одной из мишеней идентифицировать PARP-1. *Работа поддержана грантом РФФИ 142400038.*

ВЫСОКОТОЧНЫЙ МЕТОД ДЕТЕКЦИИ И ПОДСЧЕТА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОЗИД ТРИФОСФАТОВ

Д.Б. Червякова, Т.Н. Кожина, В.Г. Королев *Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константина, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина; Санкт-Петербургский государственный университет, Россия*

Баланс внутриклеточных концентраций дезоксирибонуклеозид трифосфатов (дНТФ) является фундаментальным фактором, определяющим точную репликацию и репарацию ДНК у всех живых организмов. Дисрегуляция внутриклеточных количеств дНТФ приводит к мутагенезу, вследствие которого могут развиваться различные серьезные патологические отклонения в функционировании отдельных клеток, органов и систем. Механизм действия ряда лекарств направлен на восстановление баланса внутриклеточных количеств дНТФ. Возможность подсчета внутриклеточных уровней каждого из дНТФ, присутствующих в данный момент в клетке, позволит продвинуться в понимании биологических механизмов, приводящих к изменению уровней дНТФ в клетках и возникающей вследствие этого геномной нестабильности, а также, к объяснению механизмов действия многих лекарств. Существует два основных подхода к измерению внутриклеточных количеств дНТФ. Одна группа методик основана на разделении и подсчете дНТФ с помощью различных типов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ионообменная, обратнофазная и т. п.). Другая группа подходов основывается на ферментативном включении лимитирующего анализируемого дНТФ в новосинтезируемую цепь ДНК с радиоактивной или флуоресцентной детекцией. Оптимизированный нами высокочувствительный метод детекции дНТФ основывается на ферментативном включении лимитирующих количеств анализируемого дНТФ в растущую цепь ДНК. Система разработана таким образом, что включение лимитирующего дНТФ сопровождается 5' – 3' экзонуклеазной активностью Taq полимеразы, гидролизующей флуоресцентно меченый зонд, у которого в отсутствие полимеразной активности флуоресценция погашена. Интенсивность детектируемой с помощью прибора для ПЦР в реальном времени флуоресценции прямо пропорциональна количеству включаемых в синтезируемую цепь ДНК лимитирующих дНТФ. Представленная методика проста в исполнении, не требует длительных временных затрат и позволяет детектировать количества дНТФ в диапазоне от 0,5 до 20 пмоль.

АКТИВНОСТЬ APE1 В РЕПАРАЦИИ ТАНДЕМНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ В CpG НУКЛЕОТИДАХ

Н.С. Дырхеева^{1,2}, А. Sassa¹, М. Çağlayan¹, W.A. Beard¹, B.D. Freudenthal¹, M.J. Cuneo¹, О.И. Лаврик², S.H. Wilson¹

¹NIEHS, NIH, RTP, NC, USA; ²Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Одним из типов модификаций CpG динуклеотидов является метилирование остатка цитозина. 5-метилцитозин (5-mC) в ДНК дезаминируется с образованием неканонической пары Т:G (мисматч). Тимин-ДНК-гликозилаза (TDG) специфично отщепляет тимин в составе Т:G. Другой модификацией является окисление остатка G до 7,8-дигидро-8-оксогуанина (8-охоG). 8-охоG может образовывать водородные связи в паре с аденином, и если 8-охоG остается в геноме во время репликации, ДНК-полимеразы ошибочно вставляют А напротив 8-охоG. Мы изучили влияние апуриновой/апириимидиновой (AP-) эндонуклеазы 1 человека (APE1) на активность TDG и ДНК-гликозилазу OGG1 на структуре с двойным повреждением Tr8-охоG. APE1 не стимулировала активность OGG1, в отличие от контрольной структуры без 5'-Т:G мисматч. Таким образом, APE1 не способна вытеснить OGG1 при наличии 5'-Т:G мисматч. В результате образуется AP-сайт содержащая структура

ТрАР, для которой была исследована активность расщепления АР-сайта с помощью АРЕ1. Скорость расщепления по АР-сайту для структуры ТрАР была ниже, чем для структуры с канонической СрАР. На структуре Тр8-охоG было показано, что активность TDG значительно повышалась в присутствии АРЕ1, однако для структуры с 8-охоG:С парой стимулирующий эффект был снижен по сравнению с контрольной G:С парой. Таким образом, если TDG первой обрабатывает Т:G мисматч с 3'-8охоG, далее TDG остается связанной с АР-сайтом содержащим продуктом и предотвращает последующее выщепление 8-охоG с помощью OGG1. АРЕ1 способна расщепить АР-сайт в составе АРр8-охоG, и репарация далее завершается с помощью ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы. В результате в структуре ДНК остается пара 8-охоG:С, которая затем может быть исправлена с помощью OGG1. Поскольку присутствие Т:G мисматча с 5'-стороны от АР-сайта значительно снижало скорость реакции, катализируемой АРЕ1, было интересно определить, как сказывается наличие 5'-Т:G мисматча на геометрии связывания ДНК в активном центре АРЕ1. С помощью рентгеноструктурного анализа были получены структуры комплексов АР-сайт содержащих ДНК с АРЕ1. Была получена структура комплекса неактивного двойного мутанта АРЕ1 (Е96Q D210N) с нерасщепленным ДНК-субстратом с Т:G мисматчем с 5'-стороны от АР-сайта, а также структура комплекса АРЕ1 с аналогичным ДНК-продуктом эндонуклеазного расщепления. *Работа поддержана РФФ № 14-24-00038.*

ПОИСК ФУНКЦИИ ГИПОТЕТИЧЕСКОЙ МЫШИНОЙ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ WBSCR27

А.А. Чугунова, О.В. Сергеева, О.А. Петрова, А.А. Головина, И.А. Остерман, Ф.И. Плетнев, Т.И. Новолаев, В.Е. Котелянский, П.В. Сергиев, О.А. Донцова

Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; Сколковский институт науки и технологий, Московская область, Россия

Метилирование ДНК, РНК и белки часто играют важную роль как в изменении активности белков, так и в регуляции экспрессии генов. В последнее время стало очевидным, что модификация РНК столь же важна, как и модификация ДНК, обеспечивающая эпигенетическую регуляцию. Для исследования мы выбрали гипотетическую РНК метилтрансферазу WBSCR27. Известно, что делеция ее гена ассоциирована с синдромом Уильямса, редким генетическим нарушением, вызванным делецией участка, на котором находится около 26 генов и который расположен на длинном плече 7-й хромосомы (7q11.23) [1]. Для исследования мы решили использовать мышинный гомолог WBSCR27.

Мы проанализировали экспрессию гена *wbscr27* на уровне мРНК и белка в различных органах мыши. Он экспрессируется в большинстве органов, однако, наиболее высокий уровень экспрессии обнаруживается в почках и печени. С помощью флуоресцентной микроскопии было показано, что белок является цитоплазматическим. Для изучения функциональной роли WBSCR27 была создана нокаутная мышинная клеточная линия, а для изучения фенотипа *in vivo*, с помощью системы CRISPR/Cas9 были созданы линии мышей, в которых инактивирован ген *wbscr27*. На данный момент продолжается поиск функции и возможной мишени WBSCR27.

1. C. Schubert, "The Genomic Basis of the Williams-Beuren Syndrome," *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 66, no. 7 (April 2009): 1178–97, doi:10.1007/s00018-008-8401-y.

РОЛЬ ФРАГМЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК В РАЗВИТИИ АДАПТИВНОГО ОТВЕТА В СТЕЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ В МАЛЫХ ДОЗАХ

М.С. Конькова, Е.С. Ершова, Н.Н. Вейко, В.А. Сергеева, А.В. Ермаков, О.А. Долгих, Е.М. Малиновская, Л.В. Каменева, С.В. Костюк
Медико-генетический научный центр, Москва, Россия

При действии малых доз радиации в клетках регистрируется развитие адаптивного ответа, что приводит к резистентности клеток к воздействию последующего облучения. Мы предположили, что в развитии адаптивного ответа в стволовых клетках при действии малых доз радиации могут принимать участие фрагменты внеклеточной ДНК (вкДНК) погибших клеток. Мы обнаружили, что в составе вкДНК плазмы крови лиц, длительное время работающих с источниками ионизирующего излучения (ИИИ), накапливается ГЦ-обогащенная транскрибируемая область рибосомного повтора человека (рДНК), устойчивая к образованию двунитевых разрывов. Мезенхимные стволовые клетки (МСК) из коллекции ФГБНУ «МГНЦ» были охарактеризованы по поверхностным маркерам (HLA-ABC+, CD44+, CD54(low), CD90+, CD106+, CD29+, CD49b(low), CD105(low), CD34–, CD45–, HLA-DR–, CD117–). В качестве модельной ГЦ-обогащенной вкДНК использовали CrG-богатый фрагмент рДНК (участок от 515 до 5321 в соответствии с HSU13369, GeneBank), встроенный в вектор pBR322 (п(рДНК)). И малые дозы радиации (10 сГр), и добавление к среде культивирования МСК п(рДНК) в концентрации 50–100 нг/мл вызывает в МСК одинаковый ответ: стимулируется синтез активных форм кислорода в клетках в 2–3 раза по сравнению с контролем, окисление ДНК ядер клеток (повышено содержание 8-oxodG) и образование одно- и двунитевых разрывов ДНК ядер (определяемых методом комет) в течение первых 20–30 минут. Происходит остановка клеточного цикла в фазе G1/S, блокируется пролиферация (показано методом проточной цитофлуориметрии с использованием антител к Ki-67 и PCNA и методом ПЦР в реальном времени по уровню экспрессии генов CCND1, CDKN2 и CDKN1A, принимающих участие в регуляции клеточного цикла). В течение первых 3 часов возрастает экспрессия антиапоптотических генов (BCL2, BCL2A1, BCL2L1, BIRC2 и BIRC3) и гена BRCA1, принимающего участие в репарации двунитевых разрывов ДНК путем гомологичной рекомбинации. Через 3 часа в МСК наблюдается снижение количества разрывов ДНК до контрольных значений. Таким образом, и радиация, и ГЦ-богатые фрагменты вкДНК индуцируют в МСК одинаковый ответ: синтез АФК → окисление ДНК ядер → разрывы ДНК ядер → остановка клеточного цикла, снижение уровня апоптоза → активация репарации ДНК. *Работа поддержана грантом РФФИ №16-04-01099А.*

ЗЛОКАЧЕСТВЕННАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ ТЕЛОМЕРАЗЫ ЦИСПЛАТИНОМ

Д.А. Васина, Д.Д. Жданов, В.С. Орлова, Н.Н. Соколов *Российский университет дружбы народов; Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Лаборатория медицинской биотехнологии, Москва, Россия*

Теломераза является мультиферментативным комплексом, который синтезирует теломерные повторы на концах хромосом. Злокачественные опухолевые клетки, нормальные стволовые клетки и активированные лимфоциты обладают теломеразной активностью, что позволяет им поддерживать повышенный репликативный потенциал. Ингибирование теломеразы в

нормальных клетках вызывает укорочение теломер до критических значений, переход клеток в состояние репликативного старения и апоптоз. Ранее мы показали, что сверхэкспрессия апоптотической эндонуклеазы EndoG вызывает альтернативный сплайсинг каталитической субъединицы теломеразы hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) и ингибирует ее активность. Известно, что экспрессия EndoG увеличивается в ответ на повреждения ДНК различными агентами. Целью работы явилось изучение влияния ДНК-повреждающего агента цисплатина на экспрессию EndoG и теломеразную активность в нормальных, не опухолевых клетках, а так же на дальнейшую судьбу клеток. CD4⁺ Т-клетки человека культивировали в присутствии цисплатина. ОТ-ПЦР в реальном времени и метод Вестерн блоттинга применяли для изучения экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT. Оценку активности теломеразы проводили методом TRAP (Telomeric Repeats Amplification Protocol). Методом проточной цитометрии проводили исследование иммунофенотипических характеристик клеток. Инкубация клеток с цисплатином приводила к увеличению в них экспрессии EndoG, увеличению экспрессии сплайс-варианта hTERT и уменьшению экспрессии полноразмерного активного варианта. Изменение пропорции сплайс-вариантов hTERT в клетках приводило к понижению активности теломеразы. Дальнейшее культивирование таких клеток приводило к их переходу в состояние репликативного старения и массивной гибели по пути апоптоза после 28–32 удвоений популяции. Однако, некоторые клетки в присутствии цисплатина оставались живыми, но не способными к делению. Исследование иммунофенотипа показало, что происходила их трансформация, приводящая к развитию фенотипических характеристик Т-клеточного лимфобластного лейкоза. Трансформированные CD4⁺ Т-клетки обладали значительно более высокой активностью теломеразы и пролиферативной активностью, чем исходные CD4⁺ Т-клетки.

ВЛИЯНИЕ НЕКАНОНИЧЕСКИХ СТРУКТУР ДНК НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ «МИСМАТЧЕЙ»

А.В. Гавшина¹, Н.А. Андреева¹, М.В. Монахова¹, А.М. Оглоблина², Н.Г. Долинная¹, Е.А. Кубарева¹

¹Химический факультет и НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова; ²НИИ канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина, Москва, Россия

Одной из основных задач системы репарации неканонических пар нуклеотидов или «мисматчей» (MMR) является поддержание генетической стабильности организма. Белки системы MMR взаимодействуют с ДНК-полимеразой и «исправляют ошибки», возникающие при репликации ДНК. К настоящему времени накопилась информация о том, что система MMR сама может выступать источником генетических ошибок. В частности, показано, что белки – компоненты системы MMR – способствуют экспансии повторяющихся участков ДНК. Последовательность нуклеотидных повторов обуславливает формирование неканонических структур ДНК, например, G-квадруплексов. Известно, что MutS из *E. coli* эффективно связывает ДНК, содержащую квадруплекс. Предполагается отсутствие инициации репарации в такой системе. Однако эта гипотеза не имеет экспериментального подтверждения. Также остается открытым вопрос о влиянии квадруплексов на другие белки системы MMR *E. coli*, в частности MutL и MutH. На первом этапе с помощью 22- и 41-звенных ДНК были сконструированы модели неканонических форм, фланкированные двойными спиралями. Для моделирования квадруплекса в одну из олигонуклеотидных цепей встраивался d(GGGT)₄-мотив, а в цепи, которая гибридизуется с ней, отсутствовала часть, комплементарная квадруплекс-образующей последовательности. Методами УФ-«плавления» и кругового дихроизма было показано, что в данной модели формируется параллельный G-квадруплекс, фланкированный дуплексными участками. На следующем этапе прямым олигонуклеотидным синтезом были получены флуоресцентно-меченные 95- и 76-звенные компоненты для формирования серии дуплексов, содержащих сайт расщепления MutH, вставку квадруплексного мотива и G/T-пару. Показано, что для моделирования функциональной ДНК со вставками неканонических форм оптимальным является состояние в 36 пар нуклеотидов (п.н.) от участка узнавания MutH до G/T-пары и 14 п.н. до конца дуплекса. Концентрация KCl, при которой наблюдался эффективный гидролиз ДНК (60%) под действием MutH (250 нМ) в присутствии белков MutS (250 нМ) и MutL (125 нМ), составляла 125 мМ. Таким образом, были сконструированы синтетические аналоги субстратов, формирующие G-квадруплекс, а также подобраны условия, при которых удается фиксировать инициацию начальных этапов репарации MMR.

МОДИФИКАЦИЯ РНК. ОТ ПОИСКА ФЕРМЕНТОВ К ПОНИМАНИЮ ФУНКЦИИ

П.В. Сергиев, И.А. Остерман, А.Я. Головина, О.В. Сергеева, М.В. Серебрякова, М.П. Рубцова, С.А. Евфратов, Ф.И. Плетнев, Е.С. Комарова, К.С. Петрюков, Д.В. Лесняк, Д.Е. Бураковский, И.В. Прохорова, М.М. Дзама, М.В. Нестерчук, А.А. Чугунова, О.А. Аверина, И.Г. Лаптев, А.В. Дейкин, О.В. Побегуц, В.М. Говорун, А.А. Богданов, О.А. Донцова

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Множество разновидностей РНК содержат модифицированные нуклеотиды. С усложнением организма возрастает и количество модификаций РНК. В нашей лаборатории были выявлены шесть новых генов РНК метилтрансфераз *E. coli*. После определения генов всех рРНК метилтрансфераз, с помощью методов, реконструирующих отдельные стадии трансляции *in vitro*, а также методов протеомного анализа, была исследована функциональная роль рРНК метилтрансфераз в клетке бактерий. После изучения функционирования системы модификации РНК в бактериях, наша лаборатория начала изучение функциональной роли РНК метилтрансфераз мыши. Для этого гены РНК метилтрансфераз WBSCR27, KIAA1456 и NSUN7 были инактивированы с помощью CRISPR/Cas9 системы в клеточной линии NIH3T3 мыши. С помощью микроинъекции в ооциты получены линии мышей с инактивированными генами перечисленных РНК метилтрансфераз. Проводится изучение функциональной роли этих генов.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ЭКСПРЕССИИ И ТЕСТИРОВАНИЯ БИОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВОГО ФЕРМЕНТА ЧЕЛОВЕКА – ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ И ДНК-ПРАЙМАЗЫ PRIMPOL

Е.О. Болдинова, Ш. Ванрой, А.В. Макарова Институт молекулярной генетики РАН, Москва; Московский технологический университет, Москва, Россия; Университет Умеа, Умеа, Швеция

Открытый в 2013 г. фермент PrimPol человека является специализированной ДНК-полимеразой, обладающей одновременно ДНК-полимеразной и ДНК-праймазной активностями. PrimPol играет важную роль в поддержании стабильности генома, так как осуществляет синтез через повреждения ДНК и ре-инициацию репликации после поврежденных участков. Рекombинантные препараты PrimPol человека, выделенные разными группами исследователей из клеток-продуцентов

Escherichia coli, проявляют неодинаковую, преимущественно слабую активность *in vitro*. С целью повышения биологической активности и улучшения фолдинга PrimPol мы использовали разные штаммы *E. coli* (BL21, Rosetta 2 и Arctic Express-pRIL) в качестве бактериальных клеток-продуцентов, а также осуществили продукцию белка в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. Экспрессию PrimPol в клетках *E. coli* проводили при низкой температуре роста культуры (12–19°C). Очистку PrimPol человека, слитой на N-конце с GST-тагом, осуществляли с помощью аффинной хроматографии с глутатион-сефарозой. Выход очищенного препарата PrimPol составил примерно 1 мг белка с литра культуры бактериальных клеток и менее 0,01 мг белка с литра культуры клеток дрожжей. Препараты PrimPol, выделенные из разных штаммов клеток *E. coli*, обладали одинаковой ДНК-полимеразной активностью *in vitro* (тестирование PrimPol из клеток *S. cerevisiae* не проводилось). Нами были также определены оптимальные условия и биохимические параметры реакции для тестирования ДНК-полимеразной активности PrimPol человека *in vitro*. В ходе работы варьировали время проведения реакции, ионную силу и pH буферного раствора реакционной смеси. Было показано, что наибольшую ДНК-полимеразную активность фермент проявляет в диапазоне pH буфера 7.0–7.4. Оптимальный диапазон концентраций NaCl для PrimPol составляет 50–100 mM. Отсутствие NaCl в реакционной смеси и его концентрации выше 100 mM подавляют ДНК-полимеразную активность фермента. Показано, что PrimPol человека обладает низкой стабильностью *in vitro*. Активность PrimPol падает в два раза после 10 мин инкубации при 37°C. Таким образом, оптимальное время проведения ДНК-полимеразной реакции PrimPol при 37°C составляет 2,5–10 мин. Исследование выполнено при поддержке Программы Президиума РАН МКБ «Новые группы» и фонда Д. Зимины «Династия».

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ПРОКАРИОТАХ С ПОМОЩЬЮ МАЛЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ 6S РНК

О.Ю. Буренина¹, Е.А. Елкина¹, Р.К. Хартманн², Т.С. Орецкая¹, Е.А. Кубарева¹

¹Химический факультет и НИИ физико-химической биологии им.А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

²Институт фармацевтической химии, Университет им.Филиппа, Марбург, Германия

6S РНК принадлежат малочисленной группе некодирующих РНК (нкРНК), которые могут взаимодействовать с белками и изменять их активность. Мишенью 6S РНК является бактериальная РНК-полимераза (РНКП), связываясь с активным центром которой, 6S РНК блокирует доступ к промоторам ДНК. В результате наступает масштабное ингибирование транскрипции в клетке. РНКП может освобождаться от 6S РНК, используя ее как матрицу для транскрипции коротких пРНК длиной ~20 нуклеотидных остатков. Ген 6S РНК обнаружен практически во всех бактериях, однако, только для двух десятков видов имеются экспериментальные свидетельства его экспрессии в клетке, а детальное изучение свойств 6S РНК проводилось только в *E. coli*. Предполагается, что 6S РНК «архивирует» активную РНКП при переключении клеточного метаболизма в стационарной фазе роста. Однако в некоторых видах прокариот в экспоненциальной фазе или в других благоприятных условиях синтезируется альтернативная 6S-2 РНК, функции которой были неизвестны. В данной работе изучались свойства и функции 6S РНК из различных бактерий. Впервые была проведена сравнительная характеристика 6S-1 РНК и 6S-2 РНК из *B. subtilis* и доказано, что обе нкРНК обладают всеми характерными особенностями 6S РНК: связывают РНКП, ингибируют транскрипцию *in vitro*, служат матрицами для синтеза пРНК *in vitro* и *in vivo*, а делеции их генов приводят к масштабным изменениям в клеточном транскриптоме и протеоме. Было обнаружено, что 6S-1 и 6S-2 РНК ингибируют синтез различных стрессовых белков и ферментов, участвующих в метаболизме углерода. Это послужило отправной точкой к изучению поведения разных бактерий с делециями генов 6S РНК в экстремальных условиях. Так, было показано, что отсутствие 6S-1 РНК (и в меньшей мере 6S-2 РНК) дает *B. subtilis* серьезное преимущество по сравнению с диким типом при культивировании в щелочных условиях. Клетки фотосинтетической *R. sphaeroides* без 6S РНК оказались чувствительны к солевому стрессу. Таким образом, были получены экспериментальные свидетельства участия 6S РНК в регуляции экспрессии различных генов и ее важность для разных бактерий. Работа поддержана Российским научным фондом (грант 14-24-00061).

СТРУКТУРА 70S И 100S РИБОСОМ ПАТОГЕННОЙ БАКТЕРИИ STAPHYLOCOCCUS AUREUS

И. Хусаинов^{1,2}, Р. Аюпов², К. Висанс³, А. Бошлер³, Ф. Гросс³, А. Мясников¹, С. Марзи³, П. Ромби³, Г. Юсупова¹, Я. Хашем³,

М. Юсупов^{1,2} ¹Институт генетики, молекулярной и клеточной биологии Иллиш, Франция; ²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия; ³Институт молекулярной и клеточной биологии Страсбург, Франция

За последние годы накоплено значительное количество данных о структуре белок-синтерзирующей молекулярной машины бактерий – рибосомы. Основная часть исследований в этой области была сфокусирована на грам-отрицательных бактериях, таких как *Thermus thermophilus* и *Escherichia coli*, в то время как грам-положительным бактериям было уделено гораздо меньше внимания. Однако последние имеют свои особенности структуры рибосом, которые зачастую определяют их уникальные механизмы регуляции трансляции, стрессового ответа и устойчивости к антибиотикам. Грам-положительная бактерия *Staphylococcus aureus* является возбудителем широкого спектра заболеваний человека, при этом имеет чрезвычайно высокую устойчивость к антибиотикам. Известно, что *S. aureus* способен успешно переживать стрессовые условия путем образования 100S димеров рибосом при связывании с ними стресс-индуцируемого белка SaHPF (*S. aureus* hibernation promoting factor). Такие рибосомы не принимают участия в трансляции, но и не деградируются клеткой и могут быть быстро реактивированы после диссоциации белка SaHPF. Определение структуры рибосомы *S. aureus* позволит глубже понять механизмы регуляции синтеза белка грам-положительных бактерий в нормальных условиях и при стрессе. Методом крио-электронной микроскопии нами были решены структуры рибосом *S. aureus* в мономерной 70S и димерной 100S формах с разрешением 3,6 и 3,9 Å соответственно. Они демонстрируют структурные элементы, специфичные как для грам-положительных бактерий в целом, так и *S. aureus*, в частности. Среди них расположенные на периферии удлинённые участки спиралей рРНК (h6, h9, h26, H10, H54 и др.) и дополнительные мобильные элементы ряда белков, таких как uS12, bL17 и bL31. Подобные участки могут координировать связывание специфических лигандов, влияющих на синтез белка в клетках. Отличительной особенностью димеров рибосом *S. aureus* является то, что они стабилизируются путем непосредственных контактов белков SaHPF-SaHPF и спиралей рРНК h26-h26 каждой из рибосом. Представленные структуры рибосом *S. aureus* демонстрируют особенности организации аппарата белкового синтеза, напрямую влияющие на регуляцию синтеза белка *S. aureus*. В будущем структура рибосомы как мишени антибиотиков послужит основой для создания противостафилококковых лекарственных препаратов.

РИБОСОМА В ПРОЦЕССЕ ТРАНСЛОКАЦИИ: ТЕРМОДИНАМИКА И КИНЕТИКА

А.Л. Конева *Петербургский институт ядерной физики, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина; Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*

Рибосома осуществляет синтез полипептидов, последовательно присоединяя аминокислоты в соответствии с информацией, закодированной в матричной РНК. Каждый раунд удлинения полипептидной цепи завершается реакцией транслокации, т. е. синхронным передвижением матричной РНК (мРНК) на один кодон одновременно с перемещением деацилированной тРНК из Р в Е сайт, и пептидил-тРНК из А в Р сайт. В бактериальной белоксинтезирующей системе транслокация катализируется элонгационным фактором EF-G и сопровождается гидролизом GTP, обеспечивая высокую скорость биосинтеза белка при поддержании рамки считывания. Ранее было показано, что в присутствии EF-G и GTP для некоторых тРНК транслокация может проходить в обратном направлении [1]. Направление транслокации зависит от термодинамического градиента, определяемого различными аффинностями тРНК к А, Р и Е сайтам рибосомного комплекса. Исследования спонтанной обратной транслокации биохимическими и структурными методами показали сопряженность перемещений тРНК в межсубъединичном пространстве с конформационными изменениями рибосомы [2]. Использование некорректно аминокислотированных пептидил-тРНК в пре- и пост-транслокационных рибосомных комплексах позволило продемонстрировать, что именно тРНК, а не аминокислота, определяет специфическую способность отдельных пептидил-тРНК к эффективной обратной транслокации. Пептидилтрансферная реакция меняет аффинность тРНК к А и Р сайтам, изменяя термодинамический профиль рибосомного комплекса перед последующей реакцией транслокации. Связывание элонгационного фактора EF-G-GTP с рибосомой приводит к универсальной быстрой прямой реакции транслокации вне зависимости от свойств конкретных тРНК в рибосомном комплексе. *Работа поддержана грантом РФФИ 14-34-00023*

1. Koneva, A.L., Fischer, N., et al (2007) *Nat Struct Mol Biol*, 14, 318. 2. Fischer, N., Koneva, A.L., et al (2010) *Nature*, 466, 329. 3. Semenov, Y.P., Rodnina, M.V., and Wintermeyer, W. (2000). *Nat Struct Biol*, 7, 1027.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ TREX-2-ORC КОМПЛЕКСА ДРОЗОФИЛЫ С КОМПОНЕНТАМИ МРНК ЧАСТИЦЫ

В.В. Попова, А.А. Глухова, М.М. Куршакова, А.В. Бречалов, Д.В. Копытова *Институт биологии гена РАН, Москва, Россия*

В данной работе мы показали, что комплекс экспорта мРНК TREX-2 осуществляет свои функции только в ядре. С использованием метода соосаждения РНК, который позволяет выборочно извлекать комплекс РНК-белок из образца, мы показали, что комплекс элонгации транскрипции TREX взаимодействует с мРНК гена tubulin56D на всем протяжении. Белок экзирования – Cbr80, кроме структуры кэпа, взаимодействует с последовательностью мРНК гена tubulin56D, соответствующей участку кодирующей части мРНК. С этим же фрагментом РНК обнаруживает связывание комплекс экспорта мРНК из ядра в цитоплазму – TREX-2. Таким образом, мы локализовали место на мРНК гена tubulin56D, с которым происходит связывание всех рассматриваемых комплексов. Также, наши данные показали, что белки комплекса TREX-2 взаимодействуют с белками комплексов CBC и THO – Cbr80 и Thoc5 соответственно, а также с белком Nxf1 в реакциях иммунопреципитации. Мы предполагаем, что упакованная в определенную структуру мРНК гена tubulin56D привлекается к TREX-2 комплексу через взаимодействие со всеми этими факторами, которые образуют мегакомплекс. Этот мегакомплекс взаимодействует с различными частями мРНК, которые пространственно сближены. В другой части работы мы исследовали прямое связывание некоторых белков комплексов TREX-2 и ORC с фрагментами мРНК гена gas2 с использованием метода EMSA. Ранее мы показали, что белки этих двух комплексов взаимодействуют с мРНК гена gas2 в реакциях иммунопреципитации РНК (RIP-CHIP). Белки Xmas-2, PCID2, Orc3 были слиты с GST-эпитопом, экспрессированы в бактериальной системе и очищены с помощью глутатион-сефарозы. Мы показали, что белки Xmas-2, PCID2, Orc3 напрямую взаимодействуют с мРНК гена gas2. Мы не обнаружили значительной специфичности связывания белков Xmas-2 и Orc3 с каким-либо фрагментом мРНК гена gas2 и, скорее всего, белки Xmas-2 и Orc3 не определяют место посадки комплекса на мРНК, а отвечают за усиление взаимодействия РНК-связывающих комплексов ORC и TREX-2 с мРНК. При исследовании взаимодействий белка PCID2 с фрагментами мРНК гена gas2 мы выявили специфическое связывание этого белка с фрагментом мРНК гена gas2, соответствующим 3'-некодирующей области гена. Таким образом, мы показали, что возможно именно этот белок отвечает за узнавание места посадки комплекса TREX-2-ORC на мРНК.

БЕЛКИ AMEX-ORC КОМПЛЕКСА УЧАСТВУЮТ В ПРОЦЕССИНГЕ МРНК ГЕНОВ ГИСТОНОВ

М.М. Куршакова, Д.В. Копытова, С.Г. Георгиева *Институт биологии гена РАН, Москва, Россия*

Ранее был выделен комплекс AMEX-ORC из ядерного эмбрионального экстракта дрозофилы. В состав комплекса были найдены белки Orc2, Orc3, Orc4, Orc5, Orc6, которые входят в состав ORC комплекса дрозофилы, а также компоненты AMEX комплекса, участвующего в экспорте мРНК из ядра, — белки Ey2, Xmas2, PCID2. AMEX-ORC комплекс взаимодействует с РНК-частицей на поздних стадиях транскрипции мРНК, ассоциирован с ядерной порой и влияет на экспорт мРНК из ядра. С целью поиска генетической системы, которая может служить моделью для изучения функций AMEX-ORC комплекса, был проведен поиск генетических локусов, в которых присутствуют белки AMEX-ORC и определено их транскрипционное состояние. Обнаружено, что белки AMEX-ORC локализуются на хроматине в транскрипционно-активном локусе, соответствующем кластеру генов гистонов. При помощи совместного иммуноокрашивания антителами против Orc5 и FISH *in situ* гибридизации с пробой к U7 РНК, являющейся маркером HLB, показано, что Orc5 присутствует в HLB тельцах (histone locus body). Методами иммуноосаждения мРНК частиц из ядерного экстракта S2 клеток при помощи антител против белков AMEX-ORC и соосаждения белков AMEX-ORC из ядерного экстракта S2 клеток за РНК зонд, соответствующий мРНК гистона H3, показано, что белки AMEX и ORC комплексов взаимодействуют с мРНК гистоновых генов и входят в состав мРНК частицы гистона H3. Были подобраны условия для получения клеток, в которых гены гистонов активно транскрибируются. Было обнаружено, что уменьшение уровня экспрессии белков AMEX-ORC в результате РНК-интерференции приводит к уменьшению уровня мРНК генов гистонов по отношению к контрольному эксперименту. Определены участки мРНК гистона H3, с которыми связываются белки AMEX-ORC комплекса и белки процессинга CPSF73, CPSF100 в ядерном клеточном экстракте. Методом иммуноосаждения найдено взаимодействие между белками AMEX-ORC и белками, участвующими в процессинге. Методом Northern-блот анализа показано, что снижение уровня экспрессии белков AMEX-ORC приводит к на-

рушению процессинга гистоновой мРНК и появлению длинных непротрансценсированных форм мРНК. Можно предположить, что белки AMEX-ORC входят в состав комплекса, каким-либо образом координирующего отрезание 3'-хвоста транскрипта гистона H3 CPSF73 экзонуклеазой в составе процессивного комплекса.

**РНК-ПОЛИМЕРАЗА И УНИКАЛЬНЫЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ РАДИОУСТОЙЧИВОЙ БАКТЕРИИ
*DEINOCOCCUS RADIO DURANS***

Д.М. Есюнина¹, А.А. Агапов^{1,2}, А.В. Игнатов^{1,2}, Н.А. Миропольская¹, А.В. Кульбачинский¹

¹Институт молекулярной генетики РАН; ²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Бактерия *Deinococcus radiodurans* обладает исключительно высокой устойчивостью к действию ионизирующей радиации, обезвоживанию и другим стрессовым воздействиям. Несмотря на интенсивные исследования, до настоящего времени не найдено уникальных механизмов, обеспечивающих высокую стрессоустойчивость *D. radiodurans*. В то же время, особенности структуры и функций РНК-полимеразы (РНКП), а также механизмы регуляции транскрипции у *D. radiodurans* исследованы недостаточно. В нашей работе показано, что РНКП *D. radiodurans* обладает высоким уровнем РНК-корректирующей активности, что может играть важную роль в транскрипции поврежденной ДНК. Получены мутации в активном центре РНКП *D. radiodurans*, влияющие на расщепление РНК и изменяющие эффективность прохождения поврежденных участков ДНК-матрицы. Впервые выделены и исследованы транскрипционные факторы *D. radiodurans*, в том числе, уникальные белки Gfh, которые способны напрямую влиять на работу активного центра РНКП. Установлено, что данные белки ингибируют инициацию транскрипции, а также стимулируют формирование пауз на стадии элонгации и усиливают терминацию транскрипции. Ингибирующий эффект этих белков на работу РНКП многократно усиливается в присутствии ионов марганца, которые накапливаются в клетках *D. radiodurans* в стрессовых условиях. Таким образом, обнаруженный нами механизм регуляции активности РНКП может обеспечивать избирательное «выключение» транскрипции в условиях стресса и способствовать репарации и репликации ДНК. Работа выполнена при поддержке грантов РФ № 14-14-01074 и РФФИ № 16-34-60237.

**СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ Sm-ПОДОБНЫХ БЕЛКОВ:
ОТ БАКТЕРИАЛЬНЫХ Hfq К АРХЕЙНЫМ SmAP**

А.Д. Никулин, Н.В. Леконцева, А.О. Михайлина, Е.Ю. Никонова, О.В. Кравченко, В.А. Балобанов, С.В. Тищенко

Институт белка РАН, Пушкино, Россия

Sm и Sm-like (Lsm) белки являются одним из уникальных классов белков, представленных как в бактериях, так и в эукариотах и археях. Принадлежность к этому семейству определяется наличием консервативного структурного Sm-фолда, состоящего из N-концевой α -спирали и пяти β -тяжей. Все белки этого семейства взаимодействуют с РНК, однако функции белков в различных организмах различаются. Бактериальные Lsm белки, называемые Hfq, принимают участие в регуляции транскрипции и трансляции различных мРНК, способствуя взаимодействию с ними регуляторных РНК. Эукариотические Sm/Lsm белки участвуют в формировании сплайсосомы и декэпировании мРНК. Функция архейных Lsm белков пока достоверно не установлена, хотя имеются данные об их возможном участии в процессинге ряда РНК. Конечной целью нашей работы и является определение роли этих белков в клетках архей. Для проведения структурно-функциональных исследований РНК-связывающих свойств Sm-подобных архейных белков нами выбраны SmAP белки из *Methanococcus jannaschii*, *Methanococcus vannielii*, *Haloarcula marismortui*, *Sulfolobus solfataricus*. Были получены кристаллы этих белков, определена их пространственная структура в свободном состоянии и в комплексах с рибонуклеотидами, что позволяет проанализировать РНК-связывающие свойства SmAP белков на структурном уровне. Определено сродство белков к рибонуклеотидам и к ряду РНК-мишеней. Изучается способность исследуемых белков плавить вторичную структуру РНК. На основе полученных результатов сделаны выводы о значительном отличии РНК-связывающих свойств архейных SmAP белков по сравнению с их бактериальными гомологами – белками Hfq. Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-14-00496).

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS: ТРАНСКРИПТОМИКА ЛАТЕНТНОГО СОСТОЯНИЯ

Т.Л. Ажикина, А.С. Капрельянц, А.С. Апт

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Жизненный цикл микобактерии в инфицированном организме проходит через несколько стадий – непосредственно инфицирование и развитие болезни – переход в латентное состояние, характеризующееся наличием жизнеспособных бактерий со сниженным уровнем репликации, выход из латентного состояния – рецидивирующий туберкулез. Спектр проявлений инфекции зависит как от особенностей иммунного ответа хозяина на патоген, так и от способности микобактерий противостоять этому ответу. Целью исследования являлся анализ изменений транскриптома *M. tuberculosis* в покоящемся состоянии *in vitro* и в условиях хронической инфекции, протекающей в мышцах с различной резистентностью к туберкулезу. Покоящиеся клетки *M. tuberculosis* в модели *in vitro* характеризуются глобальным снижением содержания белок-кодирующих транскриптов. Нами впервые показано, что транскриптом покоящихся клеток стабилен на протяжении длительного времени. Возможно, «запасенные» транскрипты могут быть использованы микобактериями при последующей реактивации. В состоянии покоя существенно повышается доля транскриптов белков клеточной стенки, систем «токсин-антитоксин» и биосинтеза витамина B12; обнаружены мРНК, кодирующие ферменты биосинтеза, белки адаптации, репарации, детоксикации, контроля и инициации транскрипции. Впервые показано существование нового сайта разрезания 23S рРНК, которое, по-видимому, осуществляется одной из систем «токсин-антитоксин», широко представленных в геноме *M. tuberculosis*. Этот механизм замедления трансляции может участвовать в установлении и поддержании состояния покоя. Выявлено высокое содержание транскриптов некодирующих малых РНК MTS0997, MTS1338, MTS2823 в покоящихся бактериях, а также в моделях реактивации инфекции на мышцах. Анализ экспрессии этих малых РНК в динамике реактивации показал резкое увеличение их количества, несмотря на неспособность микобактерий к колониеобразованию. Таким образом, в латентном состоянии с подавленным бактериальным метаболизмом происходит активный синтез малых РНК, что может свидетельствовать об их важной роли в ответе бактерий на иммунный ответ хозяина. Работа поддержана Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и грантом РФФИ № 15-04-04563-а.

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ГЕНА СФИНГОМИЕЛИНСИНТАЗЫ 1 ЧЕЛОВЕКА (SGMS1) И КОДИРУЕМЫХ ИМ ТРАНСКРИПТОВ С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ RNA CAPTURESEQ

И.Б. Филиппенков, Л.В. Дергунова, С.А. Лимборская *Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия*

Ген SGMS1 кодирует фермент сфингомиелинсинтазу 1 (SMS1), который участвует в регуляции липидного метаболизма, апоптоза, внутриклеточного везикулярного транспорта и других значимых процессов. Ген SGMS1 локализован на 10 хромосоме и имеет размер 320 т.п.н. Ранее мы показали, что ген SGMS1 в различных тканях человека обеспечивает синтез десятков альтернативных транскриптов. Помимо мРНК, обеспечивающих синтез белка SMS1, ген участвует в синтезе некодирующих циклических РНК, которые включают экзоны 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) и высоко представлены в мозге. Функции таких транскриптов до конца не выяснены, однако РНК этого класса являются очень перспективными объектами для исследований. Настоящая работа посвящена детальному изучению структуры и экспрессии гена SGMS1 человека с помощью технологии высокопроизводительного секвенирования «RNA CaptureSeq». Получение образцов для «RNA CaptureSeq» основано на обогащении РНК искомыми транскриптами с помощью зондов Agilent SureSelect, специфичных последовательности гена SGMS1. Анализ полученных результатов позволил выявить множество новых транскриптов, которые картируются в области интронов гена SGMS1 и являются некодирующими РНК. Они представляют собой как несплайсированные интронные транскрипты, так и РНК, подвергающиеся альтернативному сплайсингу. В работе выявлены новые варианты альтернативного сплайсинга экзонов гена SGMS1, а также обнаружено 4 новых экзона, которые могут принимать участие в рекурсивном сплайсинге длинных интронов в 5'-НТО гена. Два из этих экзонов участвуют в образовании циклических РНК, что может определять их функциональное значение. Полагаем, что детальное изучение структуры гена SGMS1 и кодируемых им транскриптов приблизит нас к пониманию механизмов регуляции функционирования данного гена, а также других эукариотических генов. *Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (16-04-00488; 16-34-00653), Программы Российской академии наук «Молекулярная и клеточная биология».*

РОЛЬ РАЙОНА 3.2 СИГМА-СУБЪЕДИНИЦЫ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ В ИНИЦИИИ ТРАНСКРИПЦИИ НА ПРОМОТОРАХ ГЕНОВ РРНК

Д.В. Пупов, Д.М. Есюнина, А.В. Кульбачинский *Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия*

Бактериальные РНК-полимеразы (РНКП) используют для инициации синтеза РНК и узнавания промоторов дополнительные белковые факторы. Сигма-субъединица РНКП играет главную роль в процессе узнавания промоторов, а также на более поздних стадиях инициации транскрипции, включая инициацию синтеза РНК, уход РНКП с промотора и образование промотор-проксимальных пауз транскрипции. Ранее мы показали, что в данных процессах участвует район 3.2 сигма-субъединицы, который позиционирует матричную цепь ДНК в активном центре РНКП, стимулирует связывание инициаторных NTP (iNTP), а на поздних стадиях инициации облегчает диссоциацию сигма-субъединицы за счет взаимодействий с синтезируемой РНК. В данной работе нами исследована роль района 3.2 во взаимодействиях РНКП с промотором *gtnBP1* генов рибосомальных РНК. Особенностью данного промотора является то, что он формирует с РНКП крайне нестабильные комплексы и, как было показано, эффективность транскрипции на нем зависит от концентрации первого инициаторного нуклеотида (АТР), что обеспечивает снижение активности промотора в стационарной фазе роста. Кроме того, данный промотор подвергается регуляции по механизму строгого контроля с участием транскрипционного фактора DksA и алармона ppGpp. Нами показано, что мутации в районе 3.2 сигма-субъединицы РНКП значительно увеличивают стабильность комплексов РНКП с *gtnBP1*-промотором. При этом значения кажущихся констант Михаэлиса (KM) для iNTP на данном промоторе незначительно изменяются при мутациях в районе 3.2 сигма-субъединицы. С другой стороны, замены и делеции в районе 3.2 сигма-субъединицы влияют на эффективность подавления транскрипции фактором DksA и ppGpp как *in vitro*, так и *in vivo*. Это позволяет сделать вывод, что район 3.2 сигма-субъединицы играет ключевую роль в образовании нестабильных комплексов РНКП с промотором *gtnBP1* и в регуляции синтеза рРНК на различных стадиях роста клеток. *Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых-кандидатов наук (МК-9567.2016.4).*

СТРУКТУРА N-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ТЕЛОМЕРАЗЫ ДРОЖЖЕЙ *OGATAEA PARAPOLYMORPHA*

Е.В. Родина¹, О.А. Петрова², А.Б. Манцызов³, J. Kallio⁴, М.Э. Зверева¹, С. Hackenberg⁴, T. Wiegels⁴, С.В. Ефимов⁵, В.С. Ламзин⁴, В.И. Польшаков³, О.А. Донцова^{1,2}

¹Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова;

³Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; ⁴European Molecular Biology Laboratory, Hamburg, Germany; ⁵Институт физики, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Теломераза – это особый вид обратной транскриптазы, который служит для поддержания длины теломерных участков на концах эукариотических хромосом. Каталитическая субъединица теломеразы состоит из белкового компонента (TERT) и РНК (TR). В клетках высших эукариот теломеразная активность строго регулируется; отклонения от нормы обнаруживаются при ряде патологических состояний, в том числе в большинстве видов рака. TERT из термотолерантных дрожжей *Ogataea parapolymorpha* служит адекватной моделью для характеристики основных закономерностей структурной организации теломеразы. В данной работе мы представляем атомную структуру N-концевого домена TERT из *O. parapolymorpha* (орTEN), определенную с использованием двух взаимодополняющих подходов: рентгеновской кристаллографии и ЯМР-спектроскопии. Ранее было показано, что TEN критически важен для функционирования теломеразы: его делеция вызывает значительные последствия, вплоть до полной потери теломеразной активности и/или процессивности. Кристаллическая структура орTEN была решена с разрешением 2.3 Å. Белок уложен в глобулу, содержащую α-спирали и β-тяжи. Общая архитектура глобулы схожа с таковой в TEN из *Tetrahymena thermophila* (ttTEN, pdb ID 2b2a), несмотря на низкую идентичность их последовательностей (<30%). Сравнение двух белков показывает, что наиболее хорошо накладывается (rmsd 0.4 Å) центральный структурный мотив (остатки 100-123 орTEN). Длина и положение C- и N-концевых фрагментов цепи, а также некоторых других элементов структуры не совпадает в двух белках.

Структура орTEN в растворе была также установлена методом ЯМР, что позволило определить конформацию фрагментов белковой цепи, которые не видны в кристаллической структуре. Помимо структурированного ядра и неструктурированного С-концевого фрагмента, орTEN содержит также подвижную петлю (остатки 71-99), в середине которой расположена α -спираль. Множественное выравнивание последовательностей TEN демонстрирует, что конформация петли, обнаруженная в орTEN, может быть типичной и для других организмов, включая человека.

Анализ динамических свойств белковой цепи и предварительные результаты молекулярного докинга фрагментов РНК и ДНК в структуру орTEN позволяют высказать гипотезу, согласно которой, роль TEN домена в функционировании TERT может заключаться в ограничении длины участка гибридного ДНК/РНК дуплекса, получаемого после синтеза теломерного повтора. *Исследование выполнено при поддержке РФФИ (грант 15-54-74005).*

ФАКТОРЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ ЭФФЕКТИВНУЮ ТЕРМИНАЦИЮ ТРАНСЛЯЦИИ ЭУКАРИОТ

Е.З. Алкалаева, Д.С. Сусоров, Т.В. Михайлова, А.В. Иванов, Е.Ю. Шувалова, А.В. Шувалов

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Было показано, что оверэкспрессия факторов трансляции не влияет на скорость белкового синтеза и скорость роста клеток дрожжей. Единственным исключением является фактор терминации трансляции eRF1, двукратное увеличение концентрации которого приводит как к увеличению скорости трансляции, так и к усилению роста клеток. А уменьшение его концентрации резко снижает скорость трансляции. Это указывает на то, что количество eRF1 в клетках строго лимитировано, хотя вероятно является оптимальным для баланса между нормальной терминацией и реинициацией или NMD. Наши эксперименты в *in vitro* системе демонстрируют, что основные факторы терминации eRF1 и eRF3 работают довольно медленно. Таким образом, в клетке должны быть дополнительные факторы (РНК или белки), увеличивающие эффективность этого процесса. Возможны несколько путей оптимизации терминации: прямая активация ферментативной активности факторов терминации, увеличение констант их связывания с рибосомой, а также стабилизация промежуточных состояний терминационных комплексов. Нами обнаружены белки и РНК, активирующие терминацию всеми тремя путями. Так мы показали, что деацилированная tРНК и РНК хеликаза DDX19 независимо стабилизируют рибосомные терминационные комплексы и тем самым активируют терминацию трансляции. Поли(А)-связывающий белок PABP увеличивает эффективность терминации другим путем. Он улучшает позиционирование фактора eRF3 в терминирующей рибосоме. Кроме того, нами выявлены еще ряд белков, которые вероятно усиливают ферментативные свойства факторов терминации.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-14-00487.

ПАТТЕРН ЭКСПРЕССИИ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СУБТЕЛОМЕРНОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ОТРЯДА GALLIFORMES

И.Л. Трофимова, Д.А. Попова, Д. Б. Червякова, А.В. Красикова

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Некодирующие РНК принимают участие во многих процессах, происходящих в эмбриогенезе, дифференцированных клетках взрослого организма и при онко-трансформации, участвуют в сплайсинге, полиаденилировании, экспорте РНК в цитоплазму. Данная работа посвящена исследованию транскрипции, паттерна распределения и функциональной значимости транскриптов субтеломерного tandemного повтора PO41 (pattern of 41 bp) у представителей отряда Galliformes. С помощью РНК *in situ* гибридизации и ОТ-ПЦР мы показали транскрипцию обеих нитей повтора в ранних эмбрионах курицы, соматических тканях курицы и японского перепела, трансформированной клеточной линии MDCC-MSB1 и культивированных эмбриональных фибробластах курицы. Паттерн распределения некодирующей РНК PO41 был идентичен во всех проанализированных образцах. Транскрипты формируют 1–3 кластера в эухроматине, прилегающих к хромоцентрам, а также образуют диффузный сигнал, распределенный по интерхроматиновому пространству ядра. Синтезируемые транскрипты преимущественно одноцепочечные. С помощью иммуно-FISH мы показали, что транскрипция повтора происходит при участии РНК-полимеразы II, а образующиеся транскрипты не колокализуются с тельцами Кахала, ядерными стресс-тельцами и ядерными «спеклами». На клетках линии MDCC-MSB1, культивируемых эмбриональных фибробластах и ранних эмбрионах курицы показано, что РНК PO41 сохраняется при делении клеток, распределяясь между хромосомами в начале митоза, выстраиваясь преимущественно в экваториальной плоскости делящейся клетки к анафазе и прилегая к хромосомам на стадии телофазы. Идентичный паттерн транскрипции и распределения транскриптов повтора PO41 в ядрах клеток и в ходе митотического цикла в проанализированных образцах указывают на возможную регуляторную роль некодирующих РНК PO41. Транскрипция обеих нитей повтора не исключает образование двуцепочечных форм, которые в дальнейшем могут принимать участие в Discer-зависимом механизме образования гетерохроматина. Использование клеток линии DT40 курицы, нокаутных по ферменту Discer, а также технологии антисмысловых олигонуклеотидов (ASO) поможет оценить роль транскриптов PO41. *Работа выполнена при поддержке ресурсного центра «Хромас» и «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Санкт-Петербургского государственного университета.*

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ БЕЛКА, КОДИРУЕМОГО ТЕЛОМЕРАЗНОЙ РНК ЧЕЛОВЕКА

М.П. Рубцова, Ю.В. Нарайкина, Д.В. Василькова, М.Б. Меерсон, И.О. Бутенко, О.В. Побегуц, В.М. Говорун, О.А. Донцова

Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия

Теломераза является одним из основных участников системы поддержания длины теломер в клетках эукариот. Теломераза содержит два коровых компонента, необходимых для ее функционирования. Теломеразная обратная транскриптаза осуществляет синтез новых теломерных повторов, используя в качестве матрицы теломеразную РНК. Теломераза активна в половых, стволовых, некоторых типах быстро-пролиферирующих клеток, а также раковых клетках. Активация теломеразы обусловлена экспрессией гена теломеразной обратной транскриптазы, тогда как теломеразная РНК синтезируется в большинстве типов клеток постоянно, что позволяет предполагать, что эта РНК может осуществлять дополнительные функции. Известно, что экспрессия теломеразной РНК, неспособной образовывать комплекс с теломеразной обратной транскриптазой, защищает клетки от апоптоза. Мы обнаружили кодирующую способность теломеразной РНК человека. Белок hTERP (human

Telomerase RNA Protein) состоит из 121 аминокислоты и содержит SH3-связывающий домен, что позволяет предполагать его взаимодействие с белками участниками сигнальных каскадов, регулируемых рецепторами тирозин-киназами. Экзогенная экспрессия теломеразной РНК дикого типа, но не мутантных по инициаторному кодону форм, приводит к нечувствительности клеток к доксорубин- и этопозид-индуцированному апоптозу, что позволяет предполагать анти-апоптотическую роль белка hTERP. Работа выполняется при финансовой поддержке гранта РФФИ 16-14-10047.

миРНКазы: ПЕПТИДИЛ-ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ СЕЛЕКТИВНО ИНГИБИРУЮЩИЕ miR-21

О.А. Патутин¹, С.К. Мирошниченко¹, Н.Л. Миронова¹, Е.В. Биченкова², М.А. Баженов¹, Д.В. Пышный¹, В.В. Власов¹, М.А. Зенкова¹ ¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия; ²Университет Манчестера, Манчестер, Великобритания

За последнее десятилетие было показано, что некодирующие РНК, в частности миРНК, функционируют как активные регуляторы экспрессии генов и связаны с развитием разнообразных патологических процессов, включая онкологические заболевания различной этиологии. Более того, было показано, что миРНК представляют собой перспективную молекулярную мишень для терапевтических препаратов. По этой причине усилия научного сообщества сосредоточены на поиске эффективных способов модуляции нарушенной экспрессии разнообразных миРНК. Прямым подходом к регулированию количества миРНК в опухолевых клетках может быть создание искусственных сайт-направленных рибонуклеаз. В данной работе были сконструированы новые пептидил-олигонуклеотиды – сайт-направленные искусственные рибонуклеазы – и изучена возможность специфического взаимодействия таких сложных молекул с различными РНК и миРНК. миРНК-направленные пептидил-олигонуклеотиды – миРНКазы представляют собой конъюгаты короткого пептида, состоящего из чередующихся пар остатков лейцина и аргинина, с линейным или шпилечным олигонуклеотидом, содержащим последовательность, комплементарную зрелой миРНК. Исследование рибонуклеазной активности серии миРНКаз с использованием в качестве мишени про-онкогенной miR-21, избыточно экспрессирующейся в большинстве опухолей, показало, что миРНКазы вызывают высокоэффективное сайт-направленное расщепление miR-21 исключительно по G-X связям. На клетках лимфосаркомы мыши RLS-40 было показано, что миРНКазы селективно ингибируют miR-21 и способствуют снижению пролиферативной активности опухолевых клеток. Таким образом, впервые созданы специфические к миРНК искусственные рибонуклеазы, эффективно подавляющие онкогенную миРНК в опухолевых клетках. Полученные данные указывают на то, что миРНКазы могут быть выступать в качестве новых перспективных кандидатов для разработки лекарственных препаратов, направленных на преодоление избыточной экспрессии миРНК, связанной с онкопатологиями. Данная работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 14-44-00068, РФФИ 14-04-01007а и «Ведущие научные школы» НШ-7623.2016.4.

МИНИГЕН turboGFP ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОЦЕССИНГА ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ микроРНК В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Л.И. Патрушев¹, Л.К. Даянова¹, И.А. Шилов² ¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

МикроРНК (миРНК) представляют собой короткие рибонуклеотидные последовательности длиной 19–22 нт, участвующие в регуляции экспрессии эукариотических генов, в основном, на посттранскрипционном уровне. Более 40% из нескольких тысяч известных миРНК локализовано в интронах генов. Нарушения биосинтеза и функциональной активности многих миРНК часто ассоциированы с многофакторными заболеваниями человека, включая рак, аутоиммунные и нейродегенеративные патологии, а также тромбозы. В рамках исследования, направленного на поиск новых генетических маркеров, ассоциированных с тромбофилиями, нами биоинформатическими методами в интронах генов протромбина, а также природных антикоагулянтов – протеина С и протеина S было обнаружено 29 предполагаемых предшественников миРНК, высокотождественных известным природным предшественникам. Для подтверждения функциональной значимости выявленных последовательностей сконструирован миниген зеленого флуоресцирующего белка TurboGFP, содержащий искусственный интрон длиной в 61 п.н., введенный в ген *gfp*, находящийся под контролем цитомегаловирусного промотора в составе экспрессирующей плазмиды pTurboGFP-N (Евроген, Россия). Такой компактный интрон содержал канонические последовательности 5'- и 3'-концевых сайтов сплайсинга, точки ветвления и полипиримидинового тракта. В центральную часть искусственного интрона были введены два уникальных сайта рестрикции для последующего клонирования анализируемых последовательностей ДНК. Введение по этим сайтам фрагмента ДНК, содержащего предшественник известной миРНК человека hsa-miR5096, сопровождалось вырезанием соответствующей последовательности из образующейся химерной РНК в результате нормального сплайсинга в трансфицированных клетках HeLa, восстановлением нативной мРНК TurboGFP и свечением клеток в зеленой области спектра. Прохождение адекватного процессинга предшественника миРНК hsa-miR5096 с образованием зрелой миРНК было подтверждено с помощью ПЦР в режиме реального времени. При этом исходный искусственный интрон без вставки не претерпевал сплайсинга в тех же условиях. Таким образом, в ходе проведенных исследований получена новая система, позволяющая изучать процессинг фрагментов РНК в клетках человека, в которой восстановление функций гена GFP в трансфицированных клетках является хорошим индикатором эффективной трансфекции, а также прохождения сплайсинга в анализируемых последовательностях и внутриядерного освобождения анализируемого фрагмента РНК. Это открывает возможности проведения быстрой оценки функциональной активности вышеупомянутых предшественников интронных миРНК. Работа поддержана грантом РФФИ 14-08-00801.

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕТЕРОДИМЕРНОГО БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА KU И ЕГО СУБЪЕДИНИЦЫ KU70 С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

М.Б. Готтих, А.Н. Анисенко, Е.С. Княжеская, С.П. Королев, О.А. Шадрин
МГУ им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, Россия

Белок человека Ku выполняет в клетке множество функций, главной из которых является участие в репарации двуцепочечных разрывов в ДНК по механизму негомологичного соединения концов. Существуют данные рентгено-структурного анализа комплекса Ku с ДНК, которые хорошо объясняют механизм прочного связывания этого белка с концом ДНК. Одна-

ко помимо репарации, Ku участвует также в регуляции репликации, транскрипции и трансляции, поддержании целостности теломер и ряде других процессов, в которых Ku связывается с внутренними, а не концевыми областями ДНК или РНК. Механизм такого связывания пока непонятен. Большинство клеточных функций Ku выполняет в виде гетеродимера Ku70/Ku80, однако субъединица Ku70, очевидно, может самостоятельно функционировать в цитоплазме клетки, взаимодействуя как с ДНК, так и с РНК. С целью изучения механизмов взаимодействия гетеродимера Ku и его субъединицы Ku70 с нуклеиновыми кислотами (НК) мы отработали методики получения этих белков в *E. coli* и исследовали их связывание с различными структурами ДНК и РНК. Оказалось, что субъединица Ku70 значительно более специфична к вторичной структуре НК: эффективное связывание наблюдалось только с двуцепочечной ДНК и РНК-шпилькой определенной структуры. С использованием делеционных мутантов Ku70 впервые было обнаружено, что связывание этих ДНК и РНК происходит в разных сайтах: ДНК-дуплекс взаимодействует с С-концевым районом белка, а РНК-шпилька связывается в центральном участке Ku70. Гетеродимер Ku, как установлено, обладает сравнимой аффинностью к различным структурам ДНК: одно- и двуцепочечным, а также шпилькам. В случае РНК, мы наблюдали связывание гетеродимера Ku с одно- и двуцепочечными молекулами, однако его сродство к РНК-шпилькам оказалось достоверно выше. *Работа поддержана Российским научным фондом (грант РНФ № 14-24-00061) и Российским фондом фундаментальных исследований (грант РФФИ № 14-04-00833).*

ЛИПОФИЛЬНЫЕ НУКЛЕАЗОУСТОЙЧИВЫЕ МАЛЫЕ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ РНК ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕЙ: *IN VITRO* И *IN VIVO*

И.В. Черников, Д.В. Гладких, Н.С. Петрова, М.И. Мещанинова, А.Г. Веняминова, М.А. Зенкова, В.В. Власов, Е.Л. Черноловская
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Множественная лекарственная устойчивость опухолей (МЛУ) является одной из основных причин неудач химиотерапии. Большинство случаев проявления МЛУ связано с гиперэкспрессией гена MDR1, который кодирует Р-гликопротеин (Р-gp), осуществляющий транспорт цитостатиков из клеток. Прямым подходом для подавления экспрессии генов является использование малых интерферирующих РНК (siРНК), однако чувствительность к рибонуклеазам и проблема доставки siРНК в клетки и ткани существенно ограничивают их биомедицинское применение. Для решения проблемы низкой стабильности siРНК нами предложен алгоритм получения нуклеазоустойчивых аналогов siРНК с помощью введения 2'-ОМетил-модификаций в нуклеазочувствительные сайты. Защита этих сайтов в составе siРНК обеспечивает ее стабильность в течении длительного времени в присутствии сыворотки и существенно увеличивает длительность ее ингибирующего действия. Для конструирования высокоэффективных siРНК, направленных на районы мРНК с неблагоприятной термоасимметрией, мы использовали селективно модифицированные «вилкоподобные» siРНК. Введение нуклеотидных замен со стороны 3'-конца смысловой цепи улучшает термоасимметрию дуплекса, а применение модификации позволяет защитить несовершенный дуплекс от ускоренной деградации и обеспечить длительное интерферирующее действие. Для решения проблемы доставки siРНК в клетки нами использованы липофильные аналоги siРНК. Обнаружено, что длина линкера между липофильной группой и siРНК оказывает определяющее влияние на связывание siРНК с клетками и ее биологическую активность. Получены липофильные siРНК с оптимизированным линкером способны проникать в клетки без помощи трансфекционного агента и ингибировать экспрессию гена-мишени. Исследование биораспределения холестерин-содержащей siРНК в организме мышей NOD/SCID с привитой лекарственно-устойчивой опухолью человека KB-8-5 показало, что такая siРНК эффективно накапливается в опухоли, печени, почках и селезенке, в отличие от siРНК без холестерина, которая накапливается, в основном, в почках. Полученная нами холестерин-содержащая siРНК распределяется по всем клеткам опухоли, располагаясь в их цитоплазме, вызывает снижение уровня Р-gp и восстанавливает чувствительность опухоли к цитостатикам. *Работа поддержана Российским научным фондом, грант №14-14-00697.*

DOUBLE HIGH-THROUGHPUT REPORTER FOR TRANSLATION AND REPLICATION INHIBITORS

I.A. Osterman¹, E.S. Komarova², D.A. Skvortsov¹, I.M. Khven², D.I. Shiryayev¹, D.A. Lukyanov¹, E.I. Marusich³, M.S. Veselov³, S.V. Leonov³, Y.A. Ivanenkov³, A.A. Bogdanov¹, P.V. Sergiev¹ and O.A. Dontsova¹
¹Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry and A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, ²Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, ³Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow region, Russia

Each year the number of resistant bacterial strains increases, so finding new antibiotics is one of the principal goals of modern biochemistry. Both natural extracts and chemically synthesized compounds can be used in high-throughput screening of antimicrobial agents. These methods of screening are widely used and usually new inhibitors of growth are found, but understanding the mechanism of action is a more sophisticated task. The majority of known antibiotics affect translation. Based on the tryptophan attenuator trpL and Katushka2S fluorescent protein a broad-specificity system for detection of translation inhibitors was developed. At the same time Red fluorescent protein was cloned under sulA promoter and become dependent from presence of DNA-damaging antibiotics. The approach was optimized to test up to 586 compounds per single agar plate, without the need in any enzymatic substrates and serial dilutions. By means of this method, we tested 50 thousand individual chemical compounds for antibacterial activity and the mechanisms of action. Several new translation inhibitors were found. Their MOA was confirmed by *in vitro* experiments.

ФОСФОРИЛГУАНИДИНЫ: НОВЫЙ КЛАСС ТЕРАПЕВТИЧЕСКИ-ЗНАЧИМЫХ АНАЛОГОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

М.С. Купрюшкин, Б.П. Челобанов, А.А. Фокина, А.И. Владыко, А.С. Павлова, Е.А. Буракова, А.А. Ломзов, Д.В. Пышный, Д.А. Стеценко
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Аналоги и производные нуклеиновых кислот рассматриваются в настоящее время как перспективная платформа для создания инновационных терапевтических агентов для лечения рака, генетических болезней, вирусных и бактериальных инфекций. Некоторые из них, например, тиофосфаты, уже давно применяются в клинике; другие, такие как морфолины (РМО), еще проходят клинические испытания. Последние, ввиду отсутствия суммарного отрицательного заряда, особенно пригодны для получения конъюгатов с повышенной способностью к проникновению в клетки и ткани организма.

Недавно в ИХБФМ СО РАН был открыт новый класс аналогов нуклеиновых кислот – фосфорилгуанидины [1], в которых природные отрицательно заряженные фосфодиэфирные группы замещены нейтральными фосфорилгуанидиновыми (ФГ)

группами, например, 1,3-диметил-2-имидазолидиниминофосфорильной (Dmi). Было показано, что фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО) обладают рядом привлекательных свойств для возможного применения в качестве терапевтических агентов. Так, комплементарные дуплексы, образуемые ФГО с ДНК или РНК, по своей устойчивости близки дуплексам, образуемым немодифицированными олигонуклеотидами, и малочувствительны к ионной силе раствора. Кроме того, ФГ-группы придают олигонуклеотидам высокую устойчивость к действию ферментов-нуклеаз. Поскольку при образовании фосфорилгуанидина затрагивается лишь фосфатная группа, ФГО могут включать различные углеводные остатки, например, 2'-О-метилрибозу или 2'-фтор-2'-дезоксирибозу, а также целый спектр 3'- или 5'-концевых модификаций, таких как флуоресцентные метки или тушители флуоресценции. Наконец, ФГ-группы могут в произвольном соотношении сочетаться в рамках одного и того же олигонуклеотида как с природными фосфодиэфирными, так и с нуклеазоустойчивыми тиофосфатными группами, с образованием, например, т.н. «гапмеров», к числу которых принадлежит ряд терапевтических препаратов на основе нуклеиновых кислот. Настоящий доклад освещает аспекты получения и перспективы терапевтического применения фосфорилгуанидиновых аналогов. *Работа выполнена при частичной поддержке гранта РНФ № 15-15-00121 (Д.А.С.).*

1. Купрюшкин М.С., Пышный Д.В., Стеценко Д.А. Фосфорилгуанидины. Новый класс аналогов нуклеиновых кислот. *Acta Naturae* 2014. Т. 6. № 4(23), с. 123-125, <http://www.actanaturae.ru/attachment.aspx?id=2059>.

ПАРАДИГМА «СТРУКТУРА-ФУНКЦИЯ» НА ПРИМЕРЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДНК-АПТАМЕРА С ТРОМБИНОМ

В.А. Спиридонова¹, А.В. Мельничук², В.А. Сизов³, Е.О. Кузьменко³, Е.В. Титаева⁴, А.Б. Добровольский⁴, А.В. Мазуров⁴

¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, ²Факультет биоинженерии и биоинформатики, ³Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, ⁴Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ России, Москва, Россия

Аптамеры – это небольшие фрагменты ДНК/РНК, выделенные селекцией из комбинаторных библиотек нуклеиновых кислот. Специфичность и аффинность аптамеров к белковым мишеням высоки и сравнимы со сродством моноклональных антител к этим же белкам. К тромбину, центральному белку процесса свертывания крови, выделены ДНК аптамеры. Аптамерная ДНК образует с тромбином искусственный нуклеопротеидный комплекс и ингибирует взаимодействие фермента с его субстратами – фибриногеном, рецепторами тромбоцитов PAR (Protease Activated Receptors) и другими. Кристаллографически описана контактная зона между квадруплексом 15TBA аптамера и тромбином [1]. В совместных работах с итальянскими учеными было показано, что оригинальный аптамер RE31 (ДНК-аптамер второго поколения), структура которого включает дуплексный район наряду с квадруплексным доменом проявляет повышенное сродство к тромбину [2]. Переход между доменами в RE31 сформирован нуклеотидами, образующими шарнирную область, что приводит к расширению контактной зоны между ДНК-аптамером и тромбином. Структура аптамера доказана спектрами КД и УФ-плавлением. При изучении ингибирующего действия RE31 на систему свертывания крови измеряли следующие характеристики: тромбиновое время, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и протромбиновое время (ПВ). RE31 аптамер существенно (до 10 раз) пролонгировал время образования фибрина во всех трех тестах. Сделано заключение о том, что аптамер RE31 перспективен в качестве основы для создания ингибиторов сосудистого тромбообразования, которое приводит к развитию таких опасных заболеваний, как инфаркт миокарда, ишемический инсульт и т.д. Обсуждается возможность использования аптамерных ДНК в терапии. *Работа выполнена при поддержке ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы” (проект №14.616.21.0011, уникальный идентификатор RFMEFI61614X0011).*

1. Bock L.C., Griffin L.C., Latham J.A., Vermaas E.H., Toole J.J. *Nature*, 1992, 355, 564-566.

2. Russo Krauss I, Spiridonova V, Pica A, Napolitano V, Sica F, *NAR*, 2016, DOI 10.1093/nar/gkv1384

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ПАРТНЕРОВ ПРОДУКТА ТРАНСЛЯЦИИ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ РНК ЧЕЛОВЕКА

Ю.В. Нарайкина *Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

На концах линейных хромосом эукариот находятся специализированные ДНК-белковые структуры – теломеры. У большинства организмов теломерная ДНК представлена многочисленными короткими повторами. Их удлинение осуществляется необычным РНК-содержащим ферментом теломеразой.

Свойства теломеразной РНК человека уникальны. Ее синтез осуществляет РНК-полимераза II, а функционально она относится к некодирующим РНК, синтез которых осуществляет РНК-полимераза III. На промежуточных стадиях биогенеза теломеразная РНК содержит структурные элементы, присущие кодирующим РНК. Ранее удалось идентифицировать новый белок hTERP, кодируемый геном теломеразной РНК человека, в клетках HEK293. Следующим этапом работы является поиск его биологической роли. На первом шаге с помощью методов ко-иммунопреципитации и масс-спектрометрии был осуществлен поиск белковых партнеров продукта трансляции теломеразной РНК человека. Согласно полученным на данном этапе результатам, 26S протеасома – значимый компонент интерактома hTERP.

АПТАМЕРЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ РНК-ПОЛИМЕРАЗ

Н.А. Миропольская, Д.В. Пупов, А.В. Кульбачинский *Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия*

Бактериальная РНК-полимераза (РНКП) – одна из главных регуляторных мишеней в процессе экспрессии генов. В ходе транскрипции РНКП взаимодействует с ДНК-матрицей, РНК-продуктом, нуклеотидными субстратами, регуляторными белками и малыми молекулами, которые связываются с различными сайтами РНКП и модулируют ее активность. РНКП также является мишенью для действия нескольких известных антибиотиков и получения новых антибактериальных соединений. Несмотря на значительный прогресс в структурных исследованиях бактериальных РНКП, многие детали взаимодействия РНКП с субстратами, регуляторными лигандами и антибиотиками остаются неизвестными. Аптамеры – это синтетические односторонние молекулы нуклеиновых кислот, способные к специфичному и высокоаффинному связыванию с другими молекулами-мишенями. Анализ комплексов аптамеров с РНКП может быть использован как для функциональных исследований транскрипции, так и для разработки новых ингибиторов РНКП и антибактериальных соединений. Нами получены высоко-

специфичные ДНК-аптамеры к РНКП различных бактерий, включая *E. coli*, *T. aquaticus* и *D. radiodurans*, и охарактеризованы свойства и структура комплексов этих аптамеров с РНКП. Показано, что аптамеры взаимодействуют с ДНК-связывающими участками РНКП и являются высокоэффективными ингибиторами транскрипции. С помощью аптамеров изучены взаимодействия РНКП с транскрипционными факторами и антибиотиками, в частности, рифампицином. С использованием аптамеров разработан новый подход к выделению РНКП и ассоциированных с ней факторов из бактериальных клеток. Проведенные исследования показывают, что аптамеры, связывающиеся с различными эпитопами РНКП, могут служить полезным инструментом для структурных и функциональных исследований транскрипции. *Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук № МК-8983.2016.4*

СИГНАЛ ЯДЕРНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ НУКЛЕОМОДУЛИНОВ ЯВЛЯЕТСЯ ИНДУКТОРОМ СИНТЕЗА КОРОТКОЙ МРНК ДЕФЕНЗИНА ГАММА-ТИОНИНА

Е.В. Шешукова, Т.В. Комарова, Ю.Л. Дорохов *Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия*

Патогенные и симбиотические бактерии воздействуют на ядро клетки хозяина в своих собственных интересах с помощью секретируемых молекул, получивших недавно название нуклеомодулинов, путем прямого вмешательства в транскрипцию, ремоделирование хроматина, репликацию ДНК и синтез мРНК. Растительная клетка в ответ на атаку патогена включает защитные механизмы, среди которых синтез антимикробных пептидов, получивших название дефензинов. При выяснении механизмов индукции дефензинов, мы предположили, что сигнал ядерной локализации (NLS), которым, как правило, обладают нуклеомодулины может быть индуктором синтеза дефензина. *Ralstonia solanacearum* дает пример бактериального фермента-нуклеомодулина PopP2, изменяющего экспрессию генов клеток хозяина. Биоинформационный анализ выявляет в составе PopP2 NLS (NLSPopP2), который, как нами показано, не только способен направлять модельный белок GFP в ядро, но и индуцировать в *Nicotiana benthamiana* синтез мРНК ранее не детектированного гамма-тионина, принадлежащего к семейству дефензинов. NLS-индуцируемый синтез мРНК гамма-тионина неспецифичен, поскольку такой же эффект оказывает NLS протомозина альфа человека (NLSpTa). Мы выделили транскрипционный промотор гена гамма-тионина (proγ-thionin) и показали, что он способен направлять синтез мРНК как гамма-тионина, так и модельных белков, бета-глюкуронидазы и люциферазы. Введение в клетку NLSpTa- и NLSPopP2-содержащего белка резко усиливает синтез мРНК, направляемых proγ-thionin. При выяснении механизма действия дефензинов мы показали, что короткая мРНК гамма-тионина обладает способностью подобно другим коротким РНК супрессировать выход из ядра в цитоплазму более длинных клеточных мРНК. Мы предполагаем, что высокая конкурентная способность коротких мРНК дефензинов дополняет их прямое антимикробное действие на уровне пептида. *Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 16-34-00062 мол_а, 14-04-00109_а, 15-34-20014 мол_а_вед, 16-34-60002 мол_а_дк.*

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ОТВЕТ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ АНТИБИОТИКОВ МОДЕЛЬНОГО ОБЪЕКТА MYCOPLASMA GALLISEPTICUM

Т.А. Семашко, А.А. Арзамасов, Д.В. Евсютина, Г.Ю. Фисунов, В.М. Говорун

ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия

Mycoplasma gallisepticum является удобным модельным объектом для изучения организации и функционирования прокариотической клетки, поскольку ее характеризует минимальный размер генома, отсутствие клеточной стенки, а также она легко культивируется и непатогенна для человека. В данной работе был изучен транскрипционный ответ *M. gallisepticum* при ингибировании рибосомного синтеза тетрациклином, ДНК-гиразы новобиоцином и при нарушении проницаемости мембраны карбонил-цианид м-хлорфенилгидразоном. Все эксперименты проводились при обработке антибиотиками в сублетальных условиях. При таких воздействиях обеспечивается максимальный уровень ответа в отсутствии массовой клеточной гибели, что могло бы повлиять на результат эксперимента. Профиль экспрессии определялся с использованием гибридизационной технологии на микрочипах с индивидуальным дизайном, включавшим в себя зонды на 678 генов и некодирующих РНК. Полученные данные позволили характеризовать транскрипционный ответ для воздействия каждого типа, а также группы генов, совместно изменяющих экспрессию. Самое масштабное изменение экспрессии генов наблюдается в случае ответа клетки на разобщение протонного градиента и дальнейшее снижение мембранного потенциала. При этом, в том числе, увеличивается экспрессия генов, связанных с вирулентностью. Самый непохожий ответ по пулу изменяемых транскриптов наблюдается в случае ответа клетки на ингибирование ДНК-гиразы, что может быть связано с регуляцией экспрессии под влиянием топологии ДНК. *Работа поддержана грантом РФФИ 14-24-00159 «Системное исследование минимальной клетки на модели Mycoplasma gallisepticum».*

МЕТОДИКА РЕГЕНЕРАЦИИ МИКРОЧИПОВ ДЛЯ ТРАНСКРИПТОМНОГО АНАЛИЗА

Л.К. Курбатов, В.Г. Згода *НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия*

Получение статистически достоверных экспериментальных данных требует наличия нескольких как биологических, так и технических повторов. В случае анализа экспрессии генов на микрочипах технические повторы выполняются с минимально возможным количеством чипов в связи с их высокой стоимостью. В то же время количество технических реплик эксперимента может быть увеличено за счет регенерации микрочипов, поскольку процесс гибридизации пробы к зондам является обратимым и теоретически возможно повторное использование одного и того же чипа. Нами было проведено исследование возможности отмывки оригинальных микрочипов G4112F фирмы Agilent с последующим повторным циклом использования. Теоретически для этой цели подходят три пути – разрушение комплексов проба-зонд при высокой температуре или сильными детергентами; деградация меченых проб в щелочных условиях при умеренно высокой температуре, а также ферментативное удаление гибридизованной РНК. Однако каждый из этих способов имеет свои ограничения, приводящие либо к снижению эффективности отмывки, либо к повреждению микрочипа. Известные из литературы методики были воспроизведены в нашей лаборатории, однако только ферментативное разрушение проб на чипе показало положительный результат. В основу нашей методики была положена комбинация щелочного и ферментативного удаления с микрочипов флуоресцентно

меченой РНК при умеренной температуре. Поскольку наличие РНК-азы на рабочей поверхности микрочипа неизбежно приводило бы к деградации новой пробы, после обработки осуществлялся гидролиз фермента протеиназой К. Повторная гибридизация как с исходными, так и другими пробами кРНК показала высокую степень воспроизводимости результатов, что свидетельствует о достаточной эффективности данной методики регенерации микрочипов.

МЕХАНИЗМ ИНГИБИРОВАНИЯ ТРАНСЛЯЦИИ РИБОСОМЫ АНТИБИОТИКОМ АМИКУМАЦИНОМ А

Е.М. Максимова^{1,2}, Е.В. Полесскова¹, П.С. Касацкий^{1,2}, В.И. Махно¹, И.А. Остерман³, М.В. Роднина⁴, О.А. Донцова³, П.В. Сергиев³, А.Л. Коневега^{1,2} ¹Петербургский институт ядерной физики, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина; ²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург; ³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; ⁴Институт биофизической химии Общества Макса Планка, Гёттинген, Германия

Амикумацин А является одним из малоизученных антибиотиков, механизм действия которого до сих пор неясен. Ранее было показано, что механизм его действия направлен на подавление трансляции полипептида [1]. Согласно рентгеноструктурному анализу комплекса рибосомы с амикумацином А, антибиотик связывается в Е сайте 30S субчастицы, образуя контакты с 16S рРНК и мРНК, но не взаимодействует с тРНК. Более того, были выявлены мутации (ins544K, G542V и G581A) в IV домене элонгационного фактора EF-G, катализирующего транслокацию рибосомы, которые подавляют ингибирующее действие этого антибиотика. Мы изучили молекулярный механизм ингибирования трансляции бактериальной рибосомы амикумацином А. Показано, что в *in vitro* системе с использованием матрицы poly(UUC), присутствие антибиотика не влияет на количество синтезируемого полипептида (Phe)_n, но заметно понижает скорость его синтеза. Изучение престабионарной кинетики реакции транслокации методом остановленного потока показало, что связывание амикумацина А в Е сайте рибосомы снижает скорость передвижения пептидил-тРНК из А в Р сайт рибосомы. Также было показано, что амикумацин А способствует увеличению аффинности деацилированной тРНК к Е сайту рибосомы. Изучение престабионарной кинетики транслокации показало, что мутации ins544K, G542V и G581A элонгационного фактора EF-G значительно замедляют кинетику реакции транслокации. Механизм ингибирования трансляции бактериальной рибосомы амикумацином А, вероятно, связан со стабилизацией тРНК в Е сайте рибосомы, которая приводит к замедлению передвижения молекул тРНК при транслокации. Это, в свою очередь, способствует замедлению каждого раунда элонгации при синтезе полипептидной цепи. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-34-00023.*

1. Polikanov Y.S., et al. Mol Cell, 56, 531–540 (2014).

ДЕКОДИРОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ МОЛЕКУЛАМИ ТРНК С РАСШИРЕННЫМ АНТИКОДОНОМ

Д.С. Виноградова^{1,2}, П.С. Касацкий^{1,2}, С.В. Кириллов¹, Н.Г. Соболева¹, А.Л. Коневега^{1,2}

¹НИЦ «Курчатовский институт» Петербургский институт ядерной физики, Отделение молекулярной и радиационной биофизики, Гатчина; ²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Рибосома осуществляет декодирование матричной РНК, последовательно прочитывая триплетные кодоны. Действие различных антимикробных ингибиторов (антибиотиков) прямо обусловлено тем, что они действуют на бактериальные рибосомы и нарушают их нормальное функционирование. Одной из наиболее важных особенностей биосинтеза белка является способность рибосомы поддерживать правильную рамку считывания. В настоящей работе мы рассматриваем модельную систему для изучения трансляции при помощи тРНК с расширенным антикодоном в изолированной системе на 70S рибосомах *E. coli*. Подробное изучение парциальных реакций этапа элонгации для тРНК с расширенным антикодоном проведено методами престабионарной кинетики, в том числе методом остановленного потока с использованием флуоресцентных меток на Р-сайтовой пептидил-тРНК. Молекулы тРНК с расширенным антикодоном, а также немодифицированные транскрипты тРНК обладают способностью к связыванию в А сайте рибосомы и последующему перемещению в Р сайт в составе пептидил-тРНК. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-34-00023.*

РОЛЬ Gfh-ФАКТОРОВ РАДИОУСТОЙЧИВОЙ БАКТЕРИИ *DEINOCOCCUS RADIODURANS* В РЕГУЛЯЦИИ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ

А.А. Агапов^{1,2}, Д.М. Есюнина¹, Д.В. Пупов¹, А.В. Кульбачинский^{1,2}

¹Институт молекулярной генетики РАН; ²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Deinococcus radiodurans (Dra) – бактерия, чрезвычайно устойчивая к радиоактивному облучению. Такая стрессоустойчивость имеет комплексную природу и требует наличия специальных механизмов, обеспечивающих быстрые изменения в экспрессии генов. Одним из основных этапов регуляции экспрессии генов у бактерий является инициация транскрипции. На стадии инициации с РНК-полимеразой взаимодействуют многочисленные белковые факторы, в том числе, Gre-белки, которые связываются во вторичном канале РНК-полимеразы и достигают активного центра фермента, влияя на связывание каталитических ионов Mg²⁺ и стимулируя РНК-расщепляющую активность РНК-полимеразы. Классические Gre-белки способствуют инициации транскрипции. У бактерий филума *Deinococcus-Thermus* обнаружены Gre-подобные факторы Gfh, функции которых в транскрипции изучены слабо. Транскрипционные свойства Gfh-факторов Dra исследованы не были, однако известно, что концентрация Gfh1 в клетках Dra резко возрастает после радиоактивного облучения. Мы обнаружили, что белки Gfh1 и Gfh2 Dra ингибируют синтез РНК на стадии инициации транскрипции, но не влияют на стабильность промоторных комплексов РНК-полимеразы. Замены ключевых аминокислотных остатков Gfh-факторов, взаимодействующих с активным центром РНК-полимеразы, снижают их ингибирующую активность. Оба Gfh-фактора Dra повышают значения констант Михаэлиса для инициаторных нуклеотидов, причем сильнее действуют на связывание 5'-концевого субстрата (хотя и находятся в активном центре РНК-полимеразы ближе к 3'-концевому нуклеотиду). Ингибирующий эффект Gfh-факторов также наблюдается при замене каталитических ионов Mg²⁺ на Mn²⁺. Таким образом, активность этих белков сохраняется в стрессовых условиях, когда клетки Dra накапливают ионы Mn²⁺. Полученные данные позволяют предполагать, что ингибирующий эффект исследуемых факторов определяется не непосредственным взаимодействием с субстратами реакции, а влиянием на конформацию активного центра РНКП и/или на связывание каталитических ионов металла. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-14-01074.*

МАЛАЯ НЕКОДИРУЮЩАЯ 6S РНК ИЗ *RHODOBACTER SPHAEROIDES*

Д.А. Елкина¹, Л. Вебер², О.Ю. Буренина¹, Е.А. Кубарева¹, Р. Хартманн³, Г. Клуг²

¹Химический факультет и НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

²Институт микробиологии и молекулярной биологии, Университет им. Ю. Либиха, Гиссен, Германия; ³Институт фармацевтической химии, Университет им. Филиппа, Марбург, Германия

6S РНК *E. coli* – одна из первых отсекаемых некодирующих РНК бактерий, активно синтезирующаяся в клетке в стационарной фазе клеточного роста. Благодаря консервативной вторичной структуре она способна связываться с РНК-полимеразой (РНКП) и ингибировать транскрипцию в неблагоприятных для клетки условиях. Уникальной особенностью 6S РНК является возможность синтеза коротких транскриптов (пРНК) на ней как на матрице. Свойства и функции 6S РНК на протяжении многих лет активно изучаются в *E. coli* и *B. subtilis*. Недавно наличие 6S РНК было экспериментально подтверждено для α -протеобактерий. Одной из них является *R. sphaeroides* – модельный организм для изучения ответа на окислительный и фотоокислительный стрессы.

Нами впервые проанализированы профили экспрессии 6S РНК *R. sphaeroides* в зависимости от условий клеточного роста. Наиболее эффективный синтез 6S РНК *R. sphaeroides* наблюдался на стадии активного роста клеточной культуры, а не в стационарной фазе, как для большинства изученных бактерий и *E. coli*. Такая особенность ранее обнаружена нами только для дополнительной 6S-2 РНК *B. subtilis*. Однако в этой бактерии экспрессируется и основная 6S-1 РНК, гомологичная 6S РНК *E. coli*. Предсказанная вторичная структура молекулы является типичной «6S РНК-подобной». В экспериментах с рифампицином установлено, что 6S РНК защищена от действия нуклеаз, что является косвенным признаком её комплексобразования с РНКП. С помощью метода блот-гибридизации в варианте Нозерн в экстрактах общей клеточной РНК удалось детектировать пРНК, комплементарные 6S РНК, и проанализировать профили их экспрессии в различных фазах клеточного роста. Для изучения роли 6S РНК в клетке был сконструирован делеционный штамм *R. sphaeroides* (Δ ssrS), не содержащий ген 6S РНК, и проведен сравнительный анализ его жизнеспособности с клетками дикого типа в различных условиях роста (в том числе и стрессовых). Обнаружено, что отсутствие 6S РНК приводит к снижению скорости роста клеток Δ ssrS при наличии в среде 250 мМ NaCl по сравнению с диким типом. Таким образом, впервые охарактеризована 6S РНК из *R. sphaeroides* и выявлено ее возможное участие в клеточном ответе на солевой стресс.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 14-24-00061.

NSUN7 – ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗА, ВЛИЯЮЩАЯ НА ФЕРТИЛЬНОСТЬ МУЖСКИХ ОСОБЕЙ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

А.Я. Головина, П.В. Сергиев, В.Н. Манских, О.С. Ганчарова, И.А. Остерман, О.В. Сергеева, Е.Т. Швецова, К.С. Петрюков, Н.Н. Зайцева, А.В. Дейкин, О.А. Донцова

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Модификация РНК – одно из самых загадочных явлений в биологии. Несмотря на то, что модифицированные нуклеотиды очень разнообразны и найдены у всех живых существ, роль этих модификаций изучена очень фрагментарно. У высших эукариот была обнаружена регуляторная роль метилирования мРНК. Тем не менее, в большинстве случаев неизвестны ферменты, осуществляющие модификацию РНК.

Для изучения мы выбрали гипотетическую РНК-метилтрансферазу Nsun7. Повреждение гена, кодирующего данный белок, приводит к стерильности мужских особей человека и *M. musculus*. Из литературных данных известно, что у мышей с поврежденным в обоих аллелях геном *nsun7* подвижность сперматозоидов значительно снижается, и они движутся по кругу, а сами мыши не способны давать потомство, или это происходит крайне редко. У человека найдены некоторые полиморфизмы гена *nsun7*, которые также связывают со стерильностью. Тем не менее, мишень для Nsun7 до сих пор не найдена. Nsun7, возможно, является уникальным примером, когда одна РНК-метилтрансфераза напрямую связана с однозначным и жизненно важным фенотипом у высших эукариот. Целью данной работы является поиск мишени гипотетической РНК-метилтрансферазы Nsun7 на модели мыши и установление роли метилирования для организма в целом. Методом вестерн-блоттинга и ИГХ показано, что Nsun7 экспрессируется исключительно в семенниках и эпидидимисе, причем белок локализован в ядрах. В настоящее время получены гетерозиготные мыши с инактивированным геном *nsun7*. Инактивацию проводили инъекцией в оплодотворенные яйцеклетки конструкций CRISPR-Cas9 системы. Получены генетические конструкции для замены вероятного каталитического цистеина, для внесения аффинного НА-тэга и флуоресцентного доводка Katushka. Все полученные конструкции позволят установить мишень белка, его локализацию в клетке, а также белковых и РНК-партнеров.

Данное исследование позволит установить генетические причины некоторых типов мужского бесплодия и даст возможность разработать способы борьбы с ней.

АНАЛИЗ ПРОФИЛЕЙ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ A549, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ ГРИППА

М.А. Плотникова¹, С.А. Клотченко¹, А.В. Васин^{1,2}

¹НИИ гриппа МЗ РФ; ²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

В настоящее время наиболее информативными средствами, позволяющими изучать механизмы взаимодействия вируса и клетки-хозяина, являются такие высокопроизводительные методы, как микрочипы и NGS. Результаты таких исследований могут не только предупредить неожиданные последствия инфекционных процессов, но и стать предпосылкой к созданию новых противовирусных препаратов, направленных на клеточные мишени. Представленная работа посвящена сравнительному исследованию паттернов мРНК клеточных генов в клетках A549 при инфицировании их рекомбинантными вирусами гриппа A/H5N1 с полноразмерным и делетированным геном NS1. Удаление последовательности белка NS1 является основным механизмом аттенуации вирусов гриппа, обеспечивающим перспективный подход к созданию живых противогриппозных вакцин. В результате экспериментов, проведенных с использованием технологии двухцветных микрочипов Agilent, были получены три набора дифференциально экспрессирующихся генов. Эти наборы генов далее были аннотированы с использованием баз данных метаболических путей KEGG и GSEA. Было выявлено, что инфицирование клеток обоими штаммами

вирусов гриппа приводило к активации экспрессии генов, относящихся к системе воспаления, системе комплемента, α - и γ -системам интерферонов; индукции путей, активируемых TNF- α посредством NF κ B и активируемых IL-6 посредством JAK-STAT3 сигнальной системы; запуску процесса программируемой клеточной гибели. В случае инфицирования вирусом с делецией NS1 в клетках также была повышена экспрессия генов, задействованных в альтернативных путях активации MAPK1/3, транскрипционном регуляторном гетеродимерном комплексе SMAD (посредством активации SERPINE1) и метаболических обменных процессах, связанных с гипоксией. При инфицировании полноразмерным штаммом в клетках были дополнительно активированы гены, участвующие в регуляции и активации белков теплового шока, а также ряд генов, вовлеченных в р53-зависимые сигнальные пути. Полученные нами результаты будут валидированы другими методами оценки дифференциальной экспрессии генов, такими как NGS и ПЦР. Медиаторы метаболических путей, активирующиеся при репродукции вирусов в клетке, в частности, например, выявленный нами HSF-1, могут быть предложены в качестве мишени при создании новых препаратов для молекулярной терапии гриппа.

eEF2 КАТАЛИЗИРУЕТ ОБРАТНУЮ ТРАНСЛОКАЦИЮ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ РИБОСОМ

Д.С. Сусоров^{1,2}, Е.З. Алкалаева² ¹Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Биосинтез белка требует покодонного перемещения тРНК и мРНК внутри рибосомы (транслокации). После декодирования и образования пептидной связи, рибосома в претранслокационном состоянии (Pre) содержит пептидил-тРНК в А-сайте и деацилированную тРНК в Р-сайте. Элонгационный фактор EF-2 (EF-G у прокариот, eEF2 у эукариот) связывается с Pre-рибосомой и индуцирует сдвиг этих тРНК в Р- и Е-сайты, соответственно, что приводит к образованию посттранслокационной рибосомы (Post), в которой мРНК сдвинута на кодон. Наряду с прямой транслокацией, возможна так называемая обратная транслокация, которая перемещает тРНК из Р- и Е-сайтов в А- и Р-сайты, соответственно. У прокариот обратная транслокация требует кодон-антикодонного взаимодействия в Е-сайте и может быть спонтанной, или катализируемой элонгационным фактором EF4. К настоящему времени, обратная транслокация у эукариот не была обнаружена. Мы показали, что eEF2 стимулирует обратную транслокацию эукариотических Pre-рибосом, которая не может происходить спонтанно. Этот процесс также требует кодон-антикодонного взаимодействия в Е-сайте, а его эффективность различна для разных тРНК. Интересно, что АДФ-рибозилирование eEF2 полностью ингибирует обратную транслокацию, указывая на функцию IV домена белка в катализе этой реакции. Таким образом, полученные нами данные углубляют фундаментальное понимание механизма транслокации и определяют роль eEF2 в этом процессе. *Работа была поддержана грантом РФФИ №16-34-00406.*

РАВР СТИМУЛИРУЕТ ТЕРМИНАЦИЮ ТРАНСЛЯЦИИ ПУТЕМ ПОЗИЦИОНИРОВАНИЯ ФАКТОРА eRF3a В РИБОСОМЕ

А.В. Иванов^{1,2}, Е.З. Алкалаева¹ ¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН; ²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Поли(А) связывающий белок, (РАВР) является одним из основных компонентов мРНК-комплексов клетки. РАВР способен связывать поли(А) хвосты мРНК, а также белки, фактор инициации трансляции 4G (eIF4G) и фактор терминации трансляции 3a (eRF3a). Было установлено, что РАВР стимулирует инициацию трансляции и ингибирует нонсенс опосредованную деградацию мРНК. Используя реконструированную *in vitro* эукариотическую систему трансляции, мы обнаружили еще одну функцию РАВР – прямую стимуляцию терминации трансляции. Оказалось, что РАВР повышает эффективность всех стадий терминации трансляции: связывание факторов терминации eRF3a и eRF1 с рибосомой, узнавание стоп кодона фактором eRF1 и последующий гидролиз пептидил-тРНК. Функционирование РАВР в терминации зависит от его С-концевого домена, обеспечивающего взаимодействие с N-концом eRF3a. Также, мы обнаружили, что полноразмерный eRF3a демонстрирует свойства, отличные от таковых у его урезанной формы eRF3c, не имеющей N-концевого домена. Преассоциация eRF3a, но не eRF3c, с претерминационными комплексами значительно увеличивает эффективность гидролиза пептидил-тРНК. Это указывает на дополнительное взаимодействие eRF3a с рибосомой. Исходя из полученных данных, мы предположили, что РАВР облегчает правильное связывание комплекса факторов терминации eRF1-eRF3a с рибосомой через взаимодействие с N-концом eRF3a, который также играет активную роль в терминации трансляции. *Работа поддержана грантом РФФИ 15-04-08174 А.*

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ РНК, ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ В СОСТАВЕ МЕМБРАННЫХ ЧАСТИЦ И НЕМЕМБРАННЫХ КОМПЛЕКСОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

А.В. Савельева¹, Е.В. Кулигина¹, В.В. Козлов², В.А. Рихтер¹, Д.В. Семенов¹ ¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²Новосибирский областной клинический онкологический диспансер, Новосибирск, Россия

Внеклеточные РНК, секретируемые большинством видов клеток в составе экзосом, микровезикул, а также комплексов с липопротеинами высокой плотности и РНК-связывающими белками, являются медиаторами процессов межклеточного взаимодействия. Высвободившиеся после проникновения циркулирующих комплексов в клетки-реципиенты внеклеточные РНК способны изменять экспрессию генов по механизму РНК-интерференции или конкурентных эндогенных РНК. Однако процессы, лежащие в основе биогенеза, транспорта и компартментализации РНК циркулирующих комплексов биологических жидкостей, изучены мало. Целью данной работы являлось описание состава РНК циркулирующих комплексов плазмы крови человека в норме и при немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ). Препараты цельной крови разделяли методом дробного центрифугирования при 1200, 16 000 и 160 000g на 5 фракций: форменные элементы, плазма, мембранные частицы с высокой и низкой плавучей плотностью и обедненный по везикулам супернатант. Методами электронной микроскопии, динамического светорассеяния и проточной цитометрии было установлено, что частицы крови, осаждаемые при 16 000 и 160 000g, представляют собой мембранные частицы (и их агрегаты) размером 40–100 нм, обогащенные поверхностными маркерами Т-клеток и тромбоцитов. Высокопроизводительное секвенирование суммарной РНК фракций крови на платформе SOLiD показало, что в состав циркулирующих комплексов крови входят фрагменты рРНК, мРНК, тРНК, мтРНК, мяРНК, мямРНК, мцРНК, микроРНК, мРНК, днРНК и кольцевых РНК. Биоинформатический анализ данных секвенирования позволил определить характеристические и дифференциальные транскрипты каждого класса РНК для каждой фракции крови. При

этом были выявлены формы РНК содержание которых в плазме крови онкопациентов отличалось от здоровых доноров. Методом количественной ОТ-ПЦР была проведена выборочная верификация результатов секвенирования РНК фракций крови, которая показала, что помимо микроРНК-подобных фрагментов фракции крови содержат полноразмерные формы РНК. Полученные данные полнотранскриптомного анализа циркулирующих комплексов плазмы крови человека расширяют представления о функциях и биогенезе внеклеточных РНК и могут быть использованы для разработки новых диагностических средств. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 16-14-10284.

РОЛЬ МАЛОЙ РНК MTS1338 В МЕТАБОЛИЗМЕ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

А.С. Мазурова¹, А.С. Григоров², Е.Г. Салина³, О.С. Быченко¹, Т.Л. Ажикина¹ ¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва; ³Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

M. tuberculosis входит в группу бактерий туберкулёзного комплекса (МТВС), способных вызывать туберкулез – широко распространенное инфекционное заболевание человека и некоторых животных. При попадании в альвеолы бактерии захватываются легочными макрофагами и заключаются в фагосомы, где подвергаются воздействию лизосомальных ферментов, радикалов, NO, активных форм кислорода и других факторов, свойственным фаголизосомам. Однако *M. tuberculosis* приостанавливает нормальное развитие фагосом, что позволяет ему длительное время персистировать в организме. Сниженный метаболизм бактерий в покоящемся, или дормантном, состоянии приводит к тому, что инфекцию практически невозможно детектировать стандартными методами. Генетические механизмы перехода бактерий в дормантное состояние до сих пор не вполне ясны. Существенную роль в регуляции экспрессии генов прокариот играет некодирующий транскриптом (нетранслируемые области мРНК, малые РНК и др.). Мы исследовали роль в метаболизме микобактерий малой некодирующей РНК MTS1338, высоко консервативной среди бактерий туберкулёзного комплекса. Экспрессия MTS1338 повышается в стационарной фазе роста и находится под контролем двухкомпонентной сигнальной системы DosRST, отвечающей за активацию ряда генов при гипоксии. Для установления роли малой РНК в регуляции генов был проведен нокдаун малой РНК MTS1338 путем сверхэкспрессии последовательности антисенсMTS1338. Анализ транскриптома выявил группы генов, экспрессия которых статистически достоверно изменяется при снижении количества транскриптов MTS1338. Особенное внимание привлекают гены компонентов клеточной стенки (pks3-pks4-parA3-mmpL10, – синтез и экспорт полиацетилтрегалозы, pks2-parA1-mmpL8 – синтез и экспорт сульфополипида-1). Изменения транскриптома, происходящие в нокдаун MTS1338 штамме, коррелируют с таковыми, происходящими при делеции гена rhoP. PhoPR – двухкомпонентная сигнальная система, регулирующая транскрипцию жизненно важных генов, участвующих в метаболизме бактериальной клеточной стенки. Полученные нами данные свидетельствуют в пользу того, что малая РНК MTS1338 может служить связующим звеном между регуляторными системами DosRST и PhoPR. Работа поддержана Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и грантом РФФИ № 15-04-04563-а.

СТАРЕНИЕ, REDOX БИОЛОГИЯ И СЕЛЕН

В.Н. Гладышев *Факультет медицины, Больница Бригам, Медицинская школа Гарварда, Бостон, США*

Научные интересы нашей лаборатории включают исследования механизмов старения, редокс биологии и селена. Селен является микроэлементом, который имеет как полезные так и вредные воздействия на здоровье человека. Важность селена определяется тем что он встраивается в белки в виде аминокислоты селеноцистеина, которая кодируется UGA с помощью SECIS элемента (структура мРНК в 3'-некодируемой области). В этой презентации, обсуждение будет сосредоточено на функциях селена и селен-содержащих белков у млекопитающих. Методы сравнительной и функциональной геномики позволяют оценить использование этого элемента на уровне белков, клеток, органов и целых организмов. Селен-содержащие белки с известными функциями являются оксидоредуктазами, и тесная связь между селеном и редокс биологией дает возможность лучше понять функции этих белков и использовать эту информацию для изучения вопросов играющих центральную роль в редокс регуляции клеточных процессов. Это также имеет важное значение для понимания процессов старения и контроля продолжительности жизни. Мы используем методы системной биологии чтобы понять молекулярные механизмы старения млекопитающих. Например, мы применяем эти методы для анализа долгоживущих млекопитающих, таких как голый землекоп, летучая мышь и кит, а также смотрим на целые группы млекопитающих с разной продолжительностью жизни. Одним из важных процессов играющих роль в контроле продолжительности жизни этих животных является белковый синтез. Для анализа этого процесса мы развили методы рибосомального профайлинга на уровне отдельных органов.

RNA-PROTEIN INTERACTIONS PIVOTAL FOR READING THE UGA SELENOCYSTEINE CODON

Olga Kossinova^{1,2}, Alexey Malygin¹, Yaser Hashem², Galina Karpova¹, Alain Krol²

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia; ²Architecture and Reactivity of RNA – Institute of Molecular and Cellular Biology, CNRS – University of Strasbourg, France

Certain sense or nonsense codons may have meanings different from the original ones. In the latter category, a prominent example is UGA that can either encode tryptophan in mitochondria or cysteine in a few animals or the selenium-containing amino acid selenocysteine (Sec) in the three descents of life. An extreme case is the ciliate *Euplotes* where UGA encodes both cysteine and selenocysteine in the same mRNA. Sec in an active site amino acid in selenoproteins. These proteins fulfill varied oxidation-reduction functions such as defence against reactive oxygen species, sperm maturation, thyroid hormone maturation or muscle biogenesis. Sec biosynthesis and its incorporation into selenoproteins differ from the standard pathway because of the necessity to recode UGA as Sec. This is accomplished by an orthogonal system comprising a uniquely transcribed and structurally unusual tRNA^{Sec}, tRNA^{Sec}-dependent Sec-synthesizing enzymes, the specialized translation elongation factor EFSec, distinctive caps and 3'UTR SECIS stem-loop in selenoprotein mRNAs, and finally the SECIS binding protein SBP2. Mutations in the RNA/protein components, or in the selenoproteins themselves, lead to male sterility, embryonic lethality or muscular dystrophies, attesting the importance of selenoproteins in health and disease. The SECIS RNA-SBP2 complex is pivotal by carrying the EFSec-bound Sec-tRNA^{Sec} to the A-site ribosome. Mechanistically, however, little was known of how the charged Sec-tRNA^{Sec} is properly delivered at an approaching ribosome. To answer the

question, our first goal was to understand where and when the SECIS-SBP2 complex interacts with the ribosome in the course of translation, and whether this complex is responsible for blocking access of the A-site to the release factor. The orthogonal system and experimental data will be presented. Using UV or bi-functional reagent cross-linking, we showed that SBP2 binds the SECIS or the ribosome back and forth during the various translation steps. Hydroxyl radical footprinting and chemical protection experiments of SBP2-human ribosomes complexes enabled us to identify the binding site of SBP2 on the 28S rRNA. To identify the exact binding mechanism and the residues involved in the interaction, we recently attempted to obtain cryo-EM reconstructions of the human SBP2-ribosome complex. We will pursue this goal and add *Drosophila* and the pathogenic protozoa *Trypanosoma* to the task. This will help elucidate a long-standing enigma in eukaryotic translation regulation. In addition, understanding selenocysteine incorporation in pathogenic protozoa is an invaluable step towards designing potential therapeutic drugs.

РИБОСОМАЛЬНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM*

Г.Ю. Фисунов, Д.В. Евсютина, В.М. Говорун ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Бактерии класса Молликут и, в частности, *Mycoplasma gallisepticum* являются удобными моделями минимальной клетки вследствие общей редукции. Нами ранее было показано, что ответ на сублетальный тепловой стресс у *M. gallisepticum* приводит к изменению транскрипции около 50% кодирующих последовательностей (CDS), а также к активации антисмысловой транскрипции. Полногеномное картирование точек инициации транскрипции показало множественную активацию дополнительных промоторов в тепловом стрессе. Мы показали, что транскрипционный ответ на тепловой стресс является в большей степени «шумовым», нежели адаптивным. В настоящей работе мы провели профилирование рибосомально-связанной мРНК *M. gallisepticum* для того чтобы определить, какие изменения экспрессии на уровне транскрипции передаются на уровень трансляции. Мы обнаружили, что количество CDS изменяющих представленность в рибосомально-связанной фракции существенно меньше, чем в тотальной РНК (256 против 430), и в целом профиль рибосомально-связанной мРНК в стрессе более коррелирует с таковым в контроле, нежели с тотальной РНК. Около половины изменений в тотальной и в рибосомально-связанной мРНК сонаправлены (131). Мы обнаружили, что в рибосомально-связанной мРНК гены рибосомальных белков снижают представленность, в то время как гены белков модификации аппарата трансляции её увеличивают. Кроме того, увеличивают представленность большое количество коротких рамок с неизвестной функцией. Рибосомы также обладают отрицательной селективностью по отношению к антисмысловым РНК, транскрипция которых увеличивается при стрессе. Мы обнаружили, что в кодирующие последовательности, увеличивающие представленность в рибосомах обогащены кодами АТА, СТС, СТГ, АГГ, ТСС, ТГС, ТГГ, ТТГ, а также альтернативными старт-кодонами GTG и TTG. Это явление, возможно, связано с наблюдаемыми изменениями экспрессии компонентов аппарата трансляции. В результате мы наблюдаем, что в тепловом стрессе происходит селективное связывание РНК с рибосомами, в результате которого «шумовые» изменения фильтруются, а адаптивные напротив, переходят с уровня транскрипции на уровень трансляции.

КАК И ПОЧЕМУ ВОЗНИК МАТРИЧНЫЙ МЕХАНИЗМ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ

Э.Я. Костецкий Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

Предполагается, что механизм матричного синтеза транскрипции и трансляции возник в дефектной области кристаллической решетки сокристаллизующихся минералов апатита, карбонатапатита и кальцита, имеющих взаимосогласованные пропорции, при участии радикалов и ионов газовой фазы (NH_3 , CH_4 и CO_2). Это область ритмичного изменения химического состава, изоморфных замещений и вакансий и возникновения значительной флуктуации энергии тепловых колебаний атомов, ведущих к возникновению очага беспорядка и необходимости сброса энергетического потенциала в виде стратификационных зон. Переход к дефектной зоне сопровождается нарастанием беспорядка и самоорганизации в кристалле упорядоченно организованных стратификационных зон. Все это реализуется в структуре органоминерального нуклеопротеидного комплекса. Система согласованных пропорций и наличие стратификационных зон в решетках минералов задают единый алгоритм построения будущих протоклеток. В зоне апатита и карбонатапатита самоорганизовывался тройной комплекс – ДНК, РНК, белок, по принципу стереоспецифической комплементарности, «спираль в спираль». Его основа – двойная спираль ДНК. Переход в кристалле апатита от бездефектной области к появлению беспорядка реализовывался в размерах и специфике нуклеотидов в генах ДНК, в виде постепенного перехода от сателлитной зоны (неинформативной части ДНК у эукариот) к многократно повторенной зоне пре-тДНК, умеренно повторенной зоне пре-рДНК и уникальной зоне генов пре-мДНК. Комплементарно этим областям в зоне карбонатапатита формировался РНК-белковый комплекс. Каждая пре-тРНК в матрице кристалла стереоспецифически взаимодействовала со своим белком (будущей ААтРНК-синтетазой), который уже имел в своем составе АТФ и аминокислоту. Каждая пре-рРНК и пре-мРНК тоже были связаны со своими белками, которых было много, в силу большей протяженности этих фрагментов по сравнению с пре-тРНК. За первыми белками, непосредственно взаимодействующими с ДНК или РНК, следовало большое количество других комплементарно связанных с ними белков. На втором этапе в присутствии воды органоминеральный кристаллический комплекс переходил в жидкокристаллическое метастабильное состояние, которое могло быть нарушено изменением концентрации ионов, появлением протоклеток и запуском матричного механизма.

ИЗМЕНЕНИЕ ПОЛОВОГО ПОВЕДЕНИЯ САМЦОВ ДРОЗОФИЛЫ ПРИ ДЕЛЕЦИИ ГЕНА QTS С ПОМОЩЬЮ НОВОГО МЕТОДА НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА

О.И. Кравчук, Е.Г. Белкина, В.С. Михайлов, О.Е. Лазебный, М.Ю. Савицкий
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Разработан новый метод получения делеционных мутантов у дрозофилы, позволяющий удалить ген-мишень и последовательность до ближайшего attP сайта в любом месте генома. Наличие большого количества линий дрозофилы, несущих attP сайты в разных местах генома позволяет осуществлять сайт-специфическую интеграцию трансгенов и получать делеционные мутанты разных генов. Метод основан на внедрении рядом с геном сайтов узнавания для I-SceI мегануклеазы, дуплицированной последовательности из гена-мишени и фенотипического маркера, облегчающего отбор редких репарационных событий. Эффективность метода снижается при увеличении расстояния от гена-мишени до attP сайта. Чтобы оценить границы

применения метода, мы получили небольшую 13 тпн делецию на 2L хромосоме, включающую ген hermaphrodite (her), и протяженную 130 тпн делецию на 2R хромосоме, включающую ген transformer 2 (tra2). После внедрения конструкций и активации I-SceI было просмотрено 418 мух для her и 1964 мухи для tra2 и обнаружено соответственно 21 и 14 мух, потерявших фенотипический маркер. Эти мухи были проанализированы с помощью ПЦР и секвенирования. В случае her 13 мух из 21 несли делецию размером 14,5 тпн, в случае tra2 делецию размером 131 тпн имела 1 муха из 14. Таким образом, хотя частота возникновения делеций снижается при увеличении расстояния от гена-мишени до attP сайта, метод позволяет получать делеции на расстоянии более 100 тпн от attP сайта. С помощью предложенного метода получена делеция размером 47 тпн, включающая ген qtc, который определяет аспекты полового поведения у самцов. Мухи с делецией были исследованы в поведенческих тестах по 3 показателям: латентное время (время от заброса самца к самке до начала ухаживания), длительность ухаживания (время от начала ухаживания до копуляции) и время от начала теста до наступления копуляции. Мухи с делецией гена qtc показали уменьшение приблизительно в два раза длительности ухаживания (112 секунд у контрольных мух и 57 секунд у делеционных мутантов). Различия в продолжительности периода ухаживания у контрольных мух и мух с делецией qtc были статистически достоверны согласно критерию Стьюдента ($p=0,049$). Проведенное исследование подтверждает высокую эффективность нового метода получения мутаций для исследования функции различных генов дрозофилы.

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО МЕХАНИЗМА СИГНАЛЬНОГО ПУТИ, ЗАДЕЙСТВОВАННОГО В ОТВЕТЕ КЛЕТОК НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

В.П. Вейко¹, С.В. Костюк², Е.С. Ершова², Н.Н. Мордкович¹, Н.А. Окорокова¹ ¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН; ²Медико-генетический научный центр, Москва, Россия

Внеклеточная ДНК (вкДНК) является активным компонентом, способным встраиваться в геном нормальных клеток, предопределяя их трансформацию. Для выяснения локализации вкДНК в зависимости от ее G/C-состава и наличия в ней окисленных оснований были использованы флуоресцентно-меченные ДНК-зонды (SpectrumGreen и SpectrumRed). В качестве модельных ДНК-фрагментов исследовали: окисленную (оДНК) и неокисленную (гДНК) геномную ДНК здоровых доноров, окисленную и неокисленную формы плазмид, содержащих: G/C богатый фрагмент гена рРНК. Меченную ДНК добавляли в среду культивирования аденокарциномы молочной железы (MCF7) в концентрации 50 нг/мл и анализировали флуоресценцию клеток. гДНК и G/C-богатая ДНК спустя 30 мин культивирования преимущественно локализовалась на поверхности клеток MCF7 и только 3–5% меченных фрагментов проникало внутрь клеток, располагаясь вблизи цитоплазматической мембраны. Окисленные фрагменты оДНК (до 90%) локализовались внутри цитоплазмы клеток (MCF7) вблизи ядра, а около 10% оДНК располагалось в виде отдельных гранул по периферии цитоплазмы. Т. к. оДНК содержит 8-oxodG, она была визуализирована с использованием антител к 8-oxodG, конъюгированными с FITC. Предполагается, что взаимодействие гДНК с клеточными структурами стимулирует синтез АФК в месте их контакта. Окрашиванием клеток MCF7 одновременно Mito-trackerRed 580 (TMRM red) и H2DCFH-DA показано, что оДНК является сильным индуктором синтеза АФК, а локализация оДНК совпадает с расположением митохондрий и сопровождается окислительной модификацией ДНК ядер клеток с появлением разрывов ДНК. На основе плазмиды pEGFP-C1 сконструированы плазмиды, содержащие различное количество поли-G фрагментов ДНК и фрагмент гена рРНК человека. Уровень проникновения окисленных и неокисленных плазмид в клетки MCF-7 определяли по уровню экспрессии маркерного гена (GFP). Обсуждается роль окисленных участков поли-G в транслокации ДНК в клетки злокачественных опухолей. *Исследование выполнено при поддержке РФФИ (Грант №16-04-00576).*

БЕЛКИ: РАЗНООБРАЗИЕ ФУНКЦИЙ

PROTEIN MIMICRY: FUNCTIONAL MIMICS OR GIMMICKS?

Bérangère Aavale, Melody Shahsavarian, Rita Maalouf, Nancy Chaaya, Séverine Padiolleau-Lefevre, Alain Friboulet
"Génie Enzymatique et Cellulaire", Université de Technologie de Compiègne, CNRS FRE 3580, Compiègne, France

A highly attractive feature of proteins and peptides is their ability to mimic naturally occurring bioactive compounds. A notable expansion of the search for compounds exploiting this property for their use in therapeutic applications has emerged in the last years.

Proteins as structural and functional mimics.

A good evidence for the mimicry property of proteins was given by the induction of antibodies bearing enzymatic features. Since the introduction of the network theory of immune regulation, the properties of anti-idiotypic antibodies have been investigated widely. As an example, the anti-idiotypic network strategy was used in the 1990s by our group to generate a catalytic antibody with esterase, amidase and protease activities.

Peptides as structural biological imprints of protein targets.

On the other hand, an increasing interest concerns peptides as a source of potential new therapeutic agents, together with their use to complement existing genomic methodologies for deciphering complex biological processes. By using a random library of cyclic peptide expressed on the surface of bacteriophages, we have shown that peptides can be selected against catalytic anti-idiotypic antibodies that inhibit the activity of the catalytic antibody used for the selection, but also of the parental enzyme. In some cases, the peptides were also found to inhibit the activity of structurally related proteins.

Peptides as targets for the selection of bioactive proteins.

Are selected peptides negative images of abzyme and enzyme active sites, or are these peptides just chemical binders of catalytic residues. To try to partially answer this question, a phage displayed library of murine antibodies was used to select potential catalytic antibodies against previously selected peptides. From these experiments, we obtained different antibodies with catalytic activity.

All these results show that both structural and functional properties can be transferred from one protein, an enzyme, to an anti-idiotypic antibody, via the imprint of the active site by an anti-active site antibody. More surprisingly, by using a peptide selected against the catalytic site of the anti-idiotypic antibody, it is possible to select antibodies endowed with a catalytic activity closed to that of the initial enzyme. This four-step study suggests the high conservation in the transfer of both structural and functional information in protein-protein and peptide-protein interactions.

NOVEL FUNCTION OF CYCLINS: BEYOND CELL CYCLE CONTROL

Richard Pestell Sidney Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA

The *cyclin D1* gene encodes the regulatory subunit of a holoenzyme that phosphorylates and inactivates the retinoblastoma (Rb) and the nuclear respiratory factor 1 (NRF1) proteins to induce nuclear DNA synthesis and restrain mitochondrial biogenesis. *Cyclin D1* overexpression occurs in human breast, prostate, lung, and gastrointestinal malignancies. Although cyclin-dependent kinase activity is frequently increased in most tumors, surprisingly, therapies targeting the cyclin-dependent kinase activity have been effective in only a small subset of tumor types. Although initially characterized for their cell cycle control function, the G₁ cyclins have subsequently been shown to convey additional functions, governing gene transcription, interacting with diverse proteins thereby participating in cellular invasion and DNA repair. Furthermore cyclin D1 serves as a chaperone to recruit modifying enzymes (histone acetylases, and deacetylases, histone methylases), and regulates processing of miRNA via Dicer. In order to identify additional potential targets mechanism by which cyclins may participate in oncogenesis we have conducted mutational analysis in mice.

We show cyclin D1 gene overexpression is sufficient for the induction of mammary tumorigenesis and can do so in a kinase-independent manner. Cyclin D1 plays a role in transcriptional regulation inducing expression of ~760 genes in one study and ~90% of all estrogen-responsive gene expression in the mammary gland depends upon cyclin D1 *in vivo*. Cyclin D1 induces gene expression governing chromosomal instability (CIN) and cell-cycle progression, and represses gene expression involved in differentiation and mitochondrial metabolism.

The mechanism by which cyclin D1 induces gene expression occurs via E2F-dependent and E2F-independent mechanisms that involves binding to transcription factors. Cyclin D1 recruitment to induced gene regulatory regions enriched for p300/HP1 α and reduced HDAC3/SUV39H1. Cyclin D1 recruitment to target genes and the induction of chromosomal instability was dissociable from its kinase function requiring an intrinsically disordered carboxyl-terminus and glutamate motif that is conserved with >149 proteins involved in chromatin association and remodeling. The cyclin D1 epigenetic interaction motif bound H3, acetylated or methylated on specific residues. The recognition of an epigenetic code by cyclin D1 may facilitate genome wide expression changes during cell-cycle progression and tumorigenesis [1-4].

1. Casimiro, M.C., et al., Kinase-independent role of cyclin D1 in chromosomal instability and mammary tumorigenesis. *Oncotarget*, 2015. 6(11): p. 8525-38.
2. Casimiro, M.C., et al., 27(9): p. 1415-28.
3. Casimiro, M.C., et al., The Journal of Clinical Investigation, 2012. 122(3): p. 833-43.
4. Pestell, R.G., Am J Pathol, 2013. 183(1): p. 3-9.

HOW DOES A PHOSPHOMUTASE CATALYSE TWO NATIVE REACTIONS?

Jonathan Walther Manchester Institute of Biotechnology, The University of Manchester, UK

Using a combination of multinuclear NMR spectroscopy, high resolution X-ray crystallography, synthetic chemistry and computational chemistry we have explored the conformational behaviour of a variety of enzymes under a wide range of conditions. Recently, our group has focused on enzymes that catalyse the transfer of phosphoryl groups [1-6], where the non-catalysed reactions can be among the slowest known for a physiological process: phosphate monoesters, for example, have calculated lifetimes to spontaneous hydrolysis of up to 1012 years. We are using a range of phosphoryl transfer enzymes to unravel what contributes to the very high levels of catalysis achieved by these enzymes. Here, we will focus on the reactions of beta-phosphoglucomutase, which catalyses the conversion of beta-glucose 1-phosphate to glucose 6-phosphate via a beta-glucose 1,6-bisphosphate intermediate. Specifically, through the introduction of metal fluoride species that mimic the ground states or the transition states of phosphoryl group transfer, we have dissected the steps involved in the reaction pathway for both native phosphoryl transfer reactions (i.e. both protein conformational steps and chemical steps). The presence of fluoride ions in the active site further allows us to dissect how the enzyme modulates the electronic environment experienced by the transferring phosphoryl group at different stages of the reaction pathway. We will show how this enzyme tightly controls the charge distribution in the close vicinity of the transferring phosphate, and how near transition state complex conformations react to modulation of these charges. We will present our latest observations detailing how this enzyme controls domain closure, and how the distributions of protons play key roles in controlling catalysis.

1. Cliff, M. J. et al., J. Am. Chem. Soc. 132, 6507-6516 (2010).
2. Baxter, N. J. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 107, 4555-4560 (2010).
3. Liu, X. et al., J. Am. Chem. Soc. 133, 3989-3994 (2011).
4. Griffin, J. L. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 109, 6910-6915 (2012).
5. Jin, Y. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 111, 12384-12389 (2014).
6. Jin, Y. et al., Angew. Chemie 128, 3379-3383 (2016).

STRAIN AS THE DRIVING FORCE FOR CATALYSIS IN ASPARTATE AMINOTRANSFERASE

Hideyuki Hayashi, Takeshi Murakawa

Departments of Chemistry and Biochemistry, Osaka Medical College, Takatsuki, 569-8686, Japan

Aspartate aminotransferase (AspAT) is a pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent enzyme and catalyzes a reversible amino group transfer between L-aspartate and 2-oxoglutarate to form oxalacetate and glutamate. Structural, kinetic, and mutagenesis studies have revealed the detailed reaction mechanism of this enzyme. However, there remain many unsolved problems, especially with respect to the involvement of the protein moiety in the catalytic reaction. We sought to clarify this point using combined structural, transient kinetic, and theoretical analyses. Comparison of the high resolution structures of AspAT complexed with C4 and C3 dicarboxylic analogues showed that the conformational change of AspAT from the open to the closed form causes a strain on the PLP-Lys258 aldimine, which is considered to be the driving force for the transaldimination reaction from the Michaelis complex (AspAT holoenzyme complexed with aspartate) to the external aldimine complex (AspAT complexed with the Schiff base of PLP and aspartate). Stopped-flow spectroscopic analysis of the reaction of AspAT with aspartate at various pH showed that a proton is shared between the PLP-Lys258 aldimine and the α -amino group of the substrate in the Michaelis complex, and between the PLP-aspartate aldimine and the ϵ -amino group of Lys258 in the external aldimine complex. In the AspAT-maleate complex, the interaction of the C α and C β of the ligand with the PLP-Lys258 aldimine reduces the strain of the aldimine inherent to the unliganded enzyme, thereby increasing the

pK_a of the PLP–Lys258 aldimine, i.e., increasing the fraction of the protonated form of the PLP–Lys258 aldimine, and promoting the transaldimination. In the external aldimine complex, the PLP–aspartate aldimine has a near planar fixed conformation and the pK_a of the PLP aldimine is even more increased. This increases the fraction of the unprotonated form of the ϵ -amino group of Lys258, which abstracts the proton from C α of the external aldimine and generates the quinonoid intermediate. The reaction mechanism presented here is tested by QM/MM analysis.

INHIBITING ASPARAGINE BIOSYNTHESIS IN HUMAN CELLS: A NEW APPROACH TO DEVELOPING ANTI-CANCER AGENTS

Nigel Richards *School of Chemistry, Cardiff University, Park Place, Cardiff, UK*

There is increased interest in how the alteration of key metabolic processes can enhance tumorigenesis, and in how these changes might be disrupted in anti-cancer therapies. There is ample evidence that asparagine depletion exerts a tumoricidal effect and the enzyme that mediates asparagine biosynthesis, asparagine synthetase (ASNS), has become of increasing interest as a drug target [1]. For example, knockdown of ASNS expression by small-interfering RNAs in androgen-response and castration-resistant prostate cancer lines inhibited their growth in media devoid of asparagine [2]. Similar effects of ASNS knockdown were observed in breast cancer cell lines [3], and it appears that asparagine is essential for tumor growth and survival because it is used as an amino acid “exchange factor” [4]. Compounds that can be used to inhibit ASNS therefore represent potential anti-cancer drugs. In recent years, our group has identified the first potent inhibitors of human ASNS using structure-based methods for drug discovery [5,6] and has also constructed a working model (based on the crystal structure of *Escherichia coli* AS-B) [7] of how the inhibitor is bound within the enzyme. Progress in delineating the structural features that mediate inhibitor recognition and bioactivity will be discussed together with the results of *in silico* screening calculations using an optimized model of ASNS complexed to a key reaction intermediate (unpublished observations). These docking studies have identified a new structural motif for ASNS inhibitors that should permit the development of compounds with improved cell permeability.

1. N G J Richards and M S Kilberg (2006) Annual Review of Biochemistry **75**, 629.
2. K Sircar, H Huang, L Hu, D Cogdell, J Dhillon, V Tzelepi, E Efstathiou, I H Koumakpayi, F Saad, D Luo, T A Bismar, A Aparicio, P Troncoso, N Navone and W Zhang (2012) American Journal of Pathology **180**, 895.
3. H Yang, X He, Y Zheng, W Feng, X Xia, X Yu and Z Lin (2014) Chemical Biology & Drug Design **84**, 578.
4. A S Krall, S Xu, T G Graeber, D. Braas and H R Christofk (2016) Nature Communications **7**, 11457.
5. J A Gutierrez, X-Y Pan, L Koroniak, J Hiratake, M S Kiberg and N G J Richards (2006) Chemistry & Biology **13**, 1339.
6. H Ikeuchi, Y. Ahn, T Otokawa, B Watanabe, L S Hegazy, J Hiratake and N G J Richards (2012) Bioorganic & Medicinal Chemistry **20**, 5915.
7. T M Larsen, S K Boehlein, S M Schuster, N G J Richards, J B Thoden, H M Holden and I Rayment (1999) Biochemistry **38**, 16146.

GROUND-STATE DESTABILIZATION IN PYRIDOXAL-5'-PHOSPHATE DEPENDENT ENZYMES: TYROSINE PHENOL-LYASE AND TRYPTOPHAN INDOLE-LYASE

Robert S. Phillips *Department of Chemistry and Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Georgia, Athens, USA*

Stereoelectronic effects have been proposed by Dunathan to play a significant role in the mechanisms of pyridoxal-5'-phosphate (PLP) dependent enzymes [1]. However, these effects have been generally assumed to be involved in transition-state stabilization. Recently, evidence has been discovered that ground-state destabilization may play a major role in catalysis of PLP-dependent enzymes. We have found that the crystal structure of *Citrobacter freundii* tyrosine phenol-lyase (TPL) mutants with bound substrate, 3-fluoro-L-tyrosine, shows clear distortion of the substrate aromatic ring in the direction leading to the transition-state geometry [2]. The strain in TPL is created by steric clashes between the substrate and conserved Phe-448 and Phe-449 that move into contact with substrate upon closure of the active site. Mutation of these phenylalanines to alanine results in $\sim 10^8$ fold decrease in catalytic activity, suggesting that ground-state destabilization contributes $\geq 50\%$ to catalysis. Furthermore, the crystal structure of *Proteus vulgaris* tryptophan indole-lyase (TIL) complexed with a potent inhibitor, oxindolyl-L-alanine, shows a similar closed active site. Conserved phenylalanines, Phe-37 and Phe-459, are in close contact with the aromatic ring of the substrate analog. Modeling of the tryptophan quinonoid complex in the closed active site shows a severe clash of the substrate aromatic ring with Phe-37 and Phe-459. Mutation of Phe-464 (homologous to 459) in *E. coli* TIL to alanine results in a 300-fold decrease in catalytic activity with L-tryptophan, but not S-ethyl-L-cysteine or S-(*o*-nitrophenyl)-L-cysteine. F464A TIL readily forms quinonoid complexes with L-tryptophan and S-ethyl-L-cysteine, and an aminoacrylate complex with S-ethyl-L-cysteine. These results suggest that ground-state destabilization also plays a significant role in TIL catalysis.

[1] H. C. Dunathan, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **55**, 712-716 (1966).

[2] D. Milic, T. V. Demidkina, N. G. Faleev, R. S. Phillips, D. Matkovic-Calogovic, A. A. Antson, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 16468-16476 (2011).

HEPATITIS DELTA VIRUS AND ITS ANTIGENS INDUCE OXIDATIVE AND ENDOPLASMIC RETICULUM STRESSES

Olga Smirnova¹, Olga Khomich¹, Vera Tunitskaya¹, Vladimir Valuev-Elliston¹, Daria Tyurina¹, Birke Bartosch², Sergey Kochetkov¹, Alexander Ivanov¹ ¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; ²Inserm U1052, Cancer Research Center Lyon, University of Lyon, France

Hepatitis delta virus (HDV) is a viroid-like satellite that accompanies hepatitis B virus (HBV). HDV/HBV co-infection leads to severe acute hepatitis, whereas infection with HDV of the patients with chronic hepatitis B results in a markedly increased risks of liver cirrhosis and cancer. The mechanisms of HDV pathogenesis remain mostly unknown. HDV genome contains a single open reading frame encoding an antigen called small (S-HDAg). However, deamination of a stop-codon in a viral antigenomic RNA results in elongation of the open reading frame and to production of a large antigen (L-HDAg). Neither form of the antigen is directly involved in virus assembly or genome replication. In contrast, they were assigned to regulatory roles including an ability of L-HDAg to trigger production of reactive oxygen species (ROS) through induction of NADPH oxidase 4 (NOX4). Our goal was to investigate mechanisms by which HDV antigen(s) promote ROS production, what effect they cause on antioxidant defense pathways, and whether they can induce ER stress and unfolded protein response (UPR). Here we show that L-HDAg triggers massive production of ROS including superoxide anions. It is observed in cells overexpressing individual antigen or harbouring full genome of the virus and ensuring

both antigens. Increase in ROS levels was accompanied by induction of several ROS-generating enzymes: NOX1 and NOX4, cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) and ER oxidoreductin 1 α (Ero1 α). In addition, L-HDAg activated an Nrf2/ARE pathway that controls expression of an array of enzymes involved in protection against oxidative stress. Finally, we also showed that both small and large antigens triggered ER stress and a concomitant UPR.

Acknowledgements. The work was supported by Russian Foundation for Basic Research (grant 16-04-01490).

CATALYTIC MECHANISM AND STRUCTURAL ORGANIZATION OF *ESCHERICHIA COLI* GLUTAMATE DECARBOXYLASE

Fabio Giovannercole, Eugenia Pennacchietti, Daniela De Biase

Istituto Pasteur-Fondazione Cenci Bolognietti, Department of Medico-Surgical Sciences and Biotechnologies, Sapienza University of Rome, Italy

Escherichia coli glutamate decarboxylase is a homohexameric PLP-dependent enzyme and a major structural component of the glutamate-based acid resistance system in this microorganism as well as in many orally-acquired neutralophilic bacteria [1, 2]. In fact the decarboxylation of *L*-glutamate, besides yielding γ -aminobutyrate (GABA) and CO₂, consumes one proton/catalytic cycle, an activity shown to be beneficial for protecting the bacterial cell under extreme acid stress [1].

Our group has greatly contributed to the characterization of one of the two *E. coli* isoforms, the B isoform (EcGadB), and provided experimental evidence for the structural bases of its pH-dependency in activity in the acid range [for a review, 1]. In fact the crystal structures of EcGadB at neutral and acidic pH, as well as in the presence of halides, show that the enzyme undergoes significant structural reorganizations at the N-terminal end (residues 1-14), in a β -hairpin (residues 300-313) and at the C-terminal end (residues 452-466). Based on the crystal structures, the likely candidates for controlling the acidic range of activity of EcGad were proposed and investigated [3-5]. By means of different spectroscopic and biophysical techniques, we have now further investigated the structural organization of the EcGadB in solution.

Moreover, we have recently completed a detailed biochemical characterization of the mutant Asp86Asn. Our data show that, unlike wild-type EcGadB, this mutant, while retaining substrate specificity, is not only a more robust catalyst at pH >7 but also displays an altered solvent kinetic isotope effect. Thus, based on our data, pH is no longer a limiting reaction parameter in this mutant. Mutant forms of EcGadB, less sensitive to pH increase (i.e. > 5.5), are highly desirable as they can be exploited for GABA synthesis at the industrial level [6]. GABA in turn can be used as precursor of 2-pyrrolidone, an industrial solvent, and of nylon 4.

1. De Biase D, Pennacchietti E. (2012) Mol. Microbiol 86: 770-86.
2. Lund P, Tramonti A, De Biase D. (2014) FEMS Microbiol Rev 38: 1091-125.
3. Capitani G, De Biase D, et al. (2003) EMBO J. 22: 4027-4037.
4. Gut H, Pennacchietti E, et al. (2006) EMBO J. 25: 2643-2651.
5. Pennacchietti E, Lammens TM, et al. (2009) J Biol Chem. 284: 31587-96.
6. Lammens TM, De Biase D, et al. (2009) Green Chemistry 11: 1562-67.

METABOLIC REPROGRAMMING – A HALLMARK OF ONCOGENIC VIRUSES

Pierre Levy¹, Sarah Duponchel¹, Jennifer Molle¹, Margarete Odenthal², Fabien Zoulim¹, Birke Bartosch¹

¹Inserm U1052, Cancer Research Center of Lyon, University of Lyon, Lyon, France; ²Institute of Pathology, University of Cologne, Germany

More than one in ten cases of cancer in the world are due to chronic viral infections. Viruses induce oncogenesis by targeting the same pathways known to be responsible for neoplasia in tumor cells, such as control of cell cycle progression, cell migration, proliferation and evasion from cell death and the host's immune defense. In addition, metabolic reprogramming, characterized by activation of biosynthetic pathways has been identified over a century ago as a requirement for growth of transformed cells in order to provide sufficient levels of energy and building blocks for proliferation. Interestingly, viruses introduce into their host cells similar metabolic adaptations, and importantly, it seems that they depend on these changes for their persistence and amplification. The central carbon metabolism, for example is not only frequently altered in tumor cells but also modulated by human papillomavirus, Epstein-Barr virus, Kaposi's Sarcoma-associated virus and hepatitis B and C viruses. For example, metabolic adaptations induced by hepatitis C virus (HCV), a major cause of hepatocellular carcinoma, target in particular glycolysis and glutaminolysis, metabolic pathways known to play an important role in neoplastic transformation as they ensure the balance between cellular energetics, biosynthesis and stress defense. While HCV induces glutaminolysis to create an environment favorable for viral replication, it predisposes infected cells to transformation. Thus glutaminolytic but also glycolytic enzymes are emerging as interesting therapeutic targets for prevention of hepatocarcinogenesis in the context of chronic hepatitis, but potentially also in the context of infection with other oncogenic viruses.

ТРАНСАМИНАЗЫ РАЗВЕТВЛЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ ИЗ АРХЕЙ *THERMOPROTEUS UZONIENSIS* И *VULCANISAETA MOUTNOVSKIA*: ТИПИЧНАЯ СТРУКТУРА И НЕТИПИЧНАЯ СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Е.Ю. Безсуднова, К.М. Бойко, А.В. Марданов, А.Ю. Николаева, Т.Н. Стеханова, Д.А. Суплатов, Н.В. Равин, В.О. Попов

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Необычная субстратная специфичность обнаружена у трансаминаз из кренархеот *Thermoproteus uzoniensis* и *Vulcanisaeta moutnovskia*. По первичной последовательности и третичной структуре оба фермента относятся к трансаминазам разветвленных аминокислот или BCAT (branched-chain amino acid aminotransferase). BCAT являются ключевыми ферментами метаболизма *L*-аминокислот в археях, бактериях и эукариотах, где катализируют обратимый перенос аминогруппы с природных субстратов на альфа-кетоглутарат. В литературе детально описаны BCAT из бактерий и эукариот; эти ферменты активны с протеиногенными разветвленными *L*-аминокислотами и их неприродными аналогами, с ароматическими *L*-аминокислотами, *L*-цистеином и *L*-метионином. Охарактеризованные нами BCAT из кренархеот отличаются высокой термостабильностью (активны до 95°C) и необычной специфичностью к положительно заряженным аминокислотам (*L*-орнитину, *L*-лизину, *L*-аргинину и *L*-гистидину). При этом оба фермента активны с природными и неприродными разветвленными *L*-аминокислотами, но неактивны с типичным для BCAT аминокислотным акцептором – альфа-кетоглутаратом. Вместо него вторым субстратом в реакции трансаминирования выступают пируват и оксобутират. Оба фермента также активны с *R*-метилбензиламином, что подтверждает предсказанную для BCAT *R*-селективность в реакциях с аминами. Нам удалось кристаллизовать BCAT из *T. uzoniensis* и впервые решить структуру BCAT из архей. По структуре архейная BCAT относится

к IV типу фолда PLP-связывающих ферментов. Детальный анализ субстрат связывающих карманов в BCAT из *T. uzoniensis* выявил некоторые отличия в организации активного центра от структуры типичной BCAT из *E. coli*, активной с альфа-кетоглутаратом. Моделирование L-орнитина и L-глутамата в активном центре BCAT из *T. uzoniensis* позволило выявить в субстратном кармане центр связывания для положительно заряженной боковой группы субстрата (сближенные боковые группы двух глутаматов), который, по-видимому, также мешает продуктивному связыванию L-глутаминовой кислоты и альфа-кетоглутарата. Уровень сходства последовательностей трансаминаз из *T. uzoniensis* и *V. moutnovskia* составил 54%. Гомологичные новым BCAT трансаминазы обнаружены только в археях порядка Thermoproteales. Работа поддержана грантом РФФИ 14-24-00172 и грантом "Thermogene".

СИНЕРГИЧЕСКОЕ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРОВ СЛИТНОГО ОНКОБЕЛКА RUNX1-ЕТО И ERK2/МАРК КИНАЗЫ НА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ КЛЕТКИ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА С ТРАНСЛОКАЦИЕЙ Т(8;21)

П.В. Спирин, В.С. Прасолов Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

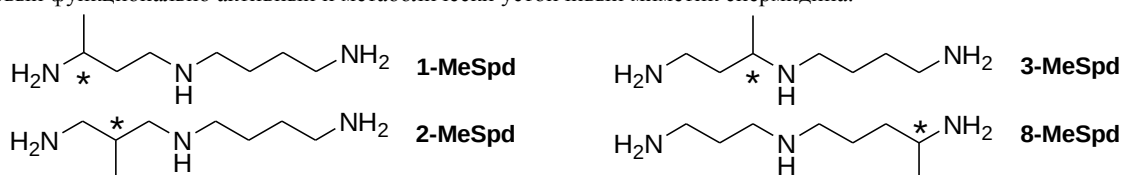
Хромосомная транслокация t(8;21)(q22;q22) с высокой частотой присутствует в злокачественных клетках при остром миелоидном лейкозе и t(8;21) приводит к появлению транскриптов, кодирующих слитный белок RUNX1-RUNX1T1, который в настоящее время рассматривается как перспективная мишень для терапии t(8;21) лейкозов. Экспрессии только одного слитного гена RUNX1-RUNX1T1 недостаточно для развития лейкоза, поэтому терапевтическая эффективность такого подхода неочевидна. Присутствие RUNX1-RUNX1T1 приводит к активации ключевых генов, кодирующих белки, участвующие в опухолевой прогрессии, однако роль сигнальных путей, в которых задействованы эти гены остается невыясненной. Ранее мы использовали РНК-интерференцию (RNAi) для выяснения функционального значения подавления RUNX1-RUNX1T1 в t(8;21)- AML позитивных клетках линии Kasumi-1. Было отмечено существенное снижение экспрессии гена KIT, подавление роста и усиление апоптоза лейкозных клеток. Было продемонстрировано, что подавление RUNX1-RUNX1T1 приводит к усилению одних и подавлению других сигнальных путей, увеличивая выживаемость и пролиферацию клеток. При этом киназа ERK2, один из основных регуляторных белковых факторов, ответственных за пролиферацию, вероятно, является активирующим звеном большинства этих сигнальных путей. Таким образом, ERK2 может рассматриваться как один из основных игроков, препятствующих успешному проведению анти-RUNX1-RUNX1T1 терапии. С использованием низкомолекулярных синтетических ингибиторов было показано, что подавление активности ERK2 в t(8;21)-позитивных клетках сообщает им высокую чувствительность к ингибиторам RUNX1-RUNX1T1. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (14-14-01089 и 14-50-00060).

МЕТИЛИРОВАННЫЕ АНАЛОГИ СПЕРМИДИНА – ИНСТРУМЕНТ ИССЛЕДОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ФУНКЦИЙ ПОЛИАМИНОВ И ФЕРМЕНТОВ ИХ МЕТАБОЛИЗМА

А.Р. Хомутов Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Биогенные полиамины спермин и спермидин жизненно необходимы для нормального роста клеток, а многообразие их функций позволяет рассматривать полиамины в качестве универсальных низкомолекулярных регуляторов клеточного метаболизма. Изучение биологических эффектов направленно созданных аналогов полиаминов с заданным комплексом свойств и по сей день остается важным подходом, позволяющим изучать клеточные функции легко взаимопревращающихся и частично взаимозаменяемых спермина и спермидина.

На основании метилированных производных спермидина создана оригинальная система аналогов полиаминов, включая первый функционально активный и метаболически устойчивый миметик спермидина:



Биохимические свойства веществ этого семейства оказалось возможным регулировать перемещая метильную группу по скелету полиамина, а на более тонком уровне – изменяя конфигурацию хирального центра.

Обсуждаются перспективы использования созданной системы аналогов и активность в культуре клеток и по отношению к ключевым ферментам метаболизма спермидина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант 14-04-01099).

- Keinänen T.A., Hyyönen M.T., Alhonen L., Vepsäläinen J., Khomutov A.R. "Selective regulation of polyamine metabolism with methylated polyamine analogues". *Amino Acids* **Amino Acids**, 46(3), 605-620 (2014) – обзор.
- Hyyönen M.T., Khomutov M., Petit M., Weisell J., Kochetkov S.N., Alhonen L., Vepsäläinen J., Khomutov A.R., Keinänen T.A. "Enantiomers of 3-methylspermidine selectively modulate deoxyhypusine synthesis and reveal important determinants for spermidine transport". *ACS Chem.Biol.*, 10(6), 1417-1424 (2015).
- Kim S.H., Wang Y., Khomutov M., Khomutov A., Fuqua C., Michael A.J. "The essential role of spermidine in growth of *Agrobacterium tumefaciens* is determined by the 1,3-diaminopropane moiety". *ACS Chem.Biol.*, 11(2), 491-499 (2016).

НОВЫЕ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ: ВЗАИМОСВЯЗЬ СТРУКТУРА-ФУНКЦИЯ

А.А. Пометун (Алексеева)^{1,3}, С.А. Зарубина^{2,3}, П.А. Паршин², И.С. Каргов^{2,3}, С.С. Савин^{2,3}, В.И. Тишков^{1,2,3}

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ³ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», Москва, Россия

NAD⁺-зависимая формиаатдегидрогеназа (ФДГ, КФ 1.2.1.2.) является белком стресса для растений, патогенных бактерий и дрожжей. Также этот фермент широко используется в биотехнологических процессах для регенерации кофактора. Все вышесказанное обуславливает интерес к этому ферменту как с фундаментальной, так и с прикладной точек зрения. В нашей лаборатории проводятся систематические исследования по клонированию и экспрессии в *E. coli* генов ФДГ из разных ис-

точников. Все ферментативные дегидрогеназы, для которых было проведено клонирование и экспрессия гена, получены в активной форме и охарактеризованы. Также нами проводятся систематические исследования взаимосвязи структура-функция этого фермента – поиск в банках данных и анализ аминокислотных последовательностей ФДГ из различных источников, изучение свойств клонированных ФДГ дикого типа, кристаллизация, решение и анализ трехмерных структур, эксперименты по рациональному дизайну для получения мутантных ФДГ с новыми или улучшенными свойствами. В настоящем докладе представлены последние данные по сравнению свойств и структурных особенностей новых ФДГ из различных источников. Недавно нами были клонированы гены трех новых ФДГ – из патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* (SauFDH), термотолерантных дрожжей *Ogataea parapolymorpha* (OpaFDH) и мха *Physcomitrella patens* (PraFDH). Было показано, что по аминокислотной последовательности SauFDH является наиболее эволюционно удаленным белком от ФДГ из других источников, а также значительно отличается по своим кинетическим свойствам – у SauFDH Км по обоим субстратам были в несколько раз хуже, а по удельной активности минимум в 2,5 раза выше, чем соответствующие значения у других описанных в литературе ФДГ. Кроме того, SauFDH демонстрирует одну из самых высоких среди ФДГ термостабильностей.

Новые и важные результаты также были получены и для ФДГ из эукариот. Сравнение свойств рекомбинантной OpaFDH с другими ФДГ показало, что OpaFDH имеет одни из самых лучших показателей каталитической эффективности, сравнимые с данными для ФДГ из растений и при этом является гораздо более термостабильным белком, уступающим только ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (PseFDH) и SauFDH. Нами было впервые в мире проведено клонирование полноразмерного гена ФДГ из мха. После клонирования полноразмерная PraFDH, включающая и сигнальный пептид размером более 60 аминокислот, также впервые в мире для ФДГ растений была экспрессирована в клетках *E. coli* в растворимой и активной форме. Ранее для других ФДГ растений такие эксперименты заканчивались получением телец включения. Был проведен анализ структуры и размера сигнального пептида (один из самых длинных среди генов ALU растений) и предложено несколько точек отщепления сигнального пептида. Ферменты с укороченным N-концом были получены и охарактеризованы. Показано, что для одной из форм PraFDH уровень экспрессии в клетках *E. coli* почти в 10 раз выше по сравнению с другими вариантами и полноразмерным ферментом, что может косвенно свидетельствовать о том, что именно такая форма PraFDH преимущественно синтезируется в клетке. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 16-14-00043) и Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 14-04-01625-а, 14-04-01665-а).

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОКСИДОРЕДУКТАЗ

В.И. Тишков^{1,2,3}, А.А. Пометун (Алексеева)^{1,3}, С.А. Зарубина^{2,3}, И.С. Каргов^{2,3}, Т.С. Виролайнен^{2,3}, Д.Л. Атрошенко^{2,3}, Н.В. Комарова^{2,3}, И.В. Голубев^{2,3}, Д.М. Хушпульян^{2,3}, Г.С. Захарова^{1,3}, Т.А. Чубарь^{2,3}, И.Г. Газарян^{2,3}, Е. D'Oronzio⁴, S. Facheris⁴, F. Secundo⁴, С.С. Савин^{2,3} ¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ³ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», Москва, Россия; ⁴Институт химии молекулярного распознавания, CNR, Милан, Италия

Оксидоредуктазы играют важную физиологическую роль и широко используются на практике. В нашей лаборатории проводятся систематические исследования NAD⁺-зависимых ферментативных дегидрогеназ (ФДГ), оксидазы D-аминокислот (ДАО) и пероксидазы из корней хрена и листьев табака (HRP и TOR соответственно). Для структурно-функциональных исследований используется метод рационального дизайна, который заключается в применении направленного мутагенеза, а выбор перспективных для замены аминокислотных остатков основа на анализе трехмерных структур и биоинформационном поиске в базах данных. В случае ферментативных дегидрогеназ данных подход был применен для ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101, *Staphylococcus aureus*, пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, термотолерантных дрожжей *Ogataea parapolymorpha* (OpaFDH), сои *Glycine max* и др. В результате были получены мутантные ферменты с улучшенными значениями Км и k_{cat} , повышенной термостабильностью как в водных буферных растворах и водных растворах мочевины, так и в ионных жидкостях и двухфазных системах на основе вода-полиэтиленгликоль-соль. Также были получены высокоактивные мутантные ФДГ с измененной коферментной специфичностью. Для оксидазы D-аминокислот были получены мутантные ферменты с более узким и направленным спектром субстратной специфичности, а также получены биокатализаторы с увеличенной в несколько раз активностью в реакции окисления цефалоспоринона С – источника получения 7-аминоцефалоспориновой кислоты, исходного синтона в производстве полусинтетических цефалоспоринов. В случае растительных пероксидаз были получены мутантные ферменты с повышенной стабильностью в реакции хемилюминесцентного окисления люминола. Изучена роль ионов кальция в поддержании структуры и проявлении каталитической активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 16-14-00043, Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 13-04-02013-а, 14-04-00865-а, 14-04-01625-а, 14-04-01665-а, 14-04-31194-мол а, 14-04-32011-мол а, 14-04-32042-мол а, 14-04-32064-мол а, 15-54-78035 (совместно с грантом Итальянского Национального исследовательского совета 421-09-03-2015), 16-34-01320-мол а) и Гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук и докторов наук (МК-2304.2014.4).

СУЛЬФОКСИДЫ S-АЛКИЛ/АЛКЕНИЛ-L-ЦИСТЕИНА – НОВЫЕ СУБСТРАТЫ МЕТИОНИН- γ -ЛИАЗЫ И АНТИМИКРОБНЫЕ ПРОЛЕКАРСТВА

Е.А. Морозова¹, В.В. Куликова¹, Н.А. Ануфриева¹, С.В. Ревтович¹, А.Н. Родионов¹, А.Д. Никулин², Т.В. Демидкина¹

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва; ²Институт белка РАН, Пущино, Россия

Противомикробные, противовоспалительные, антиоксидантные и антиканцерогенные эффекты тиосульфатов из экстрактов чеснока и лука известны давно. Однако индивидуальные тиосульфаты не используются в медицине из-за высокой реакционной способности и неустойчивости. Бактериальная метионин- γ -лиаза из *Citrobacter freundii* и *Clostridium sporogenes* (МГЛ, КФ 4.4.1.11) катализирует реакции γ - и β -элиминирования ряда сульфоксидов – аналогов метионина и цистеина с образованием тиосульфатов. Реакции сопровождаются инактивацией фермента в физиологической реакции и, в меньшей степени, в реакции β -элиминирования S-алкилзамещенных аналогов L-цистеина. Установлены структурные основы инактивации МГЛ из *C. freundii* в реакции с ($\pm$)-сульфоксидом S-(2-пропенил)-L-цистеина (аллинином). Инактивация обусловлена окислением сульфгидрильных групп МГЛ аллицином (2-пропенилтиосульфатом), продуктом реакции. Мутантные формы МГЛ из *C. freundii* и *C. sporogenes* с заменой остатка цистеина 115, находящегося в активных центрах МГЛ из двух источни-

ков, на гистидин не катализировали реакцию γ -элиминирования, но катализировали реакцию β -элиминирования ($\pm$)-аллиина и ($\pm$)-сульфоксидов S-метил(этил)-замещенного L-цистеина с каталитическими эффективностями, сравнимыми или большими, чем фермент дикого типа из двух источников. Противомикробная активность смесей ферментов дикого типа и мутантных форм с сульфоксидами показана для грамположительных и грамотрицательных бактерий. Бактериостатический эффект был большим для грамположительных бактерий, величины антибактериальных потенциалов для грамположительных и грамотрицательных бактерий оказались сравнимыми. *Исследования МГЛ дикого типа из C. sporogenes и мутантных форм МГЛ проводились при поддержке гранта РФФИ № 15-14-00009, исследования МГЛ дикого типа из C. freundii поддержаны грантом РФФИ № 14-04-32279. Авторы благодарят А.Д. Никулина за сбор дифракционных данных и участие в решении пространственной структуры МГЛ из C. freundii и Ю.Ф. Белого из ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ» за клонирование гена МГЛ из C. sporogenes.*

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПРОТЕАСОМНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ПАРАМЕТРЫ ДЕГРАДАЦИИ ПЕПТИДНЫХ СУБСТРАТОВ

А.В. Бачева, В.А. Крячков, О.В. Коробкина, М.П. Рубцова *Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Протеасома, мультикаталитический белковый комплекс, участвует в процессе деградации неправильно фолдированных, мутантных и завершивших свой цикл белков, в норме генерируя пул аминокислот и определенных пептидов. При развитии ряда нейродегенеративных заболеваний, а также при воспалении активируется сборка иммунопротеасомы (каталитические субъединицы которой имеют иную специфичность гидролиза), и в некоторых случаях замена регуляторных субчастиц, что может приводить к изменению в составе и/или длине пептидов. При полиглутаминовых нейродегенеративных расстройствах, таких как болезнь Хантингтона, Кеннеди и др. в результате генетических изменений в нейронах экспрессируются мутантные белки, которые содержат протяженные участки из повторяющихся остатков глутамина подряд. Протеасома не способна гидролизовать такие белки до коротких пептидов, в клетке накапливаются полипептиды с полиглутаминовыми трактами, склонные к образованию плохо растворимых агрегатов и телец включения, что приводит к гибели нейронов. Почему не происходит эффективной протеасомной деградации этих полипептидов, до конца не ясно, предполагается участие в этом процессе 11S регулятора протеасомы, который влияет на длину получающихся пептидов. Целью нашей работы является изучение протеасомальной деградации пептидов, содержащих полиглутаминовые последовательности. Из мозга мышей были выделены и очищены различные протеасомные комплексы, а также 11S регуляторная субчастица. Изучено влияние 11S регулятора на кинетические параметры гидролиза 20S и 26S протеасомой типичных флуоресцентных пептидных субстратов. Показано, что 11S субчастица слабо меняет параметры связывания субстратов, но существенно влияет на скорость гидролиза протеасомой. Гидролиз пептидов и белков, содержащих полиглутаминовые фрагменты, изучался на примере пептидных субстратов, содержащих пару тушитель-флуорофор Dabcyl-EDANS и 5 или 10 остатков глутамина подряд. Проведены масс-спектрометрические исследования гидролизата пептидов после протеолиза протеасомой, и определены место протеолиза и эффективные кинетические параметры. Получены зависимости скорости протеолиза пептидов от соотношения 11S/20S и 11S/26S. Показана возможность гидролиза поли-Q-содержащих субстратов протеасомой в присутствии 11S регулятора.

СОЧЕТАНИЕ МЕТОДОВ КОМБИНАТОРНОГО ДИЗАЙНА И КВАНТОВО-МЕХАНИЧЕСКИХ РАСЧЕТОВ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ЭВОЛЮЦИИ КАТАЛИТИЧЕСКИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ АНТИДОТОВ

И.В. Смирнов^{1,2}, А.Г. Габибов^{1,2} *¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

Разработка современных способов создания, направленной модификации и искусственной эволюции рекомбинантных белков является одной из важнейших задач современной энзимологии, биоинженерии и прикладной молекулярной биологии. Одним из ярких примеров природной направленной эволюции белковой молекулы для обеспечения лучших параметров взаимодействия является аффинное созревание антител. Практическая реализация аффинного созревания *in vitro* с помощью стохастических мутаций довольно затруднительна. Для решения данной проблемы нами предложено объединить классические методы комбинаторного дизайна и современные методы квантово-механического расчета с целью разработать подход для автоматического предсказания мутантных форм антител заданной специфичности, позволяющий определить позицию и тип аминокислотного остатка для проведения мутагенеза. Разработанный алгоритм основан на использовании гибридного метода квантовой и молекулярной механики, что позволяет учитывать механизм реакции и роль аминокислотных остатков биокатализатора, входящих в состав активного центра. Мы использовали данный метод для направленной эволюции каталитического антитела A17, гидролизующего пестицид параоксон, с целью улучшения эффективности взаимодействия антитела с фосфорорганическим токсином.

С помощью предложенного метода была создана виртуальная библиотека из 167538 мутантов. После виртуального скрининга библиотеки было предсказано 9 мутантов, обладающих лучшими характеристиками взаимодействия с параоксоном. Для одного из мутантов – L-S35R – были предсказаны максимальное увеличение вероятности формирования водородной связи между каталитическим остатком и параоксоном по сравнению с диким типом, а также наименьшее значение коэффициента диффузии, что отражает лучшее позиционирование параоксона в активном центре мутанта. Предсказанные мутанты были получены в виде рекомбинантных Fab-фрагментов и было показано, что мутант L-S35R проявляет 170-кратное увеличение эффективности взаимодействия по сравнению с антителом дикого типа. Методами рентгеноструктурного анализа мутанта L-S35R и его ковалентного аддукта с остатком параоксона было подтверждено, что введение остатка L-R35 улучшает позиционирование за счет образования водородной связи с фосфорильным атомом кислорода параоксона. Также было показано, что полученная кристаллическая структура активного центра модифицированного антитела L-S35R совпадает с теоретически предсказанной, несмотря на то, что все расчеты базировались на структуре антитела дикого типа. Мы полагаем, что представленный метод направленной эволюции *in silico* является универсальным и может быть использован для модификации свойств других значимых биомолекул, например, рецепторов или ферментов. *Работа выполнена в рамках проекта Минобрнауки России № RFMEFI61614X0009.*

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОЛИГОПЕПТИДАЗ В РОЛЬ СОЛЕВЫХ МОСТОВ В АКТИВАЦИИ ФЕРМЕНТА

А.Г. Михайлова¹, Т.В. Ракитина^{1,2}, Д.М. Карлинский¹, В.И. Тимофеев², Д.А. Корженевский², Ю.К. Агапова², А.В. Власкина², М.В. Овчинникова^{1,3}, В.А. Горленко³, Л.Д. Румш¹ ¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²НИЦ «Курчатовский институт»; ³Московский педагогический государственный университет, Москва, Россия

Олигопептидаза В (OpdВ) – это трипсиноподобная сериновая пептидаза, принадлежащая к семейству пролил-олигопептидаз. OpdВ присутствуют в древних одноклеточных эукариотах: трипаносомах и лейшманиях, являясь важными факторами вирулентности при трипаносомных инфекциях и лейшманиозах. В млекопитающих гены, кодирующие этот фермент, отсутствуют, поэтому OpdВ протозойных паразитов – специфические терапевтические мишени для защиты от этих опасных инфекций. Гены, кодирующие OpdВ, обнаружены также в грам-отрицательных бактериях и в некоторых высших растениях. На настоящий момент наиболее изучены OpdВ из простейших, и только для этих ферментов определены 3D-структуры. Для большинства бактериальных олигопептидаз В известны лишь нуклеотидные последовательности, а пространственная структура и энзимологические характеристики отсутствуют, однако предполагается, что они также могут быть мишенями для антимикробной химиотерапии. Объектом данного исследования является первая психрофильная OpdВ (PSP), выделенная нами из грамм-отрицательного психротолерантного микроорганизма *Serratia proteamaculans*, клонированная и функционально охарактеризованная. Выполнено моделирование трехмерной структуры PSP на основании 3D-структур протозойных OpdВ из *Leishmania major* и *Trypanosoma brucei*. Сделан вывод, что в бактериальных OpdВ за переход из неактивной открытой конформации в активную закрытую отвечает петля гистидина активного центра H652. Детальное рассмотрение конфигурации гистидиновой петли и ее окружения в трехмерных моделях открытой и закрытой форм PSP позволило нам предположить, что переход одной формы в другую обеспечивает переключение солевых мостов, образованных остатками K655 и K660 гистидиновой петли с соответствующими остатками D647 и D649, а также остатком E125 β-пропеллерного домена. В фиксации гистидиновой петли также участвует ионная пара E96-R658. Получены мутантные варианты PSP: E125A, D647A, D649A, K655A, R658A, R658A/K660A, а также укороченный вариант 1-655. Проведено сравнение их активности и специфичности по отношению к ряду пептидных субстратов. Обнаруженные эффекты находят объяснение в рамках предложенной трехмерной модели PSP. *Часть работы (энзимологические исследования) выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 14-50-00131).*

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИММУНОГЕННЫХ И ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ БЕЛКОВЫХ ФРАГМЕНТОВ IgA1 ПРОТЕАЗЫ МЕНИНГОКОККА

Л.С. Жигис, О.В. Котельникова, А.А. Зинченко, А.П. Аллилуев, О.В. Серова, Е.А. Гордеева, Е.А. Нокель, Ю.А. Прокопенко, Л.Д. Румш Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Микробные менингиты остаются тяжелым социально опасным заболеванием. Современные вакцины против основных возбудителей этих инфекций производят на основе капсульных полисахаридов или их конъюгатов с различными белками. Для полной защиты населения от бактериальных менингитов требуется вакцинация всем комплексом указанных вакцин. Нами разработан принципиально иной подход создания единой поливакцины для защиты от бактериальных менингитов с использованием препарата IgA1 протеазы (IgA1pr) менингококка. IgA1pr является одним из основных факторов вирулентности ряда патогенов (*Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* и др), способствующим адгезии бактерий на слизистых оболочках человека с последующей колонизацией и развитием инфекции. Следовательно, нейтрализация IgA1pr должна препятствовать развитию этих процессов. Ранее нами было показано, что IgA1 протеаза *N. meningitidis* серогруппы В штамм H44/76 в активной и мутантной формах (Ser267Ala) проявляет протективную активность в отношении менингококков основных эпидемических серогрупп – А, В и С. В настоящем исследовании осуществлен поиск укороченных вариантов IgA1pr и сконструированы рекомбинантные белки с различной первичной структурой, обладающие иммуногенными и протективными свойствами, для использования в качестве антигенной основы поливалентной вакцины. Основными показателями при создании этих белков служили их мол. масса, растворимость и количество теоретически рассчитанных В- и Т-эпитопов, что должно способствовать формированию долгосрочной иммунологической памяти. Проведенный анализ зависимости иммуногенности и протективности сконструированных белков от их первичной структуры показал наличие в сыворотках мышей, иммунизированных укороченными фрагментами IgA1pr с мол. массой ниже 60 kDa, высокий уровень антител к полноразмерной протеазе, что говорит об их иммунологическом и вакцинном потенциале. Защита таких мышей от заражения вирулентными штаммами менингококков составляла 70–80%. Таким образом, показано, что полученные фрагменты IgA1pr могут быть использованы в качестве основы поливалентной вакцины для профилактики менингитов, вызванных микробами, патогенность которых, обусловлена этим ферментом. *Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 14-50-00131).*

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ LON-ПРОТЕАЗ РАЗЛИЧНЫХ ПОДСЕМЕЙСТВ

Т.В. Ротанова, А.Г. Андрианова, А.М. Куджаев

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Семейство Lon-протеаз (MEROPS: клан SJ, S16) играет ключевую роль в функционировании системы контроля качества белков (СКК), поддерживающей сохранность клеточного протеома во всех природных царствах. СКК объединяет молекулярные шапероны, участвующие в ремоделировании и деагрегации клеточных белков, и селективные пептидгидролазы, освобождающие клетки от дефектных, мутантных и короткоживущих регуляторных белков. Пептидгидролазы СКК принадлежат к белкам теплового шока (Hsp) и преимущественно являются бифункциональными ферментами, сформированными АТР-азными модулями (AAA+-белки) и протеолитическими (P) компонентами (пептидазы разных классов). К AAA+-белкам относятся также шапероны семейства ClpB/Hsp104, выполняющие в СКК функцию деагрегации белков-мишеней. Согласно классификации 2004 г., Lon-протеазы – это гомоолигомерные ферменты, AAA+-модули которых локализованы в единой полипептидной цепи с серин-лизиновыми эндопептидазами (P-домены). При этом пул Lon-протеаз образован двумя подсемействами (А и В), причем подсемейство А включает цитоплазматические и митохондриальные ферменты бактерий и эука-

риот, а подсемейство В – мембраносвязанные ферменты архей. Основными различиями протеаз LonA и LonB являются окружение каталитических остатков Ser и Lys в протеолитических доменах, а также архитектура АТР-азных составляющих ферментов. Нами установлено, что LonA-протеазы обладают значительным сходством с ClpB-шаперонами, однако имеют уникальное для AAA+-белков строение. В последнее время кроме классических LonA- и LonB-протеаз в семействе Lon обнаружен ряд ферментов с альтернативной организацией (в частности, «гибридные» Lon-протеазы, образованные AAA+-модулями и Р-доменами разных подсемейств, а также Lon-протеазы, не обладающие АТР-азной активностью). Обсуждаются особенности строения и функционирования вновь обнаруженных Lon-протеаз. Предлагается внести изменения в существующую классификацию протеаз семейства Lon. *Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 14-50-00131).*

IgA1 ПРОТЕАЗА *N. MENINGITIDIS*. ПОИСК И СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВЫХ ФРАГМЕНТОВ С ПОТЕНЦИАЛЬНЫМ ПРОТЕКТИВНЫМ ДЕЙСТВИЕМ

А.А. Зинченко, Ю.А. Прокопенко, О.В. Котельникова, А.П. Аллилуев, Е.А. Гордеева, Е.Н. Калиберда, Т.Д. Мелихова, А.Н. Некрасов, Е.А. Нокель, Л.Д. Румш

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Сериновые IgA1 протеазы секретируются опасными бактериями, в частности, *Neisseria meningitidis*, и расщепляют иммуноглобулины класса А1 на поверхности слизистых оболочек, разрушая первый защитный барьер иммунитета организма хозяина. Ранее нами было показано, что иммунизация мышей рекомбинантной IgA1 протеазой *N. meningitidis* серогруппы В (штамм H44/76) позволяет защитить животных от заражения вирулентными штаммами менингококков. Цель настоящих исследований – поиск и получение рекомбинантных белковых фрагментов IgA1 протеазы, обладающих иммуногенными свойствами и потенциальным защитным действием в отношении менингококков различных серогрупп. Поиск и выбор структуры фрагментов осуществляли, используя разработанную ранее методологию предсказания потенциальных участков фрагментации белков, включающей расчет информационной структуры белка и распределения плотности информации в аминокислотной последовательности, анализ данных о гомологии белков и локализации В- и Т-клеточных эпителиев, важных для индукции противоменингококкового действия. Сайты фрагментации IgA1 протеазы *N. meningitidis* серогруппы В с первичной структурой A28 – P1004 и молекулярной массой 109 kDa определяли, анализируя распределение границ элементов информационной структуры высоких рангов в первичной структуре белка и учитывая физико-химические свойства потенциальных белковых фрагментов. Для конструирования были выбраны белковые структуры с молекулярной массой в интервале 20–90 kDa. Выбранные фрагменты белка содержали перекрывающиеся аминокислотные последовательности из различных участков IgA1 протеазы, при этом некоторые из них представляли собой «комбинированные» молекулы, содержащие два или три фрагмента фермента, объединенные в одной конструкции. Были сконструированы соответствующие плазмиды, созданы штаммы *E. coli*, продуцирующие рекомбинантные белки в виде телец включения, разработаны методы получения, выделения и очистки новых белков, изучены их иммуногенные и протективные свойства. Анализ результатов исследования протективных свойств полученных белков позволил выбрать наиболее перспективные объекты для дальнейших исследований в качестве основного компонента поливалентной противоменингококковой вакцины. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).*

ФЕРМЕНТЫ СЕМЕЙСТВА СУР74 КАК ВОЗМОЖНЫЕ РУДИМЕНТАРНЫЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ ДРЕВНЕЙ ГРУППЫ ЦИТОХРОМОВ P450

С.С. Горина, Я.Ю. Топоркова, Л.Ш. Мухтарова, Ю.В. Гоголев, А.Н. Гречкин

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань, Россия

Цитохромы P450 представляют собой суперсемейство гем-содержащих монооксигеназ, присутствующих во всех царствах живых существ (животных, растений, грибов, бактерий, архей и др.), за исключением облигатных анаэробов. Структура всех цитохромов P450 является в значительной мере консервативной. Несмотря на это, в пределах суперсемейства встречаются ферменты, обладающие кардинально различающимися каталитическими свойствами. В то время как большинство цитохромов P450 являются монооксигеназами и требуют последовательной поставки двух электронов через различные типы окислительно-восстановительных белков, некоторые цитохромы катализируют превращение субстрата с помощью независимой внутримолекулярной системы переноса. И, следовательно, у них отсутствует необходимость в молекулярном кислороде и окислительно-восстановительном партнере для протекания реакции. К этим ферментам относятся простагландинсинтазы, тромбоксансинтазы, алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ), дивинилэфирсинтазы (ДЭС) и эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС). Последние четыре типа ферментов входят в состав семейства СУР74, которое в течение долгого времени считалось эволюционным приобретением наземных растений. Основываясь на соотнесении данных, представленных в литературе, а также полученных в ходе наших работ, была сформулирована гипотеза о том, что в организме последнего общего предка растений и животных уже присутствовали ферменты СУР74. Такое предположение может объяснить присутствие ферментов семейства СУР74 у разнообразных организмов: коралла (*Acropora palmate*), метиловых бактерий (*Methylobacterium nodulans*), а также ланцетника (*Branchiostoma floridae*), трихоплакса (*Trichoplax adhaerens*), бурой водоросли (*Ectocarpus siliculosus*) и актинии (*Nematostella vectensis*), клонирование и биохимическая характеристика которых была проведена в ходе наших исследований. Нами были проанализированы продукты реакций, катализируемых данными ферментами, а также расшифрованы механизмы катализа. *Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 16-34-60231-мол а дк и 15-04-08310-а. Характеристика фермента E. siliculosus была проведена при финансовой поддержке РНФ (проект №16-14-10286).*

МУТАЦИИ С-ДОМЕНА ЛЮЦИФЕРАЗЫ СВЕТЛЯКОВ УКАЗЫВАЮТ НА ВЗАИМНОЕ РАСПОЛОЖЕНИЕ ДВУХ ДОМЕНОВ ЛЮЦИФЕРАЗЫ В МОМЕНТ ИСПУСКАНИЯ СВЕТА

Ю.А. Модестова, Н.Н. Угарова *Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ООО «Люмтек», Москва, Россия*

Люцифераза светляков, катализирующая двухстадийное окисление люциферина светляков, состоит из двух доменов. Их взаимное вращение создает оптимальную для каждой стадии конфигурацию активного центра. При связывании субстратов

свободная конформация трансформируется в аденилирующую. На первой стадии реакции формируется люциферил аденилат. Затем он окисляется, образуя электронно-возбуждённый оксильюциферин. Предполагается, что при окислении реализуется окисляющая конформация, сохраняющаяся и в момент испускания света. Методом случайного мутагенеза мы получили мутанты люциферазы светляков *L. mingrelica* с единичными заменами в С-домене (Phe467Ser, Glu490Val и Glu490Lys). Мутации практически не повлияли на стабильность, специфическую активность фермента и рН-оптимум реакции, но резко изменили рН-чувствительность спектров биолюминесценции. Поскольку эти спектры отражают структуру эмиттера и его микроокружения, мы предположили, что замены воздействуют на активный центр фермента в момент испускания света. Анализ модельных структур люциферазы *L. mingrelica* в трёх конформациях показал, что расположение Phe467 и Glu490 относительно N-домена резко меняется в ходе реакции. В свободной конформации их боковые цепи расположены на поверхности С-домена, экспонированы в растворитель и не участвуют в структурообразующих взаимодействиях. В аденилирующей конформации они оказываются в междоменном пространстве и непосредственно взаимодействуют с N-доменом, содержащим большую часть групп активного центра. В окислительной конформации вращение С-домена выводит эти остатки на внешнюю поверхность фермента, максимально удаляя их от N-домена. Если испусканию света соответствует окисляющая конформация, то воздействие мутаций Phe467 и Glu490 на спектральные свойства эмиттера могло бы объясняться существенной перестройкой в структуре белка, отражающейся и на прочих свойствах фермента. Однако этого не наблюдается. Следовательно, наблюдаемые изменения спектров биолюминесценции связаны с непосредственным воздействием мутаций на микроокружение активного центра. Это возможно только в аденилирующей конформации люциферазы. Мы предполагаем, что окислительная конформация необходима лишь для инициации окисления полупродукта, а в момент испускания света фермент возвращается в аденилирующую конформацию.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ЛИЗИС БАКТЕРИЙ: НОВЫЕ АСПЕКТЫ

П.А. Левашов, Д.А. Матолыгина, Е.Д. Овчинникова, О.А. Морозова, Т.А. Чердынцева, Н.Г. Белогурова, С.С. Савин, Д.Л. Атрошенко, Н.Л. Еремеев, С.А. Смирнов, В.И. Тишков, А.В. Левашов

Кафедра химической энзимологии, Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Бактериолитические ферменты изучают давно, однако остаётся много нерешённых вопросов, связанных с их свойствами и особенностью функционирования. Одним из ключевых моментов в изучении данных ферментов являются методические сложности в постановке экспериментов и интерпретации результатов при работе с живыми бактериальными клетками в качестве субстрата. Замена живых клеток на искусственные субстраты не даёт возможности полноценно изучать особенности воздействия данных ферментов на клетки. Ещё одним очень важным моментом является изучение сорбции фермента на живых клетках. Сорбция фермента на клетках может быть как продуктивной, предшествующая каталитическому акту, так и непродуктивная, ингибирующая действие фермента. Последний вид сорбции согласно литературным данным активно используется рядом бактерий для повышения своей резистентности. Новые методические подходы, предложенные в работе существенно расширяют возможности изучения активности бактериолитических ферментов на живых клетках в качестве субстрата. Для экспериментальных данных разработана и обоснована система расчётов, необходимая для получения корректных физико-химических параметров. Разработаны подходы, позволяющие измерять термодинамические и кинетические параметры сорбции фермента непосредственно на живых клетках в условиях измерения ферментативной активности. В работе получены новые важные данные для яичного куриного лизоцима. Были обнаружены и исследованы новые, ранее неизвестные бактериолитические факторы из разных источников. Обнаружена бактериолитическая активность у интерлейкина-2 млекопитающих. Интерлейкин-2 является ключевым цитокином, регулирующим работу иммунной системы. Препараты интерлейкина-2 в настоящее время используются при лечении сепсиса и некоторых видов рака. Уточнение свойств и роли интерлейкина-2 является отдельной очень важной задачей. Активность различных бактериолитических факторов изучали на разнообразных клетках субстратах, а именно на более четырёх десятках видов бактерий из 13 семейств. Выяснение влияния разных факторов на активность бактериолитических ферментов на различных клетках-субстратах должно помочь в разработке новых антибактериальных медицинских препаратов. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 15-14-00012).*

СОЛЕУСТОЙЧИВАЯ ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА ИЗ ЯЙЦЕКЛЕТОК МОРСКОГО ЕЖА *STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS*

А.В. Сейткалиева, Н.И. Мензорова, Т.И. Вакорина, П.С. Дмитренко, В.А. Рассказов

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

Щелочные фосфатазы (ЩФ, КФ 3.1.3.1) широко распространенные в природе ферменты, которые играют важную роль во многих биохимических процессах, в том числе метаболизме фосфата. Они образуют большое семейство неспецифических цинк-содержащих металлозависимых фосфомоноэстераз, катализирующих в щелочной среде гидролиз различных фосфомоноэфиров с образованием неорганического фосфата. Ранее нами в яйцеклетках морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* была обнаружена цистеиновая солеустойчивая щелочная фосфатаза (StЩФ), способная гидролизовать субстрат в растворах с высокой концентрацией солей, в частности, в природной и искусственной морской воде без потери ферментативной активности. Данное свойство фермента было использовано в тест-системе для оценки качества морской и минерализованной пресной вод. Целью данной работы является характеристика новой солеустойчивой StЩФ. Фермент представляет собой гомодимер с молекулярной массой 150 кДа, проявляет максимальную активность в интервале рН 8,1–8,5 и температуре 45°C. Активаторами StЩФ являются ионы Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} и ДТТ, а ингибиторами активности ионы Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} и ЭДТА, N-ЭМИ, n-ХМБ. Фермент характеризуется уникальной для ЩФ эукариот солеустойчивостью (сохраняет стабильность и максимальную активность при концентрациях NaCl до 1 М и в природной морской воде). Методами флуоресцентной спектроскопии и кругового дихроизма исследована связь между ферментативной активностью StЩФ и пространственной структурой белка при различных концентрациях NaCl. Существенные изменения во вторичной и третичной структуре белка и уменьшение ферментативной активности происходят только при концентрациях NaCl выше 1 М. Анализ молекулярных масс триптических пептидов StЩФ, проведенный методом масс-спектрометрии с использованием

программы MASCOT на основе баз данных NCBI и SWISS-PROT, не позволил идентифицировать первичную последовательность исследуемого белка. Уникальность источника (яйцеклетка морского ежа), не характерные для обычных ЩФ свойства исследуемого фермента (высокие солеустойчивость и чувствительность к ионам тяжелых металлов, активация ДТТ), а также сложность идентификации первичной последовательности белка методом “finger print”, позволяют предположить, что StЩФ является не типичной щелочной фосфатазой.

МЕХАНИЗМ УЗНАВАНИЯ 5,6-ДИГИДРОУРАЦИЛА В ДНК АР-ЭНДОНУКЛЕАЗАМИ APE1 ЧЕЛОВЕКА И APN1 ИЗ *S. CEREVISIAE*

А.А. Ломзов, К.А. Вабищевич, В.В. Коваль *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Участие АР-эндонуклеаз в процессах инцизионной репарации нуклеотидов (NIR) является биологически значимым путем репарации окислительных повреждений оснований ДНК. Данный белок расщепляет дуплексы, содержащие остатки 5-гидроксиурацила (5ohU), 5,6-дигидроурацила (DHU) и 5,6-дигидротимина (DHT). С целью выяснить, какие аминокислотные остатки в активных центрах ферментов APE1 человека и Apn1 из *S. cerevisiae* участвуют в узнавании остатка DHU в ДНК, мы провели молекулярное моделирование по методу молекулярной динамики комплексов ферментов с ДНК-дуплексом, содержащим 5,6-дигидроурацил. Для фермента Apn1 провели молекулярно-динамическую симуляцию фермент-субстратных комплексов содержащих дуплексы 5,6-DHU-(2-aPu), (2-aPu)-5,6-DHU и три иона Zn^{2+} . ДНК содержала остаток 5,6-дигидроурацила и остаток флуорофора 2-аминопурина, расположенный рядом с ним. Показано, что остаток 5,6-DHU, вывернутый из спирали ДНК и помещенный в активный центр фермента не меняет существенно своего положения. Такая стабилизация вызвана образованием водородной связи между 5,6-DHU и аминокислотой Asn-279. На основании анализа результатов моделирования можно заключить, что в APE1 человека в узнавании DHU участвуют аминокислоты Asn-212, Val-213, Leu-282. Расположение гетероциклического основания DHU в узкой глубокой полости активного центра Ape1 и образование водородной связи между атомом N3 DHU и кислородом в Thr-233 позволяет утверждать, что вывернутый из двойной спирали ДНК остаток DHU специфически узнается и связывается ферментом. Для двух АР-эндонуклеаз – APE1 человека и Apn1 из *S. cerevisiae* – получены структурные характеристики узнавания остатка 5,6-дигидроурацила в ДНК; определены аминокислоты, участвующие в образовании каталитически активных комплексов. *Работа поддержана РФФИ (14-04-00806) и Министерством образования и науки РФ (совместных лабораторий НГУ – ННЦ СО РАН). Работа выполнена в Лаборатории структурной биоинформатики и молекулярного моделирования НГУ с использованием вычислительных мощностей Сибирского суперкомпьютерного центра СО РАН www2.sssc.ru.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ФОРМИРОВАНИЯ ПОЛИУБИКВИТИНОВЫХ ЦЕПЕЙ И ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА УБИКВИТИНА С ПРИМЕНЕНИЕМ ДНК-КОДИРУЕМОЙ РЕЗОРУФИН-ЛИГАЗЫ

М.И. Васькина¹, А.А. Кудряева¹, А.А. Белогуров^{1,2} *¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

Протеасома – высокомолекулярный многосубъединичный белковый комплекс, обладающий протеолитической активностью с широкой субстратной специфичностью, является неотъемлемой частью живых клеток от археобактерий до высших эукариот. Основной функцией протеасомы является расщепление отслуживших и дефектных клеточных белков. Сигналом для разрушения белка является так называемая полиубиквитиновая цепь, состоящая из мономеров убиквитина (Ub), ковалентно связанная с субстратом. Относительно недавно был разработан метод сайт-специфического внутриклеточного мечення белков, в основе которого лежит использование лигазы липоевой кислоты *E. coli* (LplA), содержащей ряд замков в активном центре. Данная лигаза, путем двухстадийной реакции с участием АТР, способна присоединять резорурфин к аминогруппе лизина в составе короткого 13-членного пептида. В настоящем исследовании данный подход был использован для изучения внутриклеточного метаболизма поли-Ub конъюгатов. В результате впервые были определены особенности метаболизма главного медиатора системы убиквитинилирования, молекулы убиквитина, в истинно физиологических условиях. Показано, что среднее время жизни убиквитина составляет порядка 4 часов, что явным образом коррелирует с временем «перезарядки» лигаз семейства E2. Динамическое равновесие достигается при длине поли-Ub цепи в 4-6 мономерных единиц, в то время как конъюгаты, содержащие более 20 мономеров убиквитина на молекулу белка, существенно теряют свои субстратные свойства в отношении протеасомы. Полученные данные свидетельствуют о том, что до четверти молекул убиквитина из состава поли-Ub цепи необратимо утрачивается при каждом акте гидролиза субстрата протеасомой. *Работа была поддержана проектом РНФ № 14-14-00585 «Молекулярный механизм убиквитин-независимого протеолиза белков протеасомой и его роль в норме и патологии», а также центром коллективного пользования ИБХ РАН (аппаратное обеспечение флуоресцентно-активированного сортирования клеток).*

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕАСОМНОЙ ДЕГРАДАЦИИ БЕЛКОВ ВНУТРИ КЛЕТКИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ДНК-КОДИРУЕМОЙ РЕЗОРУФИН-ЛИГАЗЫ И ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ В НОРМАЛЬНЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ.

К.М. Гайнова¹, А.А. Кудряева¹, М.В. Васькина¹, А.А. Белогуров^{1,2} *¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

Модификация белков убиквитином является важным внутриклеточным процессом, который в основном служит сигналом для их деградации 26S протеасомой, таким образом предотвращая накопление неправильно свернутых или отслуживших свою функцию полипептидов. Несмотря на множество методик, разработанных для мониторинга протеасомопосредованной деградации белков, большинство из них предполагает добавление веществ, останавливающих белковый синтез, либо подразумевает изоляцию белка-мишени. Данные манипуляции могут в значительной мере искажать значения полужизни белков, в свою очередь приводя к ложной интерпретации результатов. В настоящей работе для мониторинга деградации белков в истинно физиологических условиях нами предложено использование ранее сдизайнированной лигазы липоевой кислоты *E. coli* (LplA) с несколькими заменами в активном центре. Данный фермент специфически лигирует молекулу низкомолекулярного флуорохрома резорурфина с последовательностью из 13 аминокислот, слитых с белком-мишенью.

Этот метод сочетает в себе преимущества высокоспецифических белковых меток и небольших химических флуорофоров. Полученные нами данные подтвердили работоспособность предложенной методики для изучения деградации полипептидов 26S протеасомой на примере природных субстратов, таких как основной белок миелина (MBP) и дигидрофолатредуктаза (DHFR). Совмещение внутриклеточного мечения белков резорфурином с проточной цитометрией со встроенной функцией сортировки позволило ранжировать индивидуальные белки, а также мини-библиотеки субстратов в терминах их стабильности в клетке. Предложенная методология позволяет проводить наблюдение за разрушением белков в режиме реального времени, не лимитирована ограничениями по продолжительности слежения за деградацией мишеней, достаточно проста в применении и, таким образом, может быть с успехом расширена на другие субстраты, а также их комбинаторные библиотеки. *Работа была поддержана проектом РНФ № 14-14-00585 «Молекулярный механизм убиквитин-независимого протеолиза белков протеасомой и его роль в норме и патологии», а также центром коллективного пользования ИБХ РАН (аппаратное обеспечение флуоресцентно-активированного сортировки клеток).*

КИНЕТИКА БИФЕРМЕНТНОЙ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ РЕАКЦИИ БАКТЕРИЙ В УСЛОВИЯХ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНОГО КРАУДИНГА, МОДЕЛИРУЕМОГО ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ

А.Е. Лисица¹, Е.В. Немцева^{1,2}, В.А. Кратасюк^{1,2}

¹Сибирский федеральный университет; ²Институт биофизики СО РАН, Красноярск, Россия

Известно, что внутриклеточное пространство представляет собой тесную среду с небольшим количеством свободной воды, для которой характерно плотное скопление химически неактивных молекул разного размера (молекулярный краудинг). Эффекты краудинга на белки реализуются, в основном, через изменения гидродинамического объема и смещения равновесий реакций ассоциации. Целью данного исследования было проанализировать эффекты молекулярного краудинга на активность сопряженных ферментов биолюминесцентной системы бактерий (бактериальной люциферазы и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы). Регистрацию ферментативной кинетики проводили: методом остановленного потока с помощью анализатора SX-20 (Applied Photophysics) – для сопряженной и моноферментной биолюминесцентных реакций, спектрофотометрически с помощью спектрометра Cary 5000 (Agilent Technologies) – для реакции, катализируемой NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой. Содержание полиэтиленгликоля с молекулярной массой 4000 Да (PEG 4000) варьировали в диапазоне 1–25 %. Для моделирования кинетических кривых использовали пакеты MS Excel и SciLab. Были получено, что присутствие в среде PEG 4000 в концентрации 15–20 % приводит к увеличению максимальной интенсивности свечения биферментной биолюминесцентной системы (до 2-х кратного). В то же время, низкие концентрации PEG в растворе (<10 %) оказывают ингибирующий эффект. Было установлено, что скорость отдельной реакции, катализируемой NADH:FMN-оксидоредуктазой, снижается в средах с PEG. Это указывает на отсутствие связи между активностью этого фермента и наблюдаемым усилением биолюминесценции биферментной системы при высоких концентрациях PEG. Для реакции, катализируемой люциферазой, с ростом концентрации PEG зарегистрировано уменьшение интенсивности свечения, замедление скоростей выхода на максимум и спада свечения. Это говорит о возможном снижении скоростей процессов связывания субстратов с ростом диффузии, но не объясняет 2-х кратный рост интенсивности сопряженной биолюминесцентной реакции. Обнаруженный эффект краудинга на сопряженную систему может отражать общие принципы функционирования полиферментных цепочек внутри клетки. *Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект №16-14-10115).*

МЕХАНИЗМ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЦИТОХРОМА С: РОЛЬ КОНФОРМАЦИОННОЙ ПОДВИЖНОСТИ ПЕТЛЕВОГО УЧАСТКА Pro76-Ala83 В РЕАЛИЗАЦИИ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКА

Р.В. Черткова, Т.В. Брянцева, Н.А. Браже, А.Н. Некрасов, Д.А. Долгих, А.И. Юсипович, Г.В. Максимов, А.Б. Рубин, М.П. Кирпичников

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

В работе проведено исследование роли фрагмента первичной структуры Pro76-Ala83 в функционировании цитохрома с. На основе данных, полученных методом анализа информационной структуры (АНИС), была предложена модель функционирования цитохрома с, согласно которой конформационные перестройки петлевого фрагмента Pro76-Ala83 оказывают значительное влияние на конформационную подвижность гема. Предполагается, что конформационная подвижность гема цитохрома с обуславливает его оптимальную ориентацию относительно донора и акцептора электрона в составе убихинол: цитохром с-оксидоредуктазы (комплекс III) и цитохром с-оксидазы (комплекс IV), соответственно, тем самым обеспечивая перенос электрона от комплекса III к комплексу IV. Для проверки справедливости этой модели получен ряд мутантных вариантов цитохрома с с множественными заменами остатков в последовательности Pro76-Ala83, направленными на понижение его способности к конформационным перестройкам. Исследованы сукцинат: цитохром с-редуктазная и цитохром с-оксидазная активности митопластов печени крысы в присутствии мутантных вариантов цитохрома с. Показано, что способность к переносу электрона мутантных вариантов снижена в разной степени. Согласно данным, полученным с помощью методов спектроскопии резонансного комбинационного рассеяния (КР) и гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) снижение электрон-транспортной активности мутантных вариантов коррелирует с изменением конформации и уменьшением подвижности гемопорфирина. Полученные результаты свидетельствуют о существенной роли фрагмента Pro76-Ala83 в реализации электрон-транспортной функции цитохрома с и подтверждают предложенную нами модель.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕДОКС-ПОТЕНЦИАЛА ЛАККАЗЫ КИНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Е.А. Трушкина¹, Н.А. Трушкин², И.С. Филимонов² ¹Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, ²Международный учебно-научный биотехнологический центр, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Лакказы (ЕС 1.10.3.2) – медьсодержащая оксидаза. Лакказы – небольшие (50 – 70 кДа) водорастворимые глобулярные белки, которые способны катализировать реакции окисления широкого круга органических и неорганических соединений молекулярным кислородом. По каталитическим свойствам, субстратной специфичности и биотехнологическому потенциалу лакказы – практически идеальный катализатор для «зеленой химии». Современная классификация лакказ построена на таком параметре, как окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) Т1-кластера, по значению которого выделяют высоко-

(600–800 мВ), средне-(500–600 мВ) и низко-(400–500 мВ) редокс-потенциальные лакказы. Однако математической модели, которая связывала бы значение ОВП лакказы с кинетическими характеристиками фермента на сегодняшний день не предложено. В ходе настоящей работы была установлена зависимость между скоростью ферментативной реакции, потенциалом среды и потенциалом лакказы.

$$v = \frac{E_0}{A + B \cdot 10^{(\varepsilon - \varepsilon_0^{Lc})/60} + C \cdot \frac{1}{S}},$$

где А, В, С – функции от элементарных констант скоростей; ε – потенциал среды, ε_0^{Lc} – потенциал лакказы, S – концентрация субстрата, E0 – концентрация фермента.

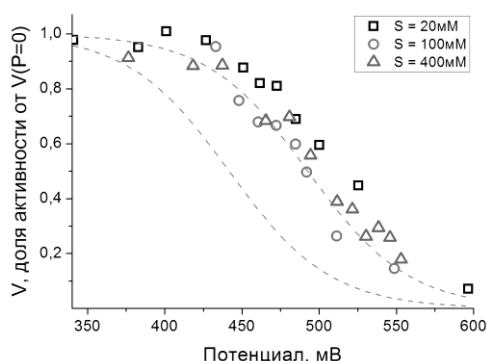


Рис. Экспериментально полученная зависимость скорости ферментативной реакции от потенциала для трёх концентраций субстрата-донора электронов. Зелёным пунктиром показан вид зависимости, если бы КПЛ был равен РПЛ.

Экспериментальный этап работы показал, что описанные выше подходы применимы на практике. Для лакказы из лакового дерева (*Rhus vernicifera*) были получены зависимости скорости реакции от потенциала среды для трёх концентраций субстрата-донора электронов (Рис. 4). Рассчитанное из полученной зависимости значение КПЛ одинаково для трёх концентраций субстрата-донора электронов (около 470 мВ) и не совпадает со значением РПЛ в литературе (430 мВ). Это различие может быть объяснено в рамках предложенной модели.

Таким образом, предложена математическая модель, устанавливающая взаимосвязь между скоростью ферментативной реакции лакказы, потенциалом среды и концентрациями субстратов в явном виде. Исходя из модели показана возможность экспериментального определения потенциала Т1-центра лакказы кинетическими методами. Установлено соответствие теоретической и экспериментальной зависимости скорости ферментативной реакции от редокс-потенциала среды для лакказы из *Rhus vernicifera*.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДНОГО МУТАНТА ASP194GLY МЕЗО-2,3-БУТАНДИОЛ-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Ж. Пу¹, Ф. Жи¹, В. Хао^{1,2}, Н.Н. Случанко³, Дж. Ванг¹, Йо. Бао¹

¹Факультет естественных наук и биотехнологии, Технологический Университет г. Далянь, Китай; ²Факультет науки, Университет г. Хэйхэ, Китай; ³Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Бактериальная мезо-2,3-бутандиолдегидрогеназа (мезо-2,3-BDH) катализирует NAD⁺-зависимое преобразование мезо-2,3-бутандиола (BD) в R-ацетоин (R-AC), который используется в пищевой промышленности и в качестве источника для производства биотоплива и, следовательно, является перспективным объектом биотехнологии с использованием биотрансформации. По данным литературы, Asp194 фермента может мутировать в глицин, что приводит к резкому уменьшению ферментативной активности мезо-2,3-BDH без видимого эффекта на олигомерное состояние фермента и его способность связывать субстрат AC. Тем не менее, в соответствии с кристаллической структурой мезо-2,3-BDH (PDB ID: 1GEG), остаток 194 расположен в углу между двумя короткими альфа-спиралями (αFG1 и αFG2), и более чем на 12 Å удален от консервативной каталитической триады фермента. Для того чтобы выявить влияние мутации на активность мезо-2,3-BDH, мы провели моделирование с применением молекулярной динамики (МД) в диапазоне 100 нс как белка дикого типа, так и его мутанта в комплексе с R-AC независимо в AMBER14 и GROMACS. Наши результаты свидетельствуют о том, что мутация может нарушать H-связи на стыке спиралей αFG1 и αFG2. Прямые наблюдения траектории и анализ главных компонент показали, что мутация замедляет высвобождение R-AC. Так, характерные времена диссоциации R-AC от фермента дикого типа и его мутанта составляли 54 нс и 83 нс (AMBER14) или 15 нс и 97 нс (GROMACS), соответственно. С помощью методов по кадрового разложения энергии MM/GBSA мы выяснили, что в процессе диффузии R-AC в растворитель электростатическое отталкивание между R-AC и Asp194 стимулирует высвобождение R-AC, тогда как мутантный Gly194 оказывается не способным к этому. Таким образом, наши данные позволяют предположить, что мутация Asp194Gly, лежащая за пределами активного сайта фермента, может напрямую снижать скорость высвобождения R-AC вследствие потери электростатического взаимодействия с R-AC, и, соответственно, снижает число оборотов фермента ($k_{cat} = 1810.14 \text{ с}^{-1}$ и 41.80 с^{-1} для фермента дикого типа и его мутанта, соответственно). Эти результаты могут быть полезными при рациональном дизайне мезо-2,3-BDH в будущих исследованиях. *Поддержано Национальным научным фондом Китая (Грант No. 21606025).*

ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВЫХ К ГИСТИДИНУ МУТАНТНЫХ ФОРМ АТФ-ФОСФОРИБОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ E. COLI

И.А. Бутон, А.В. Годованный, Н.В. Стойнова ЗАО НИИ «Аджиномото – Генетика»

АТФ-фосфорибозилтрансфераза (HisG) катализирует первую реакцию биосинтеза гистидина у *E. coli*. Известно, что активна димерная форма HisG, а в случае ретроингибирования гистидином фермент переходит в неактивную форму, образуя гексамер. Трехмерная структура комплекса фермента с АМФ и гистидином была ранее определена для его близкого ортолога, HisG из *M. tuberculosis*. Исходя из имеющихся структурных данных, а также сравнения первичных аминокислотных последовательностей HisG *E. coli* и *M. tuberculosis* нами были выбраны а.о. R250 и T252 HisG *E. coli*, потенциально ответственные за связывание гистидина, и проведено сканирование аланином указанных остатков. Замена T252A, в отличие от R250A, привела к существенному снижению ретроингибирования, и, как следствие, к сверхпродукции гистидина. Полученные му-

тантные ферменты сравнивали как с природным HisG *E. coli*, так и с его известным мутантным вариантом HisG^{E271K}, у которого ретроингибирование гистидином полностью отсутствует, что также приводит к сверхпродукции гистидина. Показано, что, в отличие от мутации HisG^{E271K}, замена HisG^{T252A} значительно снижает активность фермента; при этом ингибирование конечным продуктом полностью не предотвращается. Соответственно, HisG^{E271K} обеспечивает в 1.8 раз более высокое накопление гистидина в ферментационной среде, нежели HisG^{T252A}. Полное или частичное удаление С-концевого регуляторного домена HisG, ответственного за связывание гистидина, приводило, соответственно, к полной или частичной аукотрофности по гистидину, что свидетельствовало о нарушении функционирования фермента.

Для HisG^{WT}, HisG^{E271K}, HisG^{T252A} получены очищенные препараты ферментов и определены их основные кинетические характеристики. Хотя остаток E271 не участвует непосредственно в связывании с ингибитором, мутация E271K, по-видимому, приводит к нарушению образования неактивных гексамерных комплексов. Важно, что обе изученные мутации располагаются в С-концевом участке, представляющем собой структурный мотив $\beta\alpha\beta\alpha\beta$, который, как полагают, играет важную регуляторную роль у ключевых ферментов биосинтеза аминокислот именно за счет изменения их олигомеризации.

НОВАЯ ПРИРОДНАЯ ПСИХРОФИЛЬНАЯ ЛЮЦИФЕРАЗА ИЗ КОПЕПОДЫ *METRIDIA LONGA*: ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА

М.Д. Ларионова, С.В. Маркова, Е.С. Высоцкий *Кафедра биофизики, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, Сибирский федеральный университет; Институт биофизики СО РАН, Красноярск, Россия*

Копеподные люциферазы, осуществляющие окисление целентеразина с испусканием голубого света ($\lambda=485$ нм), являются перспективными биолюминесцентными репортерами благодаря естественной секреции, небольшой молекулярной массе, высокой ферментативной активности, а также широкому диапазону детекции. Ранее при скрининге кДНК-библиотеки, полученной из морской копеподы *Metridia longa*, был идентифицирован ряд генов люциферазных изоформ. В данной работе описано получение новой изоформы – MLuc2 (18.5 кДа), обладающей уникальными свойствами: высокой термостабильностью и удельной активностью, а также низким температурным оптимумом биолюминесценции. Аминокислотная структура представленной психрофильной изоформы характеризуется высокой гомологией с другими люциферазами *Metridia* – идентичность между изоформами MLuc7 и MLuc2 составляет около 70%. Все известные копеподные люциферазы являются Cys-богатыми белками (10 остатков), поэтому их получение в бактериальной системе экспрессии затруднено. В настоящем исследовании при помощи бакуловирусной системы «Vas-to-Vas» и клеток Sf-9 нам удалось обеспечить высокий уровень продукции нативных белков и подобрать оптимальные условия очистки люцифераз с выходом свыше 5 мг/л культуральной среды. Определено, что новая изоформа как и MLuc7 демонстрирует высокую активность, а также термостабильность с сохранением до 70% начальной активности после инкубации при 100°C в течение часа. Однако различались температурные оптимумы – около 5°C для MLuc2 и 16°C для MLuc7. Известно, что белки, обладающие низким оптимумом по сравнению с родственными, характеризуются большей гибкостью структуры. Колориметрической реакцией по Элману было показано, что MLuc2 имеет 2 свободных тиольных группы, свидетельствующих об отсутствии одной S-S-связи. Структурные различия были также подтверждены спектральными исследованиями тушения триптофановой флуоресценции – MLuc2 характеризовался более низкими значениями полуживучести тепловых переходов (T_m). Мы предполагаем, что новая психрофильная люцифераза MLuc2 может быть потенциально эффективным биолюминесцентным репортером, предназначенным для изучения холодолюбивых организмов, а также служить моделью для исследования психрофильных белков. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 14-14-01119.*

РОЛЬ ФАКТОРА ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ eIF3j В РАСПОЗНАВАНИИ 3'-КОНТЕКСТА СТОП КОДОНОВ ЭУКАРИОТ

А.С. Кущенко^{1,2}, Т.В. Михайлова¹, Е.Е. Соколова¹, Е.З. Алкалаева¹ ¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН; ²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Белок eIF3j является одной из 13 субъединиц фактора инициации трансляции эукариот eIF3. Ранее было показано, что его присутствие в факторе инициации eIF3 помимо инициации трансляции, оказывает существенное влияние на рециклинг рибосом, происходящий после терминации трансляции (Pisarev et al., 2007). Более того выяснилось, что гиперэкспрессия его дрожжевого гомолога Hcr1 снижает сквозное чтение стоп кодонов в штаммах с мутантными факторами терминации трансляции (Beznoskova et al., 2013). То есть eIF3, содержащий Hcr1 субъединицу потенциально может влиять и на терминацию. Для определения роли этого белка в терминации трансляции человека, нами были клонированы две его аннотированные изоформы, а также получено пять мутантных форм данного белка. Нам удалось показать *in vitro*, что индивидуальная j субъединица фактора eIF3 человека без участия остальной части инициаторного фактора увеличивает эффективность гидролиза пептидил-тРНК в терминационном комплексе. Проверка влияния белка eIF3j и его мутантных форм на эффективность терминации стоп кодонов, окруженных различными нуклеотидными контекстами, дает возможность установить молекулярный механизм его влияния на распознавание 3'-контекста стоп кодонов эукариот. *Работа была поддержана грантом РФФИ (№16-34-00494 мол_а).*

1. Beznoskova P., Cuchalova L., Wagner S., Shoemaker C.J., Gunisova S., Von der Haar T., Valasek L.S. (2013) Translation initiation factors eIF3 and HCR1 control translation termination and stop codon read-through in yeast cells. *PLoS Genet*, 9, e1003962.
2. Pisarev AV, Hellen CU, Pestova TV (2007) Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell*, 131(2): 286-299.

ВЛИЯНИЕ ДЕЛЕЦИИ ДВУХ ПЕТЕЛЬ В AAA+-МОДУЛЕ LON-ПРОТЕАЗЫ *E. COLI* НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТА

А.М. Куджаев, Е.С. Дубовцева, О.В. Серова, А.Г. Андрианова, Т.В. Ротанова
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

LonA-протеаза *E. coli* (Ec-Lon) – АТФ-зависимый гомогексамерный фермент, относящийся к суперсемейству AAA+-белков (АТФ-аз, ассоциированных с различными клеточными активностями) – является ключевым участником системы контроля качества клеточного протеома, функционирующей во всех доменах жизни. Фермент избирательно деградирует де-

фектные и некоторые регуляторные белки по процессивному механизму в условиях сопряжения протеолиза с гидролизом АТР. Отличительной характеристикой Ec-Lon служит способность к связыванию ДНК. Субъединица Ec-Lon (784 а.о.) состоит из пяти доменов: N–H(CC)–NB–H–P, где нуклеотидсвязывающий и α -спирализованный домены формируют АТР-азный модуль (NB–H), С-концевой Р-домен представляет серин-лизиновую пептидгидролазу, а N-концевой и следующий за ним α -спирализованный домены образуют некаталитическую область (N–H(CC)), включающую coiled-coil(CC)-участок. Определены кристаллические структуры четырех (кроме H(CC)) доменов Ec-Lon и родственных LonA-протеаз. Пространственные структуры полноразмерных ферментов подсемейства LonA до сих пор не известны. Ранее мы показали, что наличие H(CC)-домена определяет топологическое сходство LonA-протеаз с шаперонами семейств Clp(A-C), содержащими по два AAA+-модуля. Установлено, что в гомологичных сайтах NB-доменов Lon и Clp локализованы подвижные петли, которые в шаперонах взаимодействуют с белками-мишенями и участвуют в их разворачивании внутри гексамерных АТР-азных колец. Делеция этих петель в ClpC позволила получить конформационно стабильную форму шаперона и определить его кристаллическую структуру. С целью решения пространственной структуры Ec-Lon и выявления роли соответствующих петель в функционировании фермента получена и охарактеризована модифицированная форма Ec-Lon-d2 с двумя делециями в АТР-азном модуле (остатки V385-I399 и D431-P436). Показано, что данные делеции приводят к снижению эффективности работы АТР-азного и пептидазного центров фермента, а также к утрате его способности к связыванию и гидролизу белкового субстрата. Кроме того, форма Ec-Lon-d2 не проявляет аутолитической активности. Установлено также, что в отличие от интактной Ec-Lon препараты Ec-Lon-d2 не содержат эндогенную нуклеиновую кислоту.

КИНЕТИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ИНГИБИРОВАНИЯ ПРОСТАГЛАНДИН Н СИНТАЗЫ НЕСТЕРОИДНЫМИ ПРОТИВО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

В.И. Бархатов, А.А. Ефремов, А.В. Кривошей, И.С. Филимонов, П.В. Вржеш

Международный учебно-научный биотехнологический центр МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Димерный фермент простагландин Н синтаза (циклооксигеназа, PGHS) является центральным звеном в биосинтезе простагландинов – регуляторов важных физиологических процессов, медиаторов боли и воспаления. Для фермента характерна быстрая инактивация в процессе катализируемых реакций. Ингибирование PGHS обуславливает фармакологическое действие нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП). В литературе обсуждается довольно много механизмов ингибирования PGHS (обратимые/необратимые, одно-, двух- и трехстадийные). НПВП принято делить на «медленные» и «быстрые». Несмотря на большое количество работ, посвященных НПВП, кинетический механизм действия этих веществ до конца не установлен.

В нашей работе предложена схема экспериментального изучения кинетического механизма действия НПВП, включающая как измерение временных зависимостей ассоциации и диссоциации фермент-ингибиторных комплексов, так и получение зависимости относительной активности от концентрации ингибитора в равновесных условиях. В рамках предложенной схемы изучено взаимодействие ингибиторов с ферментом в предстационарном и равновесном режимах, определены равновесные константы ингибирования и элементарные константы прямой и обратной реакций. Отмечено, что, чем «быстрее» ингибитор, тем слабее он связывается с PGHS-1. В случае индометацина, диклофенака, кеторолака, ибупрофена показано, что механизм действия этих НПВП описывается простой одностадийной схемой, а в случае напроксена – одностадийной схемой с учётом предполагаемого кооперативного взаимодействия циклооксигеназных активных центров гомодимера PGHS-1. Также показано, что все эти ингибиторы полностью обратимы. Замечен парадоксальный эффект, заключающийся в том, что присутствие ингибитора, уменьшая скорость ферментативной реакции и наблюдаемую скорость инактивации фермента в процессе реакции, в некоторых случаях приводит к повышению конечного выхода продукта реакции. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-04-00737а.*

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ РАСЩЕПЛЕНИЯ 2А ПЕПТИДОМ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ

Е.Ю. Шувалова^{1,2}, Е.З. Алкалаева¹ ¹*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва;* ²*Волгоградский государственный университет, Волгоград, Россия*

В процессе синтеза белка некоторые последовательности мРНК или растущей полипептидной цепи могут влиять как на скорость, так и на результат трансляции. Вирусы широко используют различные посттранскрипционные стратегии регуляции синтеза белка для осуществления неканонической трансляции. Одним из таких примеров являются 2А и 2А-подобные пептиды, которые могут осуществлять разрыв полипептидной цепи при участии факторов трансляции. Имеющиеся в литературе данные, касающиеся участия факторов терминирования в механизме осуществления реакции гидролиза и высвобождения пептида противоречивы. Поэтому, целью нашего исследования было определение роли факторов трансляции в осуществлении процесса расщепления 2А пептидом полипептидной цепи на примере STR6 элемента из белков CATERPILLER. Нами были заклонированы конструкции для синтеза модельной мРНК, содержащей STR6 элемент из белков CATERPILLER иммунной системы морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus*, а также внесены мутации в эту последовательность. На полученных модельных мРНК были собраны инициаторные и элонгационные рибосомные комплексы в реконструированной системе трансляции эукариот. Дальнейшие эксперименты позволили определить роль факторов трансляции в механизме расщепления пептидил-тРНК в данной системе. *Работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-50027 мол_нр*

ПРИРОДНЫЕ АБЗИМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ С ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Д.А. Паршукова¹, Л.П. Смирнова¹, Е.Г. Дмитриева¹, Е.С. Одинцова², С.А. Иванова¹, Г.А. Невинский², В.Н. Бунева²

¹*НИИ психического здоровья, Томск;* ²*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

В настоящее время известно большое количество реакций, катализируемых природными антителами – абзимами, при этом субстратная специфичность абзимов в ряде случаев выше, чем у аналогичных ферментов. Природные абзимы расщепляющие ДНК, РНК, полисахариды, олигопептиды и белки описаны для пациентов, страдающих аутоиммунными заболеваниями, вирусными или бактериальными инфекциями. С точки зрения фундаментальных исследований особый интерес представляет механизм, с помощью которого такие антитела реализуют свои каталитические свойства. Шизофрения – прогресси-

рующее психическое заболевание, приводящее к необратимому нарушению социальной адаптации и инвалидизации больных в молодом возрасте. У больных шизофренией обнаружено повреждение гематоэнцефалического барьера наряду с сенсибилизацией к нейрогенным антигенам, в том числе появление антител к основному белку миелина (ОБМ). Каталитические свойства антител больных шизофренией не изучены. В настоящей работе представлены доказательства того, что IgG, выделенные из сыворотки крови пациентов больных шизофренией катализируют специфический гидролиз человеческого ОБМ. На основании проверки строгих критериев показано, что каталитическая активность является собственным свойством АТ. В результате исследования показано, что IgG больных шизофренией осуществляют специфический гидролиз таких белков как: человеческий сывороточный альбумин, коллаген, ОБМ и его пептиды (ОП-21, ОП-25). Относительная активность IgG к ОБМ у больных шизофренией более чем в 5 раз превосходит активность IgG здоровых лиц и достигает 73,07%, % гидролиза ОП-21 и ОП-25 у больных также достоверно выше. Согласно нашим данным, уровень АТ к ОБМ в группе больных шизофренией достоверно выше, чем у здоровых лиц ($p=0,0004$). Следовательно, вероятно, имеет место субстратная индукция протеолитической активности абзимов. Полученные в настоящей работе значения K_m для ОБМ в качестве субстрата составили $K_m = 4,5 \cdot 10^{-5}$ М, $k_{cat} = 29,5 \text{ min}^{-1}$. Ингибиторный анализ протеолиза олигопептида ОБМ-21 показал максимальное ингибирование (60–100%) такими ингибиторами как EDTA и PMSF, что характерно для металлопротеаз и протеаз серинового типа. *Работа поддержана грантом РФФИ № 14-15-00480 «Поиск ключевых биомаркеров патогенеза социально значимых эндогенных психических расстройств» 2014-2016 гг.*

АНТИТЕЛА-НУКЛЕАЗЫ ПРИ ШИЗОФРЕНИИ

Е.А. Ермаков, Л.П. Смирнова, С.А. Иванова, В.Н. Бунева *Новосибирский государственный университет, Новосибирск; Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; НИИ психического здоровья, Томск, Россия*

Шизофрения связана с нарушением нейротрансмиттерных процессов и синаптической пластичности в центральной нервной системе, а также дисрегуляцией в системе гуморального иммунитета. Так у больных шизофренией повышен общий титр IgG, среди которых обнаружены аутоантитела к различным рецепторам головного мозга. Предполагается, что образование подобных антител (АТ) приводят к изменениям нейротрансмиттерного метаболизма и развитию психопатологических симптомов. Одним из важных критериев иммунологических нарушений является наработка каталитически активных АТ или абзимов. Целью данной работы было изучить ДНК- и РНК-гидролизующую активности IgG больных шизофренией. Впервые показано, что IgG больных шизофренией обладают ДНК- и РНК-гидролизующей активностью. Установлено, что относительная ДНК-азная активность IgG в реакции гидролиза плазмиды pBluescript в среднем составила $55,37 \pm 32,55\%$. АТ здоровых доноров демонстрировали низкую активность (в среднем $9,12 \pm 6,5\%$). При этом ДНК-азная активность АТ у больных шизофренией с ведущей негативной симптоматикой была достоверно выше ($73,26 \pm 23,77\%$), чем у больных с ведущей позитивной симптоматикой ($43,3 \pm 33,1\%$). Исследование РНК-гидролизующей активности на различных субстратах показало ее уменьшение в ряду: $\text{сСМР} > \text{polyC} > \text{polyA} > \text{дрожжевая РНК}$. Определение РНК-азной активности *in-situ* в геле, содержащем субстрат (дрожжевая РНК), показало, что активностью обладают как легкие, так и тяжелые цепи иммуноглобулинов. Показано, что ионы металлов Mg^{2+} и Mn^{2+} обладали ингибирующим действием, а Zn^{2+} – активирующим. Продemonстрировано, что IgG больных шизофренией, обладающих нуклеазными активностями, снижали выживаемость культуры клеток MCF-7 на 10–28%. Установлено, что спектр продуктов гидролиза флуоресцентно-меченой miR-137 варьирует от пациента к пациенту. Учитывая, что miR-137 участвует в регуляции экспрессии генов, участвующих в нейрональной дифференцировке, процессах выхода и обратного захвата нейромедиаторов, исследование IgG, обладающих РНК-азной активностью и гидролизующих miR-137, позволяет не только установить специфичность их гидролиза, но и выявить их роль в патогенезе шизофрении. *Работа поддержана грантами Комплексной программы Сибирского отделения РАН № III.2П.1 1.7.15 и РФФИ № 16-04-00603.*

СТРУКТУРНАЯ ДИНАМИКА D-ГЛЮКОЗА/D-ГАЛАКТОЗА-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА В РАСТВОРАХ ХИМИЧЕСКИХ ДЕНАТУРАНТОВ. ВЛИЯНИЕ МАЛЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ GDNHCL НА СРОДСТВО GGBP К ГЛЮКОЗЕ

А.В. Фонин¹, И.М. Кузнецова¹, К.К. Туроверов^{1,2}

¹Институт цитологии РАН; ²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Взаимодействие D-глюкоза/D-галактоза-связывающего белка (GGBP) с его лигандами сопровождается существенным изменением распределения конформеров в ансамбле молекул GGBP. Поэтому изучение конформационных состояний этого белка в различных условиях важно не только для понимания механизма фолдинга GGBP, но и его функциональной активности. В настоящей работе исследованы структурные изменения мутантной формы GGBP/H152C с присоединенным флуоресцентным красителем BADAN в растворах гуанидингидрохлорида (GdnHCl) и мочевины. Совместный анализ изменения флуоресцентных характеристик красителя, ковалентно присоединенного к GGBP/H152C, и триптофановых остатков белка позволил установить различную стабильность N и C-концевых доменов GGBP/H152C. Показано, что связывание белка с глюкозой стабилизирует только C-концевой домен GGBP/H152C. Установлено, что структура развернутого белка в 3 М GdnHCl и 4 М мочевины различна. Наблюдаемое увеличение интенсивности флуоресценции красителя в области предденатурационных концентраций GdnHCl (до 0.2 М) было объяснено смещением равновесия между конформерами GGBP/H152C в сторону более компактных форм белка, активный центр которых более комплементарен структуре лиганда. Это должно способствовать увеличению скорости и аффинности связывания белка с сахаром. Методами флуоресцентной спектроскопии и калориметрии изотермического титрования это предположение было подтверждено для мутантной формы GGBP/H152C и белка дикого типа. Предденатурационные концентрации мочевины не оказывают такого эффекта на функциональную активность GGBP и GGBP/H152C. Полученные данные позволили заключить, что действие малых концентраций GdnHCl на структуру и функциональную активность GGBP аналогично действию нейтрализующих осмолитов – веществ, основной функцией которых является компенсация дестабилизирующего действия стрессовых факторов за счет значительного увеличения стабильности и функциональной активности белков. *Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-24-00131). А.В.Ф. является стипендиатом Президента РФ (СП-1725.2015.4).*

ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ КСАНТИНОКСИДАЗЫ ПЕКТИНОВЫМИ ПОЛИСАХАРИДАМИ

В.В. Смирнов *Институт физиологии КомиНЦ УРО РАН, Сыктывкар, Россия*

Пектиновые полисахариды обладают защитным действием при воспалении кишечной стенки у млекопитающих, которое может быть обусловлено ингибированием активности оксидаз пищеварительного тракта. Цель исследования заключается в определении механизма ингибирования активности ксантиноксидазы пектиновыми полисахаридами *in vitro*. Раствор ксантиноксидазы (0,2 ед/мг белка, pH 7,8) инкубировали в присутствии ксантина (субстрат) и ряда пектинов (0,25–20 мг/мл) в течение 5 мин при 37°C. Активность фермента определяли по скорости образования мочевой кислоты в растворе (290 нм), а также по восстановлению цитохрома с (580 нм). Пектины снижают образование мочевой кислоты на 9–61%, а восстановление цитохрома с на 10–47%. Наибольшей ингибирующей активностью обладает пектин, выделенный из лука репчатого (аллиуман), который в концентрации 1 мг/мл уменьшает образование мочевой кислоты на 61%. Ингибирование ксантиноксидазы аллиуманом происходит по смешанному типу (K_m не изменяется, а V_{max} снижается), т.е. макромолекулы полисахарида взаимодействуют как со свободным ферментом, так и фермент-субстратным комплексом. Показано, что ингибирующая активность аллиумана увеличивается с 41 до 48% при добавлении хлорида натрия в среду. Обнаружено, что пектин, выделенный из сливы обыкновенной, в концентрации 5, 10 и 20 мг/мл ингибирует ксантиноксидазу не пропорционально – на 20, 40 и 27%, соответственно. Полученные данные указывают на то, что электростатическое взаимодействие макромолекул белка и полисахарида, а также увеличение вязкости раствора не являются факторами, обуславливающими ингибирование ксантиноксидазы. Предположено, что остатки галактозы в боковых цепях пектинов вовлечены в ингибирование ксантиноксидазы, что подтверждается высокой ингибирующей способностью (97%) фракции пектина сливы, содержащей наибольшее количество остатков галактозы ($Gal/Ara=1,24$), по сравнению с активностью (38%) исходного пектина ($Gal/Ara=0,78$). Таким образом, ингибирующее действие пектинов на ксантиноксидазу обусловлено их взаимодействием с ферментом и/или фермент-субстратным комплексом, в которое, по-видимому, вовлечены боковые цепи пектиновой макромолекулы.

КОНФОРМАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА НЕВАЛЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ПАПАИНА С МОДЕЛЬНЫМИ СУБСТРАТАМИ

Р.Э. Алиев *Бакинский государственный университет, Баку, Азербайджан*

Кристаллографические данные о структуре комплексов тимолиновой амидгидролазы папаина с субстратоподобными ингибиторами [1] касаются только статического состояния фермента и не отвечают на вопрос о возможных конформационных перестройках активного центра и субстрата в процессе каталитического акта. В настоящем сообщении, используя трехмерные структуры нативного папаина и его ингибиторных комплексов методом молекулярной механики изучены конформационные аспекты взаимодействия папаина с рядом модельных субстратов: $Ac-L-Gly-NHMe$; $Ac-L-Ile-NHMe$; $Ac-L-Asp-NHMe$. Целью нашего исследования является анализ конформационных возможностей боковых цепей реакционных остатков (Cys25, His159, Asn175 и Gln19) до сорбции субстрата, т.е. в предкаталитическом состоянии и в продуктивных фермент-субстратных комплексах. При проведении конформационных расчетов невалентных комплексов, мы исходили из того, что осуществляемый цистеиновыми протеазами гидролиз пептидной связи относится к ковалентному типу катализа [2] и не были связаны ни с какими априорными предположениями о конкретной схеме катализа. При расчете продуктивных конформаций невалентных комплексов папаина с субстратами мы использовали подход к изучению ферментативного катализа, допускающий разделение и независимое рассмотрение конформационных и электронных стадий каталитического акта [3]. Показано, что реакционные остатки Cys25, His159, Asn175 и Gln19 в активном центре нативного фермента и его невалентных комплексах находятся в низкоэнергетических состояниях. Проведенный стереохимический анализ невалентных комплексов папаина показал, что конформационные перестройки этих остатков при образовании фермент-субстратных комплексов не требуют преодоления высоких потенциальных барьеров и совершаются исключительно за счет стабилизирующих взаимодействий между ферментом и субстратом.

1. Drenth I., Kalk K.H., Swen H.M. *Biochem.*, 1976, v.15 p. 3731–3738.
2. Антонов В.К. *Химия протеолиза* (М.: Наука, 1991), с. 504
3. Попов Е.М. *Структурно-функциональная организация белков* (М.:Наука, 1992, с. 358

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТАБОЛИТОВ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ С ЛИГАНДАМИ

Е.А. Рыскина, Ф.Н. Гильмиярова, Н.Н. Чернов *Российский университет дружбы народов, Москва, Россия*

В настоящее время, данные о функционировании низкомолекулярных соединений, которые способны регулировать межмолекулярные взаимодействия, весьма ограничены. Интерес представляют эндогенные метаболиты – пируват, лактат и этанол, высокая реакционная способность которых, определяет важность изучения их влияния на процессы антиген-антительного и фермент-субстратного взаимодействия. Впервые проведено тестирование естественных метаболитов и антигенных детерминант методом *in silico*, предсказаны многопрофильные и разнообразные фармакологические эффекты и молекулярные механизмы действия пирувата, лактата и этанола и антигенных детерминант антигенов А и В системы АВ0. Полученные экспериментальные данные, свидетельствуют о модификации взаимодействий антигена с антителом в присутствии пирувата, лактата и этанола, что приводит к регистрируемому изменению степени и скорости агглютинации. Установлено, разнонаправленное действие пирувата, лактата и этанола на процесс агглютинации антигенов А и В, естественных и моноклональных антител системы АВ0. Для подтверждения регуляторной роли этанола на белок-лигандные взаимодействия были изучены фермент-субстратные. Установлено, что этанол повышает активность дегидрогеназ как в многокомпонентной среде (гемолизате эритроцитов), так и в однокомпонентной среде. Нами впервые использованы два высокотехнологичных метода исследования – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия и проточная цитофлуориметрия для качественной и количественной оценки антиген-антительных комплексов. Выявлено разнонаправленное действие пирувата и этанола на экспрессию антигенных детерминант, показано не только изменение размера агглютинатов, но и их количества. Блок полученных результатов является новым фактическим материалом, характеризующим особенности белок-лигандного взаимодействия, лежащие в основе способности антигенов, антител и ферментов активно взаимодействовать с различными лигандами, находящихся в микроокружении или опосредованно реагировать на их присутствие в среде.

ВЛИЯНИЕ КРАУДИНГА НА АГРЕГАЦИЮ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ

Н.А. Чеботарева, С.Г. Роман, Т.Б. Ероина, В.В. Михайлова, Б.И. Курганов

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

В клетке все биологические процессы протекают в условиях краудинга. Краудинг подразумевает неспецифическое влияние стерического отталкивания молекул на специфические реакции в среде, часть объема которой исключается. Теория предсказывает сильное влияние краудинга на взаимодействия макромолекул всех типов. Краудинг стимулирует более компактную конформацию, фолдинг и ассоциацию белка. В последние десятилетия возросло понимание влияния краудинга на фолдинг, структуру и функции белка. Агрегация белка является более сложным процессом, включающим стадии разворачивания молекулы, стадию нуклеации и стадии роста агрегатов. Краудинг может противоположным образом влиять на стадии денатурации и агрегации белков, что затрудняет интерпретацию общего эффекта. В случае олигомерных белков, для которых денатурация происходит по диссоциативному механизму, краудинг может влиять как на стадию диссоциации, так и на стадию разворачивания. Нами показано, что при тепловой денатурации гликогенфосфорилазы b (ФБ) при 48°C краудинг препятствовал диссоциации. Малые белки теплового шока (sHsps) принадлежат классу молекулярных шаперонов и предотвращают агрегацию развернутых белков путем их связывания. sHsps характеризуются полидисперсной, динамичной четвертичной структурой, которая необходима для проявления анти-агрегационной активности. Показано, что краудинг может влиять на конформацию, динамичную олигомерную структуру sHsps и на их активность. Влияние краудинга на анти-агрегационную активность α -кристаллина, представителя семейства sHsps, изучено на тест-системе, основанной на агрегации УФ-облученной ФБ (УФ-ФБ). Эта тест-система позволяет исследовать влияние разных агентов непосредственно на стадию агрегации белка. Методом динамического светорассеяния на этой тест-системе показано, что краудинг ускоряет стадию агрегации белка (при 20 и 37°C). Показано, что sHsp образует первичный комплекс с УФ-ФБ, который претерпевает структурную реорганизацию с образованием комплексов двух типов, обладающих разной способностью к агрегации в условиях краудинга. Определено время полупревращения первичного комплекса (6,2 мин). Предложена схема взаимодействия sHsp с УФ-ФБ. *Работа поддержана грантом РФФИ (16-04-00560-а) и Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».*

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕМИЦЕЛЛЮЛАЗНОГО КОМПЛЕКСА *GEOTRICHUM CANDIDUM* ЗС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТИОГЛИКООЛИГОСАХАРИДОВ

Е.В. Энейская¹, Д.Р. Иванен¹, К.С. Бобров¹, С.Н. Нарыжный^{1,2}, В.Г. Згода², С.В. Швецова^{1,3}, А.А. Кульминская^{1,3}

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ Курчатовский институт, Гатчина; ²Институт биомедицинской химии, Москва; ³Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Изучение мультимерных комплексов, а также поиск ферментов со строгой специфичностью требуют использования субстратов, позволяющих определять активность каждого из ферментов в присутствии других. Ксилан- и целлюлозо-деградирующий ферментный комплекс обнаружен во многих организмах и широко используется в различных отраслях биотехнологии, в связи с чем в мире ведутся интенсивные исследования гемицеллюлазных ферментов, в частности, эндо-ксиланаз, целлюлаз и эндо-глюканаз. Структуры природных субстратов для этих групп ферментов весьма схожи, различаясь лишь по мономерному составу полисахарида (ксилоза и глюкоза, соответственно). Несмотря на столь малое отличие, ферменты каждой из этих групп проявляют основную активность к «своему» субстрату. Однако, нередки случаи и перекрестной активности, что затрудняет поиск и дальнейшую характеристику изучаемых ферментов. В ходе представляемой работы были синтезированы тимо-глоко и тимо-ксилоолигосахариды с различной степенью полимеризации. С использованием этих субстратов был получен профиль эндо-глюканазных и эндо-ксилазназных активностей, детектируемых уже на первом этапе очистки ферментов, секретируемых мицелиальным грибом *G. Candidum* ЗС, с применением гидрофобной хроматографии. В результате анализа профиля было выделено несколько потенциальных зон для выделения индивидуальных гемицеллюлаз. Ферменты были получены в гомогенном состоянии и охарактеризованы. Данные масс-спектрометрического исследования позволили предположить, что все очищенные белки являются ксиланазами. Было показано, что выделенные в ходе работы ксиланазы обладают двойной активностью и могут с достаточной эффективностью гидролизовать не только ксило-, но и глюкозосодержащие олигосахариды. *Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ № 14-08-01041 (синтез субстратов и построение профиля) и за счет гранта Российского научного фонда, проект № 16-14-00109 (выделение, идентификация и анализ ферментов).*

УЧАСТИЕ АПОЛИПОПРОТЕИНА А-1 В ТРАНСПОРТЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА В КЛЕТКИ

Д.В. Суменкова, Л.М. Поляков *Государственный медицинский университет; Институт биохимии, Новосибирск, Россия*

Проблема направленного транспорта лекарственных препаратов и генетического материала в клетки является одной из центральных в современной медицинской биотехнологии. Белковые компоненты липопротеиновых частиц имеют ряд преимуществ как природные переносчики. В работе показана способность апоА-1 и ЛПВП выступать в качестве транспортной формы рубомицина, изониазида и генетического материала (эукариотический вектор с геном флуоресцирующего белка; предоставлен проф. А.Б. Беклемишевым). Связывание апоА-1 (ЛПВП) с лигандами изучали методом тушения триптофановой флуоресценции. Использовали культуру клеток асцитной НА-1 гепатомы мышей и гепатоцитов крыс; модель БЦЖ-индуцированного туберкулезного воспаления [Шкурूपий В.А., 2007]. Адекватность модели тестировали морфологическими методами. На частицах ЛПВП обнаружено 60 мест связывания для рубомицина, из них 20 – с более высоким аффинитетом. Поглощение комплекса ЛПВП-рубомицин опухолевыми клетками происходит путем рецептор-опосредованного эндоцитоза и является специфическим. Эффективность поглощения препарата в составе комплекса в 1,6 раза выше по сравнению с контролем. Цитотоксический эффект комплекса, оцениваемый с использованием красителя Хёкст, в 1,4–3,4 раза выше в зависимости от дозы препарата: с увеличением дозы препарата различия в формах его применения уменьшались. На молекуле апоА-1 обнаружено 70 мест связывания для изониазида. Применение апоА-1 на фоне антимикобактериальной терапии изониазидом повышает свободную активность ферментов лизосом печени. Использование апоА-1, меченного коллоидным золо-

том, показало взаимодействие белка с клеточной стенкой микобактерии, что может указывать на антимикобактериальные свойства апоА-I, описанные в литературе для стафилококков и кишечной палочки. Результаты флуоресцентной микроскопии и спектрофлуориметрии гепатоцитов, инкубированных с комплексом апоА-I-вектор, а также выделенных из печени крыс после введения комплекса *in vivo* свидетельствуют о способности белка транспортировать генетический материал в ядро с последующей экспрессией трансфицированного гена. Накопления флуоресцирующего белка в отсутствие апоА-I не наблюдалось. Проведенные исследования свидетельствуют о возможности использования апоА-I как наноносителя лекарственных препаратов и генетического материала.

ПРИМЕНЕНИЕ НУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРАКТИЧЕСКИ ВАЖНЫХ НУКЛЕОЗИДОВ

С.Н. Михайлов *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*

Для получения практически важных нуклеозидов активно разрабатываются и применяются технологии, основанные на ферментативных реакциях транскликозилирования – переноса углеводного остатка с одного гетероциклического основания на другое. Эти реакции катализируют нуклеозидфосфоорилазы, которые осуществляют обратимый фосфорилиз нуклеозидов с образованием соответствующего гетероциклического основания и 1-фосфата моносахарида. Ферментативные методы синтеза существенно дополняют химические и в некоторых случаях имеют ряд преимуществ. К нуклеозидфосфоорилазам относятся тимидинфосфоорилаза (ТФ) (КФ 2.4.2.4), уридинфосфоорилаза (УФ) (КФ 2.4.2.3) и пуриннуклеозидфосфоорилаза (ПНФ) (КФ 2.4.2.1). Равновесие этих реакций сдвинуто в сторону образования нуклеозидов, причем в случае пуриновых более значительно. На этом и основана ферментативная реакция транскликозилирования, в ходе которой происходит перенос углеводного остатка от пиримидинового нуклеозида (B-Nuc) на пуриновое гетероциклическое основание (B').

В ходе выполнения работы получены следующие основные результаты: 1. Изучена субстратная специфичность и механизм действия нуклеозидфосфоорилаз *E.coli*. 2. Определены константы равновесия ферментативного фосфорилиза природных нуклеозидов и их аналогов. $\text{Нуклеозид} + \text{P}_i \rightleftharpoons \text{Основание} + \text{рибозо-1-фосфат}$. 3. Установлены основные факторы, влияющие на равновесие ферментативного транскликозилирования и определяющие выходы желаемых продуктов. 4. Оптимизированы условия получения ряда практически важных нуклеозидов. *Работа выполняется при финансовой поддержке РНФ (проект № 16-14-00178).*

КОМПЛЕКС ИНТЕГРАЗЫ ВИЧ-1 С КЛЕТОЧНЫМ БЕЛКОМ Ku70: СТРУКТУРА И ПОИСК ИНГИБИТОРОВ

А.Н. Анисенко, Е.С. Княжанская, Т.С. Зацепин, М.Б. Готтх

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

На сегодняшний день разработан широкий спектр препаратов для борьбы с ВИЧ инфекцией. В основном это ингибиторы вирусных ферментов: обратной транскриптазы, протеазы и интегразы (ИН). Ключевая проблема при их применении – развитие лекарственной устойчивости вируса. В связи с этим актуальна разработка ингибиторов ВИЧ-1, активных против резистентных форм. Один из ключевых вирусных ферментов, ИН, функционирует в составе макромолекулярного прединтеграционного комплекса, в состав которого входят вирусные и клеточные белки-помощники. Этот комплекс представляет интересную мишень для создания ингибиторов ВИЧ-1 нового поколения. Известно, что в состав прединтеграционного комплекса входит белок человека Ku70. Снижение внутриклеточного уровня Ku70 негативно сказывается на репликации вируса. Предполагается, что Ku70 взаимодействует с ИН и защищает ее от протеасомной деградации. Соответственно, нарушение взаимодействия между ИН и Ku70 будет приводить к подавлению репликации вируса. Для создания соединений, способных препятствовать образованию комплекса ИН и Ku70 следует выяснить его структуру. В настоящей работе мы показали, что очищенные рекомбинатные белки ИН и Ku70 действительно формируют стабильный комплекс *in vitro* ($K_d=70$ нМ). С помощью широкого спектра делеционных мутантов как ИН, так и Ku70 нам удалось установить, что комплекс формируется за счет двух сайтов связывания. Первый сайт формируется за счет взаимодействия аминокислот 160–220 в составе интегразы и 1–250 в составе Ku70. В формировании второго сайта участвуют остатки 51–160 в составе ИН и 251–439 в составе Ku70. Причем первый сайт вносит преимущественный вклад в стабилизацию комплекса двух белков, поскольку точечные аминокислотные замены E212A и L213A в структуре ИН нарушают взаимодействие между ИН и Ku70. Также мы обнаружили, что конъюгат 11-звенного 2'-О-метилированного олигорибонуклеотида с эозином (11-ОМ-Е) ингибирует образование комплекса ИН с Ku70 ($IC_{50}=25$ нМ). Учитывая, что связывание 11ОМ-Е происходит в С-концевом домене ИН, можно предположить аллостерический механизм ингибирования. *Работа поддержана Российским научным фондом (грант РНФ № 14-14-00489) и Российским фондом фундаментальных исследований (грант РФФИ № 14-04-00833).*

ГЕМОГЛОБИН НЕ ЯВЛЯЕТСЯ ПЕРВИЧНЫМ АКЦЕПТОРОМ ОКСИДА АЗОТА, ВЫСВОБОЖДАЮЩЕГОСЯ ПРИ МЕТАБОЛИЗМЕ НИТРОГЛИЦЕРИНА

Е.А. Калаева, В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева *Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия*

Нитроглицерин (НГ) рассматривается как эталонный препарат в группе нитратов, применяемых для купирования и профилактики приступов стенокардии. Активной группой НГ являются нитрит-ионы (NO_2^-), высвобождающиеся в ходе реакций с участием эндогенных тиолов. Затем происходит восстановление NO_2^- до NO ферментативным или неферментативным путем. Образовавшийся оксид азота оказывает вазодилаторное действие через активацию гуанилатциклазы. Гемоглобин претендует на роль основного переносчика NO в кровеносном русле. Однако, учитывая наличие *in vivo* конкурирующих систем связывания и утилизации NO, это утверждение нуждается в серьезной проверке. Скорость реакции NO с внутриэритроцитарным гемоглобином в 800 раз меньше, чем с эквивалентным количеством свободного гембелка. Клеточная мембрана эритроцитов не является существенным барьером для NO и не лимитирует его взаимодействие с гемоглобином. Критическими факторами, определяющими скорость захвата NO эритроцитами, является ориентация мембрансвязанных молекул гемоглобина и его внутриклеточное распределение. Таким образом, аккумуляция NO форменными и неклеточными элементами крови окончательно не изучена. Поэтому выявление механизмов и динамики взаимодействия NO со свободным и внутриэритроцитарным гемоглобином представляет несомненный теоретический и научно-практический интерес. Нами выявлена высокая устойчивость свободного и внутриэритроцитарного оксигемоглобина к воздействию НГ (в концентрациях

5 нг/мл и 5 мкг/мл) при их совместной инкубации в течение 0,3–3 часов. Дозозависимых эффектов действия НГ на физико-химические и функциональные свойства HbO₂ человека в указанном диапазоне концентраций не установлено. Изменений спектральных характеристик образцов HbO₂, инкубированных с НГ, в указанном временном интервале зарегистрировано не было. Образования HbNO или MtHb в течение первых 3-х часов взаимодействия исследуемого гемопротеида с лекарственным препаратом не происходило. Таким образом, учитывая короткое время полужизни НГ в плазме (около 3 мин), можно утверждать, что гемоглобин не является первичным акцептором оксида азота, высвобождающегося при восстановлении нитрит-ионов.

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ РАСТВОРИМЫХ И МЕМБРАНО-СВЯЗАННЫХ БЕЛКОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ МЕЛАФЕНА И ИХФАНОВ

О.М. Алексеева¹, Ю.А. Ким²

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН; ²Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

Изучено действие регулятора роста – мелафена (меламин-бисфосфиновая кислота) и гибридных мультитаргетных антиоксидантов ИХФАНов на структурную организацию растворимого белка – бычьего сывороточного альбумина (БСА), и белковых компонентов мембран тейей эритроцитов. Исследования проводили в широком диапазоне концентраций (10^{-16} – 10^{-2} М) водных растворов мелафена и водных эмульсий ИХФАНов (С8, С10, С12, С16). Спектральным методом (по интенсивности флуоресценции триптофанилов) регистрировали конформационные перестройки БСА. Флуоресцируют 2 триптофановых остатка в гидрофобных областях молекулы БСА. Один расположен близко к поверхности, другой внутри белка. При разрыхлении или разворачивании молекулы доступность триптофанилов для тушителя – кислорода, растворенного в воде, увеличивается. Регистрировали тушение триптофановой флуоресценции при применении больших концентраций мелафена и ИХФАНов (10^{-3} – 10^{-5} М). Малые концентрации 10^{-7} , 10^{-8} М ИХФАН С8, С10, С12, С16 защищали молекулу БСА от разворачивания. Максимальное предотвращение тушения показано для ИХФАН С16. Методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ДСК) изучали действие мелафена и ИХФАН-С10 на белки в мембранах тейей эритроцитов, регистрируя термодинамические характеристики белковых микродоменов. ДСК исследование в изотонических условиях выявляет пять структурных переходов в мембранах тейей обусловленных денатурацией белковых доменов цитоскелета. В присутствии мелафена (10^{-3} – 10^{-5} М) сдвига пиков перехода по температуре и изменений амплитуды не происходит. Т. е. мелафен не вызывает изменений, ведущих к потере белков, или к перестройке белковых доменов, как на свежeweделенных препаратах, так и при старении. Однако, ИХФАН С10 добавленный во время процедуры получения тейей эритроцитов в концентрации 10^{-5} М вызывает слияние микродоменов В1 и В2 и смещение температурных максимумов термоденатурационных пиков. Концентрация 10^{-6} М возвращает вид термограммы к контрольному. Т. е. малые концентрации ИХФАН С10 стабилизируют структуру белок-липидной мембраны.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РИБОСОМНОГО БЕЛКА L1 *HALOARCUA MARISMORTUI* СО СПЕЦИФИЧЕСКИМ ФРАГМЕНТОМ 23S рРНК

А.О. Михайлина, О.С. Костарева, У.Ф. Джус, С.В. Тищенко, С.В. Никонов Институт белка РАН, Пущино, Россия

Haloarcula marismortui – экстремально галофильная архея, которая функционирует в условиях с высокой концентрацией соли (3,5–4 М) при температурах до 60°C. Практически все белки этого организма, в том числе и рибосомные, имеют изоточку в кислой области рН (4–5), что помогает архее адаптироваться в таких экстремальных условиях. Целью наших исследований является изучение РНК-белковых взаимодействий в рибосомах микроорганизмов, живущих в экстремальных условиях. Рибосомный белок L1 образует L1-выступ большой субчастицы рибосомы и участвует в высвобождении транспортной РНК из Е-сайта рибосомы. Белок L1 независимо от других белков прочно связывается со специфическим фрагментом 23S рРНК. Ранее нам не удавалось определить константу диссоциации РНК-белкового комплекса, образованного рибосомным белком L1 *H. marismortui* (HmaL1) и фрагментом рРНК. Поскольку белок склонен к олигомеризации, обязательными этапами очистки белка являлись гидрофобная хроматография и гель-фильтрация. В результате, нами был получен стабильный комплекс HmaL1 со специфическим фрагментом рРНК из того же организма. Комплекс был сформирован в буфере, содержащем 3 М KCl, 0,5 М NH₄Cl, 20 мМ MgCl₂, 20 мМ Трис-НСl, рН=7,5. Методом поверхностного резонанса плазмонов определены кинетические константы РНК-белкового взаимодействия и рассчитана равновесная константа диссоциации комплекса (KD=1,9 нМ). Комплекс HmaL1-рРНК стабилен и обладает низкой константой скорости диссоциации (kd=1,4×10⁻⁵ с⁻¹). В буферах с более низкой концентрацией соли комплекс не образуется, поскольку белок в таких условиях не имеет явно выраженной вторичной структуры, что показано биофизическими методами (спектры кругового дихроизма). В настоящее время начаты эксперименты по кристаллизации HmaL1 в комплексе со специфическим фрагментом рРНК из того же организма. Пространственная структура данного комплекса позволит определить особенности взаимодействия рибосомного белка галофильной археи с РНК и даст возможность вписать эту структуру в электронную плотность большой рибосомной субчастицы *H. marismortui*, поскольку L1-выступ, вследствие своей высокой подвижности, не виден на картах электронной плотности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-00414_а) и Программы МКБ РАН.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРЕЗЕНТАЦИИ АУТОАНТИГЕННЫХ ПЕПТИДОВ НА МНС КЛАССА II, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ HLA-DM

А.Э. Мамедов¹, Н. Е. Воробьева², Ю.К. Сыкулев³, Н.А. Пономаренко¹, А.А. Белогуров¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²Институт биологии гена РАН, Москва, Россия;

³Университет Томаса Джефферсона, Филадельфия, США

Главный комплекс гистосовместимости II класса (МНС II) играет важную роль не только в адаптивном иммунном ответе на чужеродные патогены, но и в развитии ряда аутоиммунных заболеваний. Комплексы МНС II, располагаясь на поверхности антиген-презентирующих клеток, презентуют пептиды Т-клеточным рецепторам на поверхности Т-клеток, образуя тримолекулярные комплексы, которые в свою очередь запускают каскад иммунного ответа. В процессе загрузки МНС II пептидом

непосредственное участие принимает HLA-DM, неклассический вариант MHC, который ускоряет процесс обмена пептида на HLA-DR, предзагруженном пептидом инвариантной цепи CLIP.

Аллель HLA-DR2b (HLA-DRA, HLA-DRB1 1501) является одной из основных молекул, участвующих в развитии рассеянного склероза – хронического нейродегенеративного аутоиммунного заболевания. HLA-DR2b презентует иммуннодоминантный аутоантигенный пептид основного белка миелина (MBP) – MBP₈₅₋₉₉. В данной работе была найдена протективная в случае рассеянного склероза аллель HLA-DR1 (HLA-DRA, HLA-DRB1 0101). HLA-DR1 способен связывать пептиды MBP (MBP₈₁₋₁₀₄, MBP₁₄₆₋₁₇₀), причем, HLA-DM ускоряет данную загрузку также, как и для HLA-DR2b. С помощью нового подхода с использованием пептидов, слитных с тиоредоксином, был продемонстрирован механизм протективных свойств аллели HLA-DR1 в случае аутоантигенных пептидов MBP. В результате исследований наблюдался ингибирующий эффект CLIP при сравнении с HLA-DR2b и пептидом MBP₈₅₋₉₉, а также с HLA-DR1 и пептидом гемагглютинина вируса гриппа HA₃₀₆₋₃₁₈. Методология, использованная в данной работе, может быть использована для изучения особенностей презентации других вирусных и аутоантигенов и стать основой для разработки моделей исследования лекарственных средств.

Работа выполнена в рамках проекта Министерства образования и науки РФ RFMEFI60714X0061.

ВЛИЯНИЕ ГЛУТАТИОНИЛИРОВАНИЯ АЛЬФА-СУБЪЕДИНИЦЫ Na,K-АТРАЗЫ НА ЕЁ СТАБИЛЬНОСТЬ

Е.А. Дергоусова^{1,2}, Е.А. Климанова^{1,2}, И.Ю. Петрушанко², О.Д. Лопина¹ ¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова; ²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Na,K-АТРаза – фермент плазматической мембраны клеток животных, участвующий в переносе ионов Na и K через мембрану против электрохимического градиента. Фермент состоит из двух субъединиц: альфа и бета, с молекулярными массами 110 и 45–55 кДа соответственно. Каталитические функции выполняет альфа-субъединица [1]. Методом Вестерн-блоттинга с использованием антител против связанного с белком глутатиона и масс-спектрометрического анализа показано, что из 15 экспонированных в цитозоль SH-групп альфа-субъединицы Na,K-АТРазы из солевых желез утки (альфа-1-изоформа) связанный глутатион содержат (т. е. подвергнуты S-глутатионилированию) минимум 13 SH-групп. При дополнительной инкубации фермента с окисленным глутатионом наблюдается увеличение степени глутатионилирования α1-субъединицы Na,K-АТРазы и снижение её активности [2]. При инкубации Na,K-АТРазы с сильными химическими восстановителями (TCEP, NaBH₄) наблюдается лишь частичное деглутатионилирование SH-групп α1-субъединицы Na,K-АТРазы. Максимальное деглутатионилирование получено при использовании восстановителя NaBH₄ – в этом случае степень глутатионилирования снижается на 30–40%. Деглутатионилирование α1-субъединицы Na,K-АТРазы влияет на скорость образования триптических фрагментов. Трипсинолиз Na,K-АТРазы в среде со 150 мМ KCl (E2 конформация белка) в течение 1 ч приводит к образованию трёх триптических фрагментов с молекулярными массами 40 кДа, 35,5 кДа и 23 кДа. В деглутатионилированном препарате Na,K-АТРазы фрагмент 23 кДа появляется на 15 мин раньше, а фрагмент 40 кДа позже, чем в контроле. При трипсинолизе в среде, содержащей 0,5 мМ убаина (E2P конформация белка), в обоих случаях через 10 минут происходит почти полная дегградация высокомолекулярных фрагментов протеолиза (40 и 35,5 кДа фрагментов). Их дегградация в частично деглутатионилированном препарате Na,K-АТРазы происходит быстрее, чем в нативном. Обсуждается роль глутатионилирования SH-групп альфа1-субъединицы Na,K-АТРазы в процессе функционирования этого фермента. *Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № НК 15-04-08832 и РНФ № 14-14-01152.*

1. Blanco G., and Mercer R. W. (1998) Am. J. Physiol. 275, F633–F650
2. Petrushanko I., et al., (2012) J. Biol. Chem. 287, № 38, pp. 32195–32205.

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИЙ CRE-КАРМАНА БАКТЕРИАЛЬНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ В СИСТЕМАХ IN VITRO И IN VIVO

И.В. Петушков, Д.В. Пупов, А.В. Кульбачинский Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Бактериальная РНК-полимераза (РНКП) для узнавания промоторов использует специальную сигма-субъединицу, которая образует специфические контакты с промоторной ДНК. Однако, современные структурные исследования показали, что остаток гуанина в +2 положении промотора (+2G) может образовывать специфические контакты с так называемым CRE-карманом (от англ. core recognition element) бета-субъединицы РНКП. Роль таких контактов в транскрипции остаётся неясной. Цель работы: методами транскрипции in vitro и с помощью экспрессии репортерных конструкций in vivo выявить возможную роль этих контактов на разных стадиях транскрипции. Мы показали, что наличие остатка +2G приводит к стабилизации промоторных комплексов РНКП, а также влияет на синтез коротких РНК-продуктов в процессе abortивной инициации. Мутации остатков РНКП, контактирующих с +2G, снижают стабильность промоторного комплекса и влияют на эффективность ухода РНКП с промотора. Мутации в исследуемом районе также оказывают влияние на скорость элонгации на продолжительность транскрипционных пауз, за счёт нарушения узнавания остатка +1G в сигнале паузы, причем структура синтезируемой РНК способна модулировать узнавание данного остатка при формировании пауз. Кроме того, точечные замены и делеции в CRE-кармане приводят к нарушениям терминирования транскрипции, предположительно, за счёт влияния на формирование паузы в участке терминатора. Таким образом, полученные результаты указывают на важную роль контактов CRE-кармана РНКП с ДНК на всех стадиях транскрипции. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-34-00824.*

ИЗУЧЕНИЕ ВИРУСИНГИБИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ (ПЭ) ПОЛИСТИРОЛСУЛЬФОНАТА И ПОЛИАЛЛИЛАМИНА В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ГРИППА

Н.А. Контаров^{1,2}, А.А. Бахромеева², Н.В. Юнинова³ ¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова; ²НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Изучение механизма вирусингибирующего действия полиэлектролитов (ПЭ) полистиролсульфоната (ПСС) различной степени полимеризации и полиаллиламина (ПАА) с молекулярными массами 6 кДа и 8 кДа в отношении вируса гриппа. Объектом исследования являлся вирус гриппа серотип H5N2. Методом титрования с определением ЦПД в перевиваемой культуре клеток MDCK определяли кинетику снижения инфекционного титра вируса после взаимодействия с ПСС со степенью полимеризации 8 (ПСС – 8), 31, 77, 170, 360, 430 и ПАА с молекулярными массами 6 и 8 кДа. Выявлено достоверное снижение инфекционного титра вируса гриппа после взаимодействия с ПСС со всеми степенями полимеризации и с ПАА с

молекулярными массами 6 кДа и 8 кДа, однако, с нетоксическим действием на клетки, выявленным с помощью МТТ-теста, оказались только ПСС со степенью полимеризации 8 и ПАА (6 кДа) в концентрациях 30 мМ и 30 мкМ, соответственно, которые использовались в дальнейших исследованиях. Анализ спектров кругового дихроизма (КД) и белковой флуоресценции позволил выявить механизм взаимодействия указанных ПЭ с поверхностными белками вируса гриппа, заключающийся в повреждении вторичной структуры вирусных белков гидрофобным полярным остовом данных ПЭ, а также во взаимодействии полианиона ПСС-8 с положительными зарядами белковых групп, что, в свою очередь, приводит к образованию петель и хвостов, разрушающих α -спирали. Также выявлено изменение поверхностного натяжения бислоевой липидной мембраны (БЛМ), сформированной по методу Мюллера в присутствии ПСС-8 и ПАА. Изменение поверхностного натяжения приводит к нарушению адсорбции поверхностных антигенных вирусных белков в БЛМ, в частности, гемагглютинаина. Данный процесс может приводить к нарушению слияния и самосборки вирионов. Исходя из полученных результатов, можно заключить, что используемые в работе ПЭ ПСС-8 и ПАА можно рассматривать как потенциально возможные противовирусные препараты, а методы кругового дихроизма и белковой флуоресценции применять для изучения влияния противовирусных химиопрепаратов на вторичную структуру вирусных белков.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДЕСТАБИЛАЗЫ-ЛИЗОЦИМ С ПРОТЕОЛИПОСОМАМИ РАЗНОГО СОСТАВА

Н.В. Антипова^{1,2}, Т.Д. Петрова², Н.Р. Онищенко², Д.С. Третьякова² ¹Медицинский институт, Российский университет дружбы народов; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Дестабилаза-лизоцим полифункциональный компонент секрета слюнных желез медицинской пиявки *Hirudo medicinalis*, сочетающий в себе изопептидазную (расщепление ϵ -(γ -Glu)-Lys-изопептидных связей) и лизоцимную (гидролиза β -1,4-гликозидных связей пептидогликанов) активности. В ходе работы нами был получен и очищен этот рекомбинантный белок. В связи с тем, что в нативном состоянии секрет слюнных желез содержит 20% жирорастворимой фракции, мы исследовали изменение активности рекомбинантного фермента в составе протеолипосом различного состава и метода получения (инкубирование белка с готовыми липосомами, либо добавление его на стадии гидратации липидной пленки). Фермент в составе липосом отделяли с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-75. За выходом липосом с колонки следили по флуоресценции метчика бислоя BODIPY-PC. Было показано, что наиболее благоприятным составом липосом для увеличения активностей (как изопептидазной, так и лизоцимной) рекомбинантной дестабилазы-лизоцима является смесь липидов яФХ и ФИ. Антимикробная и изопептидазная активности липосомальных фракций рекомбинантного фермента в случае липосом из яичного фосфатидилхолина (яФХ) и 10 мол.% анионного липида фосфатидилинозита (ФИ) из *S. cerevisiae* (69444, 4 Е/мг – лизоцимная активность нефелометрически определенная по просветлению суспензии клеточных стенок бактерии *M. lysodeikticus*) значительно выше активности исходного рекомбинантного препарата (2000 Е/мг). Однако механизм встраивания белка в липосомы и его пространственное положение в них остаются невыясненными, так как фермент устойчив к трипсинолизу. Возможно, взаимодействие положительно заряженных аминокислотных остатков С-концевого фрагмента фермента с поверхностью анионных липосом дополнительно стабилизирует мономеры дестабилазы-лизоцима. Таким образом, фермент экспонирован на поверхности липосом, что доказано увеличением его активности. Дестабилаза – лизоцим в составе липосом может быть рассмотрена как лекарственная форма широкого спектра действия.

ОСОБЕННОСТИ МИКРОБНЫХ ОКСИДАЗ L-АМИНОКИСЛОТ

Е.В. Лукашева¹, А.Ю. Аринбасарова², А.Г. Меденцев² ¹Российский университет дружбы народов, Москва; ²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино, Россия

ЛААО широко представлены в природе: они обнаружены у многих видов змей, насекомых, некоторых видов бактерий, водорослей, моллюсков и рыб. У млекопитающих ЛААО выделены из печени, почек, мозга, секрета молочных желез (у мышей), из полиморфноядерных лейкоцитов. До недавнего времени основным источником получения этих ферментов был дорогостоящий змеиный яд. Активный поиск надежных и дешевых источников оксидаз L-аминокислот привел к обнаружению продуцентов этих ферментов среди бактерий и грибов. В зависимости от источника ЛААО различаются по своим физико-химическим и биохимическим признакам, включая особенности регуляции их биосинтеза штаммом-продуцентом. Физиологические аспекты биосинтеза ЛААО практически не изучены. При исследовании биосинтеза одной из ЛААО – L-лизин- α -оксидазы (ЛО) грибом *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai BKM-4268D мы показали, что в определенных условиях происходит индукция синтеза внеклеточных ЛО и протеолитических ферментов. Освобождающийся в результате действия протеаз L-лизин окисляется с образованием H_2O_2 , которая накапливается в среде культивирования, что обеспечивает адаптивное преимущество грибу-продуценту в его конкуренции с другими организмами. Охарактеризованы свойства фермента: ферментативные, антимикробные и противоопухолевые. Кроме высокой активности и узкой субстратной специфичности для фермента характерны высокая стабильность при хранении и повышенных температурах, а также устойчивость к действию протеаз и детергентов.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ХОЛЕСТЕРОЛА С БЕЛКОМ StAR С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ АНАЛОГОВ ХОЛЕСТЕРОЛА С РАЗЛИЧНЫМ ПОЛОЖЕНИЕМ NBD-ГРУППЫ

К.В. Тугаева^{1,2}, О.А. Завадская³, Я.В. Фалетров³, Е.Г. Максимов⁴, Н.Н. Случанко¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия; ²Кафедра биохимии, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; ³НИИ физико-химических проблем, Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь; ⁴Кафедра биофизики, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Стероидогенный регуляторный белок (StAR) отвечает за доставку в митохондрии молекул холестерина, с чего начинается синтез практически всех стероидных гормонов в клетках надпочечников и половых желез. Несмотря на живой интерес к данному белку, точный механизм его функционирования не понятен до сих пор. Структура молекулы StAR такова, что полость для связывания холестерина идеально соответствует объему молекулы холестерина, однако нет четкого представления, каким образом холестерин попадает в полость, окруженную белком, и каков механизм его переноса к внутренней мембране митохондрии. В настоящее время в исследованиях белка StAR широко используют коммерчески доступный флуоресцент-

ный аналог холестерина 22NC, имеющий флуоресцентную 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl (NBD)-группу при 22 атоме углерода. Однако оставалось неясным, оптимален ли такой аналог, и как положение NBD-группы влияет на связывание с белком. В данной работе мы изучили взаимодействие рекомбинантного белка StAR, полученного по методике, разработанной в нашей лаборатории, с флуоресцентными аналогами холестерина с различным положением NBD-группы: при 20м (стереоизомеры 20NP α и 20NP β), 22м (22NC), 25м атоме углерода (25NC), и вместо -ОН группы при 3м атоме углерода (3NC). При попадании в гидрофобное окружение квантовый выход флуоресценции NBD-группы увеличивается, поэтому за способностью лигандов связываться с белком StAR следили по изменению интенсивности флуоресценции. Было показано, что отклик флуоресценции уменьшается в ряду 20NP β >22NC>20NP α >25NC. При добавлении лиганда 3NC изменений сигнала не наблюдалось, что говорит о важной роли 3-ОН группы во взаимодействии с белком StAR. Эти выводы согласовались с результатами молекулярного встраивания лигандов *in silico* с помощью пакета программ AutoDock. Таким образом, было показано, что новый лиганд 20NP β является наиболее оптимальным для исследования взаимодействий холестерина с белком StAR. Взаимодействие StAR/20NP β происходило со стехиометрией близкой к 1:1 и кажущейся Кд около 3 нМ, при этом время жизни и релаксации анизотропии флуоресценции 20NP β существенно увеличивались, а также возрастала термостабильность StAR. Комплекс StAR/20NP β представляется перспективным для дальнейших структурных исследований. *Работа поддержана грантом РФФИ 14-04-00146а.*

ИСПЫТАНИЕ АНТИАГРЕГАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ ШАПЕРОНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-СИСТЕМ, ОСНОВАННЫХ НА АГРЕГАЦИИ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА

В.А. Борзова¹, К.А. Маркосян¹, С.Ю. Клейменов², Б.И. Курганов¹ ¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Изучение механизмов подавления агрегации ненативных форм белков, образующихся при сворачивании вновь синтезированных полипептидных цепей или при воздействии стресс-факторов различной природы, является одной из важнейших задач современной биохимии. Низкомолекулярные соединения (сахара, полиамины и аминокислоты), способные неспецифически предотвращать агрегацию белков, стабилизировать их структуру и облегчать рефолдинг получили название «химических шаперонов». В настоящей работе предложены новые тест-системы, которые основаны на агрегации бычьего сывороточного альбумина (БСА) и могут быть использованы для скрининга агентов, проявляющих антиагрегационную активность. Показано, что дитиотреитол-индуцированная агрегация БСА при 45°C протекает в кинетическом режиме, при котором скорость-лимитирующей стадией является стадия разворачивания белковой молекулы. Тест-системы подобного типа могут использоваться для скрининга агентов, оказывающих влияние на скорость агрегации в результате воздействия на стабильность исходной, нативной формы белка-мишени. При изучении кинетики тепловой агрегации БСА при 70°C установлено, что скорость-лимитирующей стадией является агрегация развернутых молекул белка. Тест-системы такого типа могут применяться для скрининга агентов, действующих непосредственно на стадию агрегации. Для изучения кинетики агрегации БСА использовали методы динамического светорассеяния и фракционирования в поле асимметричного потока. Стабильность БСА контролировали с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии. С использованием тест-систем двух типов охарактеризована антиагрегационная активность аргинина и его производных, полиаминов (спермидина и путресцина), оксипропил-бета-циклодекстрина и трегалозы. *Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты 16-34-00997-мол_а и 14-04-01530-а).*

ОТВЕТ МЕЗЕНХИМНЫХ СТОЛОВЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА НА АНТИОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

О.Г. Люблинская, И.С. Смирнова, Н.А. Пуговкина, Ю.С. Корниенко, В.В. Зенин, Н.Н. Никольский

Институт цитологии РАН; Санкт-Петербургский политехнический университет им. Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

В настоящее время общепризнано, что внутриклеточные активные формы кислорода (АФК) участвуют в регуляции многих протекающих в клетке процессов: апоптоза, дифференцировки, митотического цикла и т.д. Настоящая работа определяет понятие антиокислительного стресса – состояния, при котором понижение физиологически обусловленного уровня внутриклеточных АФК приводит к нарушению системного сигналинга и регуляции жизненно-важных процессов в клетке. В качестве примера в работе рассматривается реакция мезенхимных стловых клеток эндометрия человека (МСКЭ) на обработку субцитотоксическими дозами антиоксидантов (АО): НАС (5–20мМ), ресвератрол (5–40мкМ), темпол (1–5мМ), DPI (0,5–2мкМ), апонинин (1–4мМ). Обработка АО проводилась на разных стадиях клеточного цикла синхронизированных по циклу клеток. Несмотря на разную направленность действия и разное происхождение (синтетическое или природное), все использованные в работе АО вызывали схожий клеточный ответ, специфичный для разных фаз клеточного цикла МСКЭ. Установлено, что обработка АО клеток, находящихся на стадии G0/G1 клеточного цикла, препятствует инициации синтеза ДНК, блокируя клетки в поздней G1 фазе цикла, однако не приводит к генотоксическим эффектам. Напротив, обработка АО клеточных культур, находящихся на стадии синтеза ДНК, приводит к дозо-зависимому образованию разрывов ДНК, к замедлению фазы синтеза и последующему блокированию клеток в фазе G2/M. Выполненный в работе молекулярный анализ свидетельствует о нарушении регуляции клеточного цикла под действием субцитотоксических доз АО и позволяет предположить, что наблюдаемые эффекты связаны с разрегулировкой АФК-зависимого процесса убиквитинирования и деградации циклинов – белков, ключевых регуляторов клеточного цикла, что приводит к ре-дупликации ДНК и генотоксическому стрессу пролиферирующих клеток. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №14-50-00068.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА POR1 У ДРОЖЖЕЙ YARROWIA LIPOLYTICA

В.Ю. Секова, Е.П. Исакова, Д.И. Дергачева, Ю.И. Дерябина ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Полиэкстремофильный вид дрожжей *Yarrowia lipolytica* нашел широкое применение в различных областях биотехнологии благодаря таким уникальным особенностям как способность к утилизации широкого спектра субстратов, устойчивость к экстремальным pH (от 3,0 до 10,5) и галотолерантность. Эти свойства сделали *Y. lipolytica* перспективным продуцентом для производства рекомбинантного белка, позволяющим, по сравнению с прокариотическими штаммами, производить более сложные белковые молекулы, близкие к белкам высших эукариот. Однако, крайне важной характеристикой штамма-

продуцента для производства рекомбинантного белка является наличие генов, экспрессия которых происходит в строго контролируемых условиях, в связи с чем в настоящее время существует необходимость поиска в геноме *Y. lipolytica* новых эффективных индуцибельных промоторов. Анализ протеома клеток *Y. lipolytica*, выращенных в кислых (pH 4.0), оптимальных (pH 5.5) и щелочных (pH 9.0) условиях показал, что при pH 9.0 значительно возрастает активность митохондриального порина VDAC – наиболее массового белка внешней мембраны митохондрий, обеспечивающего трансмембранный транспорт метаболитов. Предполагается, что именно этот белок обеспечивает выход активных форм кислорода из митохондрий, защищая клетку от окислительного стресса, поэтому экспрессия гена POR1, кодирующего VDAC, должна усиливаться в стрессовых условиях. Мы использовали промотор гена POR1 для создания новых экспрессионных систем на основе *Y. lipolytica*. Была создана генетическая конструкция на основе штамма *Y. lipolytica* W29, несущая в себе репортёрный ген β -галактозидазы, контролируемый промотором POR1. Активность β -галактозидазы оценивалась у культур клеток, выращенных при различных значениях pH, а также подвергнутых экспозиции с экзогенными оксидантами – перекисью водорода, менадином и метилиологеном. Было показано, что при обработке клеток оксидантами активность β -галактозидазы возрастала в 1,5–2,5 раза, достигая максимальных значений у клеток, выращенных при pH 9.0. Таким образом, мы продемонстрировали высокую степень индуцибельности промотора POR1, необходимую для эффективной работы экспрессионной системы на его основе и потенциальную возможность его применения для создания трансформированных линий продуцентов

ЭНДОГЕННЫЙ АНТИОКСИДАНТ АЛЬФА-ЛИПОВАЯ КИСЛОТА УЧАСТВУЕТ В МЕТАБОЛИЗМЕ МЕТАНОЛА И ФОРМАЛЬДЕГИДА У ЧЕЛОВЕКА

А.В. Шиндяпина¹, И.В. Петруня¹, Т.В. Комарова^{1,2}, Ю.Л. Дорохов^{1,2} ¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН;
²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Метанол справедливо считают ядом, поскольку в организме человека детоксицирующие ферменты, включая алкогольдегидрогеназу (АДГ) и альдегиддегидрогеназу (АлДГ) разных классов превращают метанол в муравьиную кислоту с образованием токсичного формальдегида в качестве промежуточного продукта (1). Ранее нами было показано, что метанол синтезируется в организме человека и других млекопитающих бактериями микрофлоры кишечника и влияет на экспрессию генов человека (2, 3). В частности, он регулирует активность кластера генов, участвующих в поддержании концентрации метаболитического формальдегида в тканях человека на низком уровне (3). Сбой системы регуляции метаболизма метанола приводит к повышению содержания формальдегида в мозге и гибели нейронов, что проявляется, например, при болезни Альцгеймера (1). Мы предположили, что одним из путей понижения содержания формальдегида в организме млекопитающих может быть применение активаторов фермента АлДГ2, среди которых альфа-липоевая кислота (АЛК) – известный эндогенный антиоксидант человека. При выяснении механизма действия АЛК мы установили, что АЛК (20 мг/кг) вызывает у мышей повышение содержания мРНК генов ALDH2, CAT и CYP2E1, участвующих в окислении альдегидов, и резкое снижение содержания эндогенного метанола и формальдегида в крови животных. Действие АЛК, по-видимому, не ограничивается повышением активности АлДГ2, и оказывает влияние на весь кластер детоксицирующих генов. Мы предположили, что АЛК, как биологическая добавка, может быть использована не только в качестве природного антиоксиданта, но и как средство поддержания метаболитического метанола и формальдегида на низком уровне. Наши эксперименты на добровольцах подтверждают это предположение. Прием добровольцами АЛК приводит к снижению у них в крови содержания ацетальдегида и формальдегида как продуктов окисления, соответственно, метаболитического этанола и метанола. Таким образом, описанные в литературе благоприятные эффекты АЛК на пациентах, страдающих болезнью Альцгеймера, можно объяснить его действием по снижению содержания формальдегида в мозге. Цитируемая литература: 1. Dorokhov et al., 2015. *Physiol. Rev.* 95(2), 603-644. 2. Dorokhov et al, 2012. *PLoS One* 7(4):e36122. 3. Shindyapina et al., 2014. *PLoS One* 9(7): e102837.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОСТРОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ЭТАНОЛОМ

С.А. Долгарева, А.В. Сорокин, Н.А. Конопля *Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия*

Цель – изучить метаболические нарушения в условиях острой и хронической интоксикации этанолом. Исследования проведены на 90 половозрелых крысах Вистар массой 150–200 г. При острой и хронической алкогольной интоксикации 20% этанол в дозе 3 мл/кг вводили соответственно в течение 5, 30 или 60 дней через 24 часа, внутривенно. При оценке функционального состояния печени индикаторами синдрома цитолиза являлась в сыворотке крови активность аспартат- и аланинаминотрансфераз (АСТ и АЛТ); токсического поражения печени – коэффициенты соотношений ферментов АСТ/АЛТ (де Ритиса) и ГГТ/АСТ; внутриклеточного холестаза – активность щелочной фосфатазы, гаммаглутаминтранспептидазы (ГГТ) и концентрация билирубина; недостаточности синтетических процессов – концентрация фибриногена и протромбиновый индекс. Интенсивность ПОЛ оценивали по содержанию ацилгидроперекисей и малонового диальдегида в плазме крови. Определяли общую антиокислительную активность сыворотки крови. Активность каталазы, супероксиддисмутазы и концентрацию стабильных метаболитов оксида азота определяли в сыворотке и эритроцитах. Функционально-метаболическую активность полиморфно-ядерных лейкоцитов крови оценивали по фагоцитарному показателю, фагоцитарному числу, индексу активности фагоцитоза. Активность кислород-зависимых систем нейтрофилов оценивали по реакции восстановления нитросинего тетразолия, спонтанного и стимулированного зимозаном, с расчетом функционального резерва. Кроме этого, определяли сорбционную способность эритроцитов и сорбционную емкость их гликокаликса. Установлено, что кратковременное и длительное введение этанола экспериментальным животным приводит к метаболическим нарушениям, но если кратковременное поступление этанола изменения носят реактивный характер, то при 30-дневной, в большей степени 60-дневной интоксикации этанолом возникают выраженные нарушения: токсическое поражение печени по воспалительному типу и недостаточности синтетических процессов, «окислительный стресс», дисбаланс функционально-метаболической активности эритроцитов и нейтрофилов периферической крови.

КОРОТКИЕ ОРС В 5' ЛИДЕРНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ МРНК РЕГУЛИРУЮТ ТРАНСЛЯЦИЮ РКМЗ

Н. Баль¹, Д. Сусоров², Е. Алкалаева², П. Колосов¹, П. Балабан¹

¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН; ²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

РКМЗ является одним из ключевых участников синаптической пластичности и формирования памяти. Изначально трансляция белка подавлена, но при нейрональной стимуляции происходит увеличение синтеза белка в постсинапсе. При этом, избирательное блокирование РКМЗ приводит к нарушению долговременной памяти, но не влияет на формирование новых воспоминаний. мРНК РКМЗ имеет протяженный 5'UTR. Внутри 5'UTR есть 7 AUG-кодированных, потенциальных стартов для трансляции коротких ОРС (uORF). В настоящем исследовании мы сравнили влияние uORF и структуры мРНК на синтез белка РКМЗ в различных системах трансляции. Мы показали, что формирование инициаторных рибосомных комплексов на uORF является основным фактором для регуляции трансляции РКМЗ. Если данные uORF мутировали, базовый уровень трансляции репортерного белка значительно увеличивался по сравнению с последовательностью 5'UTR дикого типа. Добавление фактора инициации трансляции ΔeIF4G приводило к повышению эффективности трансляции, вероятно, за счет реинициации на uORF. При мутировании uORF в лидерной последовательности, добавление ΔeIF4G, наоборот, снижало уровень трансляции. Кроме того, мы определили молекулярный механизм трансляционного контроля мРНК РКМЗ. В опытах с культурами клеток, мы показали, что 5'UTR мРНК РКМЗ дикого типа подавляет синтез репортерного белка, но после активации нейронов пикротоксином его трансляция увеличивалась. Добавление арсенита натрия к первичной культуре нейронов гиппокампа крысы также индуцировало активацию трансляции мРНК с 5'-UTR из РКМЗ. В различных типах интегрированного клеточного стресса, включая обработку арсенитом натрия, фосфорилируется фактор инициации трансляции eIF2α, и это приводит к подавлению общей трансляции в клетке. Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что одним из способов трансляционного контроля РКМЗ является фосфорилирование eIF2α. *Работа поддержана грантом РФФИ №14-25-00072.*

ЭФФЕКТ КРЭБТРИ В ШТАММЕ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* С ИНАКТИВИРОВАННОЙ ФОСФОГЛИЦЕРАТМУТАЗОЙ

С.С. Соколов, О.В. Маркова, К.Д. Николаева, Д.А. Кнорре, Ф.Ф. Северин

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Гликолиз и окислительное фосфорилирование – универсальные метаболические пути для снабжения клеток энергией, при этом клетки избегают включать их оба одновременно на полную мощность. Избыток субстратов цикла трикарбоновых кислот, например, ацетил-КоА и цитрата, а также АТФ, осуществляют обратную связь, ингибируя активность фосфофруктокиназы-1, регулируя скорость гликолиза под потребность дыхательной цепи в субстратах. Однако большинство активно пролиферирующих, в том числе раковых, клеток обладает эффектом Крэбтри и эффектом Варбурга, нарушающими такую регуляцию и отдающих предпочтение гликолизу. Есть несколько гипотез объясняющих эффект Крэбтри, но конкретный механизм не известен. В нескольких работах было показано, что в основе его лежит ингибирование дыхания интермедиатом гликолиза фруктозо-1,6-бисфосфатом. Для изучения механизма эффекта Крэбтри мы использовали штамм Δgpm1 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с нарушенным ферментом гликолиза фосfogлицератмутазой. В этом штамме гликолитическая цепь разорвана и клетки Δgpm1 не в состоянии получать энергию за счет гликолиза, однако способны расти на среде, содержащей смесь глицерина и этанола, которые входят в гликолиз “выше” и “ниже” фосfogлицератмутазы. С использованием полярографического метода регистрации клеточного дыхания нами было показано снижение уровня дыхания Δgpm1 *S. cerevisiae* в 1,5 – 1,7 раз после добавления 0,2% глюкозы. Добавление 1% 2-дезоксиглюкозы отменяет данный эффект. Полученные данные свидетельствуют о вовлеченности в эффект Крэбтри интермедиатов гликолиза, а не непосредственно глюкозы. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-14-00181.*

БЕЛКИ Ga13 И LARG КАК РЕГУЛЯТОРЫ RHOA В РАННЕМ РАЗВИТИИ *XENOPUS LAEVIS*

Д.О. Кирюхин¹, Е. Копанцева², Л.А. Шустикова², Н.Н. Лучинская³, А.В. Белявский²

¹Кафедра биохимии им. Т.Т. Березова, Медицинский институт, Российский университет дружбы народов; ²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН; ³Кафедра эмбриологии, Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Малые GTPазы семейства Rho (Rho, Cdc42, Rac) являются важными регуляторами многих процессов, в том числе перестройки актинового цитоскелета, контролируя подвижность и полярность клеток. RhoA активируется белками семейства GEF (LARG, p115Rho-GEF, PDZ-RhoGEF). Эти белки активируются G-белками G12/13. Мы исследовали роль сигнального каскада G13 – LARG – RhoA в движениях радиальной интеркаляции во время ранней гаструлы у *Xenopus laevis*. В это время наблюдаются первые морфогенетические движения, подготавливающие зародыш к гаструляции. Пространственно-временная картина экспрессии исследуемых генов во многом сходна. Чтобы изучить, способен ли LARG активировать RhoA *in vivo*, мы инъектировали мРНК LARG в зиготу *X. laevis* и определяли, как изменяется количество активной формы RhoA на стадии развития 10,5. Инъекции мРНК LARG дозозависимо увеличивают количество активной формы RhoA. При этом происходило и торможение радиальной интеркаляции. Об этом мы могли судить по толщине крыши бластоцеля на стадии ранней гаструлы. Подавление экспрессии LARG с помощью антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов снижало количество активной формы RhoA. Оверэкспрессия Ga13 дозозависимо увеличивала количество активной формы RhoA и тормозила радиальную интеркаляцию. Инъекции мРНК Ga13 совместно с антисмысловыми морфолиновыми олигонуклеотидами к LARG не приводили к активации RhoA, но все же блокировали радиальную интеркаляцию. Это может свидетельствовать о том, что активация RhoA через Ga13 осуществляется с помощью LARG, но не только RhoA ответственный за торможение радиальной интеркаляции. Совместные инъекции мРНК LARG и антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов против Ga13 не препятствовали активации RhoA и блокировали радиальную интеркаляцию. Вероятно, активатором LARG может быть не только Ga13, но и другие белки. Таким образом, наши данные подтверждают участие белков Ga13 и LARG в сигнальном каскаде, регулирующем активацию RhoA во время ранних движений гаструляции у *X. laevis*.

ЭКЗОГЕННЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ ВЛИЯЮТ НА АКТИВНОСТЬ ФЕНОЛОКИСЛЯЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ *LENTINULA EDODES*

В.А. Ильошин, Е.В. Плотников, О.В. Карначук Лаборатория биохимии и молекулярной биологии, кафедра физиологии растений и биотехнологии, Томский государственный университет, Томск, Россия

Lentinula edodes – биотехнологически значимый базидиомицет для пищевой и фармацевтической промышленности. Он относится к экологической группе ксилотрофных грибов и образует фенолоксилирующие ферменты, имеющие широкую субстратную специфичность: лакказы (Lcc, ЕС 1.10.3.2), марганец зависимых пероксидазы (MnP, ЕС 1.11.1.13). Ферменты способны окислять трудно разлагаемые природные соединения, такие как лигнин, а также ксенобиотики фенольной природы. Экспрессия генов вышеперечисленных экстрацеллюлярных ферментов зависит от присутствия химических активаторов: ионов меди, марганца, наличия специфических субстратов, а также источника углерода. Показано, что в зависимости от концентрации в среде глюкозы может происходить апрегуляция генов лакказ. Целью работы было изучить индуцибельный эффект органических соединений, используемых *L. edodes*, в качестве источников углерода и азота на активность Lcc и MnP. Мицелий культивировали на питательной среде (Tsujiyama et al. 2013), в отсутствии света на шейкере при 25°C, длительность культивирования составила 40 суток. В течение роста каждые 3 суток измеряли активность Lcc и MnP. Измеряли активность экстрацеллюлярных лакказ и пероксидаз в присутствии следующих источников углерода: глюкозы, лактозы, целлюлозы, бензойной и пальмитиновой кислот, во всех опытах источником азота был NO₃⁻. Добавление пальмитиновой кислоты приводило к появлению активности MnP, которая на средах с другими источниками углерода не обнаружена. Lcc не были обнаружены ни в одном из вариантов опыта. В качестве источников азота в эксперименте использовали пептон, глутаминовую кислоту, тирозин, цистеин и NO₃⁻, источником углерода была глюкоза. Максимальную активность Lcc зафиксировали на среде с пептоном (36.0 нмоль/(мл*мин) на 32-е сутки), глутаминовая кислота также стимулировала образование Lcc (5.0 нмоль/(мл*мин) на 32-е сутки). На средах с пептоном и тирозином обнаружили MnP 5.0 и 7.0 нмоль/(мл*мин) соответственно. Таким образом, активность Lcc зависит от наличия в среде органических форм азота (пептон, глутаминовая кислота). Активность MnP связана с добавлением пальмитиновой кислоты, а также тирозином. Исследование поддержано грантом РФФИ (соглашение № 16-04-01619/16 от 19.02.2016 г.).

РОЛЬ АДАМАЛИЗИНОПОДОБНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ *B. PUMILUS* В РЕГУЛЯЦИИ АЗОТНОГО ОБМЕНА В КЛЕТКЕ

Н.Л. Рудакова, А.Р. Сабирова, Н.П. Балабан, А.О. Тихонова, М.Р. Шарипова

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Минорная секретируемая металлопротеиназа *B. pumilus* 3-19 *mprBp* классифицирована как адамализиноподобная металлопротеиназа клана метцинкинов и является первым прокариотическим гомологом семейства эукариотических адамализинов. Функциональная роль фермента в клетках бацилл не ясна. Анализ регуляторной области гена *mprBp* показал наличие 6 участков с гомологией к консенсусной последовательности для связи с фактором транскрипции TtgA, контролирующим азотный обмен в условиях недостатка азота.

Экспрессию гена *mprBp* изучали при росте на минимальных синтетических средах (SMM) с использованием в качестве единственного источника азота NH₄Cl (контроль) или NaNO₃ (опыт). Для выяснения механизмов азотной регуляции экспрессии *mprBp* были использованы штаммы с нокаутированными генами белков азотного обмена. Исследовали экспрессию гена *mprBp* в штамме *B. subtilis* Δ*tnrA*-LCC(-), дефектному по фактору транскрипции TtgA. В качестве контрольного был использован штамм *B. subtilis* Δ*tnrA*-LCC(+) с полноценным геном TtgA. В условиях азотного голодания на SMM с добавлением NaNO₃ отсутствие полноценного белка TtgA в рекомбинантных клетках приводило к снижению экспрессии гена *mprBp*.

Изучение экспрессии *mprBp* в штаммах с мутациями по генам белков транспорта аммония AmtB и GlnK показало, что уровень продуктивности культуры на среде с NaNO₃ на 40% и 50% ниже уровня продуктивности на среде с добавлением NH₄Cl, соответственно. Ненокаутированные штаммы на обеих средах показали уровень продукции фермента сопоставимый с таковым для мутантов на среде с NH₄Cl. Показано, что в ответ на недоступность легкоутилизируемых источников азота в клетках бактерий активируется экспрессия гена металлоэндопептидазы, которая регуляторно взаимосвязана с экспрессией генов *amtB* и *glnK*, продукты которых формируют аппарат транспорта ионов аммония через цитоплазматическую мембрану.

Работа поддержана средствами гранта РФФИ 16-34-01150 мол_а.

СУБСТРАТЫ ОКИСЛЕНИЯ ЯНТАРНАЯ И α-КЕТОГЛУТАРОВАЯ КИСЛОТЫ ЯВЛЯЮТСЯ СИНЕРГИСТАМИ ГОРМОНОВ АДРЕНАЛИНА И АЦЕТИЛХОЛИНА В СИСТЕМЕ СИМПАТИЧЕСКОЙ И ПАРАСИМПАТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА

М.Н. Кондрашова¹, М.В. Захарченко¹, Н.В. Хундерякова¹, А.В. Ковзан², Т.В. Ячкула¹, Е.Г. Литвинова¹, П.М. Шварцбург¹,

Н.И. Федотчева¹ ¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино; ²Сибирский федеральный университет, Новосибирск, Россия

Цитобиохимическим авторским методом, сохраняющим нативную структуру клетки, исследована регуляция метаболизма субстратами – янтарной и α-кетоглутаровой кислотами (ЯНТ, КГЛ) и ее связь с регуляцией гормонами – адреналином и ацетилхолином (АДР, АЦХ) [1]. Исследования проведены на мазке крови в лимфоцитах крыс и кроликов при возбуждении организма. Определяли активность дегидрогеназ ЯНТ и КГЛ – сукцинатдегидрогеназу и α-кетоглутаратдегидрогеназу (СДГ, КДГ) по окрашиванию митохондрий нитросиним тетразолием, а также состояние хроматина по его окрашиванию нейтральным красным [2]. При усилении адренэргической (АЭ) регуляции (психэмоциональный стресс) отчетливо выявляется сильная – в 2-3 раза и более – стимуляция активности СДГ. То же характерно для больных гипертонией – патологии, обусловленной гиперактивацией АЭ регуляции. Показана связь активности КДГ и холинэргической (ХЭ) регуляции в организме. При сохранении структуры клетки активность очень низка у мышей и крыс, у которых преобладает АЭ регуляция. У кроликов, животных с более сильной ХЭ регуляцией активность КДГ выше, что ближе к человеку. При начальном мягком воздействии возбуждающих факторов активность КДГ нарастает, предупреждая гиперактивацию СДГ. При более сильном воздействии КДГ ингибируется, а СДГ гиперактивируется, что указывает на переход состояния к патологии. При добавлении ЯНТ и КГЛ для определения активности СДГ и КДГ наблюдаются противоположные изменения вида клеток и окраски

ядра. Оно больше по площади и диффузно окрашено при добавлении КГЛ и более сжато и ярче окрашено при добавлении ЯНТ. Диффузная окраска соответствует эухроматину и усилению биосинтетических процессов. Все приведенное показывает, что исследованные два субстрата оказывают специфическое противоположное действие синергично АДР и АЦХ и являются частью субстратно-гормональной системы, состоящей из двух реципрокных половин – симпатической и парасимпатической. 1. М.Н. Кондрашова. *Вопр. биол., мед. и фарм. химии*. 2002, т. 1, 7–12. 2. M.V. Zakharchenko et al. *IJBCB* 2013, v. 45(1), 190–200.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИС-РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ОПЕРОНА ДЕГРАДАЦИИ САЛИЦИЛАТА *sgpAIKGNB*

И.Ю. Филатова, М.В. Захарова *Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, Россия*

Штамм *Pseudomonas putida* AK5 – первый описанный природный штамм, в котором присутствуют как «классические» *nah1*-оперон и ген *nahR* (деградация нафталина до ЦТК через образование салицилата и катехола), так и гены, продукты которых отвечают за менее охарактеризованный путь деградации салицилата через гентизат (*sgp*-оперон, *salicylate-gentisate pathway*). Белок *SgpR* (*LysR*-семейство, *LTTR*) контролирует экспрессию *sgp*-оперона. В присутствии салицилата эффективность транскрипции оперона *sgpAIKGNB* увеличивается на три порядка, что на данный момент является самым высоким показателем для регуляторов *LysR*-семейства. Большая часть генов, контролируемых *LTTR* способны к экспрессии и в норме регулируются в клетках *E. coli*, несмотря на то, что уровень экспрессии в 10–20 раз ниже [M. Schell, 1983]. В данной работе охарактеризовали *in vitro* взаимодействие РНКП *E. coli* и *P. putida* с промоторным регионом *sgp*-оперона, картировали цис-регуляторные участки *sgp*-оперона с использованием репортерных *fusion*-конструкций. Методом транскрипции *run-off* обнаружено два транскрипта *sgp*-оперона. +1 сайт *sgp1*-транскрипта расположен в районе реальной точки начала транскрипции (определенной ранее методом 5' RACE-PCR в присутствии индуктора), +1 сайт *sgp2*-транскрипта расположен, предположительно, в позиции +20 п.н. относительно +1 сайта индуцируемого *sgp1*-транскрипта. С использованием штамма *E. coli* Z85, вектора *pQE30/sgpR* и химерных конструкций на основе плазмиды *p184*, содержащих репортерный ген *lacZ*, произвели картирование промоторной области *sgp*-оперона. Уровень экспрессии β-галактозидазы в конструкции *p184/-85+58* (содержащей полноразмерный фрагмент промоторной области) в присутствии салицилата сравним с уровнем экспрессии в беспромоторном векторе *p184* (отрицательный контроль). В присутствии салицилата отмечено увеличение активности *LacZ* в ~ 5 раз. В конструкции *p184/-21+58* (содержащей усеченную -35 область *Psgp*) наблюдается появление слабой (~ 2 раза выше отрицательного контроля) конститутивной экспрессии гена *lacZ*. Наличие второго, конститутивного, промотора, для оперонов, контролируемых белками *LTTRs*, показано впервые, а значит, *sgp*-оперон может стать перспективной моделью для исследования новых деталей механизма регуляции белками *LysR*-семейства.

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА ОБУСЛАВЛИВАЕТ ЕГО УБИКВИТИН-НЕЗАВИСИМЫЙ ГИДРОЛИЗ ПРОТЕАСОМЫ

А.А. Кудряева, А.А. Белогуров *Институт биохимической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

Основной белок миелина (МВР) – один из главных белковых компонентов миелиновой оболочки аксонов нейронов в центральной и периферической нервной системе. Известно, что данный белок является одним из основных аутоантигенов при рассеянном склерозе – системном аутоиммунном демиелинизирующем заболевании центральной нервной системы человека, характеризующемся множественными повреждениями белого вещества. В процессе метаболизма внутриклеточный протеолиз МВР может происходить под действием различных протеаз, а также протеасомы. Абсолютное большинство белков разрушается протеасомой по убиквитин-зависимому пути. Показано, что в ряде случаев возможна и убиквитин-независимая деградация. При этом маркером для протеолиза может служить или некая вспомогательная молекула или последовательность внутри самого белка. Ранее в лаборатории биокатализа было показано, что 20S протеасома, связанная с регуляторным комплексом, способна гидролизовать неубиквитинилированный МВР. Вероятнее всего взаимодействие с данным комплексом обусловлено высоким положительным зарядом МВР (изоэлектрическая точка более 11). Для объяснения механизма убиквитин-независимого гидролиза МВР был предложен ряд гипотез, в том числе идея о наличии в структуре МВР дегрона – последовательности, благодаря которой белок распознается и протеолизуется полноразмерной протеасомой. Был изучен внутриклеточный гидролиз различных делеционных форм МВР, а также слитных белков МВР с модельными субстратами. Мы обнаружили, что МВР не содержит дискретной последовательности – классического дегрона, удаление которого приводило бы к замедлению гидролиза протеасомой. Интересно, что для деградации данного белка важен скорее состав аминокислотной последовательности, чем их взаимное расположение. На основе аминокислотной последовательности МВР был создан искусственный дегрон, эффективно способствующий гидролизу модельных субстратов протеасомой. Таким образом, мы обнаружили, что МВР обладает уникальным “композиционным дегроном”, равномерно распределенным по его последовательности. Работа была поддержана проектами РФФИ № 16-34-01045 и РНФ № 14-14-00585.

ПОИСК РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ГЕНОВ СИСТЕМЫ РЕСТРИКЦИИ-МОДИФИКАЦИИ II ТИПА Cfr9I

О.А. Казанцева, М.О. Нагорных, М.В. Захарова

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, Россия

Система рестрикции-модификации (СРМ) – ферментативная система бактерий, основной функцией которой является защита бактериальной клетки от чужеродного генетического материала. СРМ состоят из двух генов, кодирующих два фермента: эндонуклеазу рестрикции (ER) и метилтрансферазу (М). В основном экспрессия генов СРМ регулируется на транскрипционном уровне с помощью С-белков. Однако в СРМ типа II Cfr9I не было обнаружено регуляторов транскрипции, типичных для СРМ типа II. Исследование СРМ типа II Cfr9I позволит выявить новые механизмы регуляции экспрессии генов в системах защиты бактерий от проникновения бактериофагов. СРМ типа II Cfr9I – это линейно-ориентированный оперон, состоящий из двух конвергентно расположенных генов. Стартовый кодон мРНК гена *res* и стоп-кодон мРНК гена *met* перекрываются. В Cfr9I обнаружено и охарактеризовано два промотора. С промотора *metP* транскрибируется бицистронная мРНК, кодирующая оба фермента системы. Промотор *resP* локализован перед *res* в структурной части *met*, с него синтезируется моноцистронная мРНК, кодирующая ER. Мы провели сравнительный анализ промоторов *in vitro* и *in vivo*, который по-

казал, что metP сильнее resP в 4 раза. resP, по-видимому, обеспечивает базальный уровень ER в момент становления СРМ в генетическом окружении нового хозяина. Ранее в Cfr9I биоинформатически в районе последовательности Шайн-Дальгарно гена res был обнаружен повтор, кодирующий устойчивую вторичную структуру мРНК (шпильку). Нами был проведен сравнительный анализ активности репортерного гена lacZ трансляционно слитого с фрагментами ДНК Cfr9I. Отмечено, что делеция ДНК последовательности, кодирующей шпильку в мРНК, приводит к увеличению экспрессии гена lacZ в 4 раза. Методом обратной транскрипции и qPCR выявлено, что наличие шпильки в мРНК значительно снижает уровень транскрипции с resP. Вероятно, это происходит из-за преждевременной деградации мРНК за счет ареста трансляции. С помощью приложения RNAfold выявили что, оба важных элемента инициации трансляции – область Шайн-Дальгарно и стартовый кодон мРНК res попадают в структуру шпильки. Предполагается, что это является ключевым фактором негативной регуляции res в СРМ Cfr9I.

МЕТИЛИРОВАННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ПОЛИАМИНОВ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ СДВИГА РАМКИ СЧИТЫВАНИЯ В мРНК АНТИЗИМА В ДРОЖЖАХ

Д.С. Карпов, М.А. Хомутов, А.Р. Хомутов, С.Н. Кочетков

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Спермин и спермидин представляют собой жизненно необходимые поликатионы. Они эффективно взаимодействуют с биополимерами ДНК, РНК, белками и обеспечивают высокоточную работу систем транскрипции и трансляции. Внутриклеточное содержание полиаминов определяется и требует сбалансированной работы ферментов их биосинтеза и катаболизма, и контролируется по принципу отрицательной обратной связи. Пиридоксаль-5'-фосфат зависимая орнитиндекарбоксилаза (ODC) катализирует скорость-лимитирующую стадию биосинтеза полиаминов. Содержание этого короткоживущего фермента в клетке контролируется в том числе и скоростью его деградации в 26S протеасоме, что напрямую зависит от уровня небольшого (~30 кДа) короткоживущего и высококомплементарного к ODC белка антизима (AZ). Фермент доставляется к протеасоме в комплексе ODC:AZ, после чего ODC расщепляется в протеасоме. Биосинтез AZ зависит от внутриклеточного содержания полиаминов, поскольку для образования активной формы белка, имеющей высокое сродство к ODC, необходим +1 сдвиг рамки считывания при трансляции мРНК AZ. Точные молекулярные механизмы полиамин-зависимой индукции +1 сдвига рамки считывания не известны. В настоящей работе на примере дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* исследовано влияние S-метилированных аналогов спермина и спермидина на эффективность сдвига рамки считывания и обсуждается ее зависимость от строения аналогов полиаминов. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта 14-04-01099 Российского научного фонда.

ВЛИЯНИЕ СУБЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ДОЗ АНТИОКСИДАНТОВ НА ДИНАМИКУ ПРОЛИФЕРАЦИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА

Ю.С. Корниенко, О.Г. Люблинская, И.С. Смирнова, Н.А. Пуговкина, В.В. Зенин, Н.Н. Никольский

¹Институт цитологии РАН; ²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Известно, что повышенный уровень внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) может приводить к преждевременному старению и клеточной гибели, в связи с чем воздействие антиоксидантов на различные типы клеток, и на весь организм в целом, оценивается в большинстве научных трудов как исключительно благотворное. Тем не менее, недавно было обнаружено, что антиоксиданты способны вызывать гибель опухолевых клеток. Однако, влияние высоких доз антиоксидантов на другие пролиферирующие клетки, в частности ткане-специфические стволовые клетки, являющиеся источником репарации и обновления тканей взрослого организма, до сих пор остается мало изученным. В настоящей работе проанализирован ответ мезенхимных стволовых клеток эндометрия человека (МСКэ) на обработку субцитотоксическими дозами антиоксидантов. В экспериментах с синхронизированными по фазам клеточного цикла культурами МСКэ субцитотоксические дозы антиоксидантов (темпол, ресвератрол, DPI, апоцинин) добавлялись на стадии ранней фазы синтеза ДНК, и динамика клеточного цикла МСКэ анализировалась в течение последующих двух суток. Установлено, что добавление антиоксидантов приводит к замедлению фазы синтеза ДНК и последующему блоку клеточного цикла в G2/M-фазе. Обнаружено, что блок пролиферации вызван повышением уровня разрывов ДНК, маркированных фокусами гистона gamma-H2AX и фокусами фосфорилирования АТМ-киназы (ataxia telangiectasia mutated kinase). Молекулярный анализ уровня белков, ключевых регуляторов клеточного цикла, выявил пониженный уровень циклина A в клетках, обработанных антиоксидантами. Таким образом, в работе показано, что обработка культур МСКэ субцитотоксическими дозами антиоксидантов нарушает регуляцию клеточного цикла и оказывает стрессовое воздействие на пролиферирующие культуры МСКэ, блокируя клеточную пролиферацию и вызывая повреждения ДНК. Обсуждаются возможные молекулярные механизмы наблюдаемых явлений. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №14-50-00068.

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА В КУЛЬТУРАХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТОЛОВЫХ КЛЕТОК И ИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ПОТОМКОВ

Ю.С. Иванова, О.Г. Люблинская, И.С. Смирнова, Н.А. Пуговкина, И.В. Кожухарова, З.В. Ковалева, В.В. Зенин, Н.Н. Никольский

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; ²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

В последнее время появилось много данных о том, что внутриклеточные активные формы кислорода (АФК) участвуют в регуляции жизненно-важных клеточных процессов, таких, например, как клеточная пролиферация. В этой связи особую актуальность приобретает вопрос о влиянии АФК на динамику процесса самообновления стволовых клеток, пролиферация которых является источником формирования и обновления тканей человеческого организма. Тем не менее, влияние АФК на клеточный цикл эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) пока мало изучено. Согласно литературным данным, ЭСК обладают метаболическими характеристиками, соответствующими их исходной локализации внутри бластоцисты в полости матки, где эти клетки подвержены условиям гипоксии. ЭСК имеют небольшое количество митохондрий с достаточно незрелой морфологией, а, следовательно, уровень АФК в таких клетках невелик, по сравнению с их дифференцированными потомками.

ми. В связи с этим, можно ожидать существенных отличий в АФК-зависимой регуляции клеточного цикла ЭСК и дифференцированных клеток. Цель настоящего исследования – сравнить уровень АФК в ЭСК и их дифференцированных потомках, а также изучить взаимосвязь между уровнем АФК и динамикой клеточного цикла обоих типов клеток. Сравнение уровня АФК в ЭСК и их фибробласто-подобных потомках показало, что низкие уровни АФК, характерные для культур ЭСК, измеряемые с использованием АФК-чувствительных флуоресцентных зондов, объясняются, преимущественно, малым размером этих клеток. Нормировка на клеточный белок привела к выравниванию значений, характерных для ЭСК и дифференцированных клеток. Направленное понижение уровня АФК с помощью антиоксидантов приводило к блокированию клеточной пролиферации обоих типов клеток, однако арест клеточного цикла носил существенно разный характер и наблюдался в разных фазах цикла. Наблюдаемые эффекты объясняются спецификой АФК-зависимой регуляции клеточного цикла ЭСК и их дифференцированных потомков. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №14-50-00068.*

УЧАСТИЕ ТИОРЕДОКСИНА В ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК ЛИНИИ HBL-100 ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Е.В. Шахристова, Е.А. Степовая, Р.И. Чильчигашев, О.Л. Носарева

Сибирский государственный медицинский университет МЗ РФ, Томск, Россия

Тиоредоксин – полифункциональный редокс-белок, способен восстанавливать пероксид водорода и окисленный глутатион, выступает в качестве кофактора ряда ферментов, регулирует активность многих транскрипционных факторов, способствует сохранению фолдинга белков и защите от окислительного стресса (ОС). Моделирование ОС, сопровождающего различные социально-значимые патологии, может быть использовано для установления роли редокс-белков в регуляции пролиферации клеток эпителия молочной железы. Цель исследования: оценить участие тиоредоксина в распределении клеток HBL-100 по фазам клеточного цикла при индуцированном ОС. Эксперименты выполнены на клетках эпителия молочной железы человека (HBL-100). Развитие ОС, индуцированного H_2O_2 (0,3 мМ), в клетках HBL-100 оценивали по содержанию активных форм кислорода (АФК) и величине отношения восстановленного глутатиона к окисленному, отражающей редокс-статус клеток. В интактных клетках и при действии H_2O_2 оценивали концентрацию тиоредоксина и распределение клеток по фазам клеточного цикла. Нами было установлено, что H_2O_2 вызывает развитие ОС в клетках HBL-100, сопровождающегося увеличением в 2,8 раза ($p < 0,01$) концентрации АФК и снижением в 1,7 раза ($p < 0,01$) редокс-статуса по сравнению с интактной культурой. На фоне индукции ОС в клетках HBL-100 выявлено увеличение в 1,1 раза ($p < 0,01$) содержания тиоредоксина по сравнению с интактными, что может быть связано с повышением его экспрессии. Развитие ОС под действием H_2O_2 в клетках HBL-100 приводило к увеличению в 1,2 раза ($p < 0,01$) количества клеток, находящихся в S фазе клеточного цикла, по сравнению с интактной культурой. В тоже время количество клеток HBL-100 G2/M фазах клеточного цикла снижалось в 1,5 раза ($p < 0,01$) по сравнению с интактными клетками. Тиоредоксин, участвуя в поддержании редокс-статуса и являясь редокс-регулятором клеточного сигналинга, может являться молекулярной мишенью для фармакологической коррекции заболеваний, сопровождающихся ОС. Полученные данные позволят использовать предложенную модель для установления молекулярных механизмов нарушений пролиферации клеток в условиях свободнорадикального окисления при социально-значимых патологиях различного генеза. *Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского гуманитарного научного фонда проект № 15-36-01289.*

СВОЙСТВА И ПРЕИМУЩЕСТВА СОЛЕЙ ТЕТРАЗОЛИЯ КАК АКЦЕПТОРОВ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ АКТИВНОСТИ РЕДОКС-ЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ В ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЯХ, ТКАНЯХ И ЛЕЙКОЦИТАХ

Н.И. Федотчева¹, Е.Г. Литвинова¹, М.В. Захарченко¹, Н.В. Хундерякова¹, Р.С. Фадеев¹, В.В. Теплова¹, Т.А. Федотчева², Н.В. Белобородова³, М.Н. Кондрашова¹

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино Московской области; ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва; ³НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского, Москва, Россия

Соли тетразолия используются для измерения метаболической активности клеток, активности окислительных ферментов, продукции супероксида. Нитросиний тетразолий (НСТ) и метилтиазолитетразолий (МТТ), в отличие от других тетразолиев не требуют дополнительного переносчика электронов и восстанавливаются при взаимодействии непосредственно с восстановленными редокс-сайтами объекта, образуя диформазан и моноформазан, соответственно. При непродолжительных временах инкубации восстановленные акцепторы ведут себя как псевдорастоворы, что позволяет измерять их оптическую плотность в процессе инкубации. Данные о субстратной специфичности реакций восстановления тетразолиев и их чувствительности к ингибиторам дыхательной цепи немногочисленны и противоречивы. В данной работе изучена субстратная специфичность реакций восстановления НСТ и МТТ в изолированных митохондриях, тканевых гомогенатах и суспензии лейкоцитов. Выявлена зависимость восстановления этих акцепторов от субстрата окисления: НСТ активнее восстанавливался при окислении сукцината, МТТ – при окислении NAD-зависимых субстратов. Обнаружено, что восстановление обоих акцепторов более чувствительно к ингибиторам дегидрогеназ, чем к ингибиторам дыхательной цепи. Показано, что измерение оптической плотности восстановленных НСТ и МТТ является высокочувствительным методом определения метаболической активности митохондрий, и, при наличии селективных ингибиторов, позволяет оценивать активности отдельных редокс-зависимых ферментов. Преимуществом НСТ и МТТ по сравнению с другими акцепторами (ДХФФ, ТМПД) или полярографическим методом является возможность постановки эксперимента с большим количеством проб и, самое главное – сравнения результатов измерений, проведенных одновременно в идентичных условиях, что имеет важное значение для исследования влияния природных или синтетических физиологически-активных соединений на окислительные процессы. Эти свойства и преимущества НСТ и МТТ были использованы для выявления специфического влияния прогестерона и его синтетических аналогов, ряда фенольных кислот микробного происхождения, а также N-ацетилимидазола как субстрата в реакциях ацетилирования на активность отдельных дегидрогеназ. *Работа поддержана грантами РФФИ №16-04-00636, № 16-04-00342 и грантом РНФ № 15-15-00110.*

РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ СУПЕРОКСИДИДИСМУТАЗЫ В УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* К ЭТАНОЛУ

А.Н. Зырина¹, Е.А. Смирнова², О.В. Маркова², С.С. Соколов², Д.А. Кнорре², Ф.Ф. Северин² ¹Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова; ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В геноме дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* закодировано две супероксиддисмутазы: Sod1p локализована в цитоплазме, а Sod2p – в матриксе митохондрий. Делеция гена цитоплазматической супероксиддисмутазы приводит к значительному снижению устойчивости клеток к различным типам стресса. В то же время, делеция гена митохондриальной изоформы, SOD2, слабо влияет на выживание клеток в таких же условиях. Исключением является стресс, вызванный высокой концентрацией этанола — ранее было показано, что делеция гена SOD2 делает клетки дрожжей сверхчувствительными к такому воздействию. В нашей работе мы исследовали роль Sod2p в устойчивости клеток дрожжей к этанолу. Мы обнаружили, что в условиях репрессии SOD2 не происходило релокализации транскрипционного фактора Yap1p в ядро при добавлении спирта. Yap1p играет главную роль в ответе на окислительный стресс; он активируется перекисью водорода, после чего релокализуется в ядро и запускает экспрессию антиоксидантных генов. Кроме того, количество Trx2p и Gsh1p белков, кодируемых генами-мишенями Yap1p, было понижено в условиях репрессии SOD2. Мы обнаружили, что делеция гена YAP1, также как и репрессия гена SOD2, в одинаковой степени понижала устойчивость клеток к этиловому спирту. Однако репрессия гена SOD2 не влияла на жизнеспособность клеток дрожжей в штамме с делегированным геном YAP1 при добавлении этанола. Это указывает на наличие генетического взаимодействия между двумя генами, предполагая, что оба белка Sod2p и Yap1p участвуют в одном и том же сигнальном каскаде. Более того, репрессия SOD2 немного уменьшала скорость образования перекиси водорода изолированными митохондриями, а искусственная активация Yap1 с помощью прединкубации с перекисью водорода восстанавливала устойчивость клеток с репрессированным геном SOD2 к этанолу до уровня дикого типа. Таким образом, мы предполагаем, что Sod2p и Yap1p являются компонентами одного сигнального каскада, передающего информацию от митохондрий к ядру и играющего важную роль в клеточном антистрессовом ответе на этанол. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-00197 мол_а.*

ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА АТР/АДР АНТИПОРТЕРА ДРОЖЖЕЙ PЕТ9 НА СТРУКТУРУ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО РЕТИКУЛУМА

К.В. Галкина¹, С.С. Соколов², Ф.Ф. Северин², Д.А. Кнорре² ¹Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова; ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Баланс частоты слияний и делений митохондрий определяет структуру митохондриального ретикулума и отражает функциональное состояние клетки. Однако не до конца понятно, как взаимосвязаны функциональное состояние митохондрий и их способность к слиянию и делению. Мы исследовали роль АТР/АДР антипортера в регуляции структуры митохондриального ретикулума. Мы обнаружили, что сверхэкспрессия гена АТР/АДР антипортера дрожжей PЕТ9 сдвигает равновесие процессов деления и слияния митохондрий в сторону слияния. Репрессия PЕТ9, наоборот, приводит к фрагментации митохондриального ретикулума. Данный эффект может означать, что белок Pet9p либо стимулирует процесс слияния митохондрий, либо препятствует их делению. Чтобы различить эти два варианта, мы исследовали слияние митохондрий в клетках-зиготах с репрессированным PЕТ9. К моменту образования срединной почки наблюдается полное перемешивание белков матрикса митохондрий по всему митохондриальному ретикулуму зиготы. В случае с зиготами, содержащими митохондрии с репрессированным АТР/АДР антипортером, мы наблюдали нарушение слияния приблизительно в половине случаев. Кроме того, мы наблюдали эффект PЕТ9 на динамику митохондрий в клетках дрожжей с полностью отключенным механизмом деления митохондрий (делецией гена DNM1). Таким образом, наши данные указывают на важную роль АТР/АДР антипортера в регуляции слияния внутренних мембран митохондрий. Мы предполагаем, что изменения концентрации нуклеотидтрифосфатов в матриксе митохондрий могут приводить к изменению соотношения молекул антипортера, находящихся в различных конформационных состояниях. В свою очередь, конформационное состояние Pet9p должно оказывать влияние на кривизну липидного бислоя, что играет решающее значение при слиянии мембран. Таким образом, АТР/АДР антипортеры в целом (и Pet9p в частности) могут служить ключевым фактором, связывающим функциональное состояние митохондрий и структуру митохондриального ретикулума. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-04-01381.*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОБИОХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ ПРИ ОСТРОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ

Н.В. Хундерякова¹, Е.Г. Литвинова¹, Т.В. Ячкула¹, М.В. Захарченко¹, А.В. Ковзан¹, Н.И. Федотчева¹, П.М. Шварцбург¹, С.А. Плясунова², М.Н. Кондрашова¹ ¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН; ²ФНКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева МЗ РФ, Москва, Россия

В здоровом организме в нормальных лимфоцитах процессы дыхания митохондрий преобладают над гликолизом. В раковых клетках наоборот, гликолиз подавляет дыхание. Этот феномен, называемый эффектом Варбурга (ЭФВ), является биологическим показателем развития опухоли. В данной работе у здоровых и у больных острым лимфолейкозом (ОЛЛ) детей определяли активности ферментов дыхания – сукцинатдегидрогеназы (СДГ), и гликолиза – лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Соотношение активностей этих ферментов (ЛДГ/СДГ) использовали для оценки величины ЭФВ. Активность окислительных ферментов определяли разработанным нами высокочувствительным цитобиохимическим (ЦБХ) методом в лимфоцитах в мазке крови по восстановлению красителя нитросинего тетразолия с компьютерной обработкой микроскопических изображений. В исследовании принимали участие группы обследуемых здоровых (n=5) и больных ОЛЛ (n=12) детей разного возраста с разной степенью тяжести. Одновременное обследование пяти условно здоровых детей сравнительно с больными показало, что у всех здоровых детей ЛДГ/СДГ значительно ниже. В тоже время у здоровых детей наблюдались закономерные отличия с возрастом – у детей младшего возраста это соотношение было выше, что может быть связано с интенсивным ростом. В группе больных одновременно обследовались двенадцать детей с ОЛЛ. В этой группе значения ЛДГ/СДГ в лимфоцитах варьировали от 4 до 15. С низким значением (от 4,5 до 9,6 у.е.) были дети с низкой тяжестью заболевания (n=7), с высоким значением (от 9,9 до 15,0 у.е.) – с тяжелой степенью заболевания ОЛЛ (n=5), сопровождаемого высокой интоксика-

цией и появлением большого количества бластных клеток. Полученные данные показывают, что цитобиохимическое определение активности ЛДГ, СДГ и их соотношения может использоваться как чувствительный метод оценки энергетического состояния организма в норме и патологии. *Работа поддержана грантами РФФИ №16-04-00636 и № 16-04-00342.*

КОМПЕНСАТОРНЫЙ ВНЕПЕЧЕНОЧНЫЙ СИНТЕЗ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС

Е.Ю. Ильичева, Н.В. Цымбаленко, А.С. Суханова, Л.В. Пучкова

Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург; Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Баланс меди в сыворотке крови, определяемый церулоплазмином (ЦП) печеночного происхождения, регулируется путем влияния органов, нуждающихся в меди, на активность гена ЦП в печени. Для исследования этой парадигмы нами использована модель крыс с низким уровнем холо-ЦП. Снижение содержания меди в сыворотке крови достигается добавлением в корм крыс солей серебра (Ag-диета и Ag-крысы). Ag(I) является электронным двойником Cu(I), поэтому узнается всеми переносчиками меди, которые доставляют Cu(I)/Ag(I) к местам формирования купроэнзимов. Если остатки цистеина входят в координационную сферу активного центра, ионы Ag(I) включаются в купроэнзим и препятствуют формированию холо-фермента. К таким купроэнзимам относится ЦП. У взрослых крыс через 30 дней содержания на Ag-диете уровень холо-ЦП и концентрация меди падают в 10 раз, молекула ЦП содержит атомы Cu и Ag в соотношении 1:3, она утрачивает нативный фолдинг и каталитические свойства. Потомство этих крыс носит черты острой недостаточности меди и нежизнеспособно. Напротив, у крыс, которые с первого дня жизни вскармливаются самками, получавшими Ag-корм, и затем содержатся на ней до 6-месячного возраста, острый дефицит холо-ЦП не развивается, благодаря тому, что в кровотоке присутствует холо-ЦП непеченочного происхождения. Мониторинг экспрессии гена ЦП в клетках внутренних органов с помощью стандартного ОТ-ПЦР анализа показал, что в ответ на хроническую Ag-диету в клетках подкожного жира (ПЖ) активность гена ЦП повышается почти в 3 раза. В ПЖ формируются обе сплайс-формы ЦП-мРНК: ЦП-мРНК, кодирующая секреторный ЦП и мРНК ГФИ-ЦП кодирующая ЦП, заякоренный в мембране. Параллельно в клетках ПЖ растет уровень экспрессии генов, чьи белковые продукты участвуют в металлизировании ЦП (CTR1, DMT1, ATR7a, но не ATR7b). По данным иммуноблоттинга и оксидазной активности, в ПЖ ГФИ-ЦП присутствует в аппарате Гольджи и его количество увеличивается у Ag-крыс. В то же время, на плазматической мембране Ag-крыс содержание ГФИ-ЦП ниже чем в контроле. Клетки ПЖ синтезируют секреторный [14C]ЦП и его количество увеличивается у Ag-крыс. Обсуждается компенсирующая роль клеток ПЖ в обеспечении баланса меди в целом организме, в условиях дефицита печеночного ЦП. *Работа поддержана грантами РФФИ № 15-04-006770, № 16-34-60219, № 14-04-01640.*

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ГАПЛОИДНЫХ И ДИГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

О.А. Землянухина¹, Е.Н. Васильченко¹, Н.А. Карпеченко¹, Т.П. Жужжалова¹, И.Ю. Карпеченко², В.Н. Калаев²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара им. А.Л. Мазлумова, Рамонь Воронежской области; ²Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

При создании гомозиготных линий сахарной свеклы методом гаплоидного партеногенеза большое значение имеют биохимические и молекулярно-генетические диагностические признаки. Объектами исследований служили селекционные линии K1 и K2 различного происхождения, полученные из них гаплоиды K1-1, K2-1 и колхицинированные растения. У гаплоидов показано достоверно большее количество белка по сравнению с контролем: в 1.6 раза у линий K1-1 и в 1.4 раза – линий K2-1. Содержание белка у дигаплоидов уменьшалось до уровня материнских растений. При распределении активностей глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, малик-энзима, пероксидазы наблюдалась аналогичная закономерность, выражающаяся в увеличении активности ферментов у гаплоидных микроклонов по сравнению с контрольными эксплантами, а у дигаплоидов – возврат к активности материнских регенерантов. Изоферментные спектры выявили у гаплоидов сходство с родительскими растениями по изоцитратдегидрогеназе, 1- и 2-эстеразе, пероксидазе. Дигаплоиды показали редуцирование спектров по сравнению с контрольными и гаплоидными регенерантами. Это свидетельствует, что три группы растений: контрольные, гаплоидные и колхицинированные имеют более глубокие различия не только на уровне активности ферментов, но и в регуляции активности генов. Линия K2 проявила более гетерогенный характер изоферментного спектра, чем линия K1. Выявленные различия можно, по-видимому, объяснить эпигенетической изменчивостью, связанной с метилированием тех или иных генов. Молекулярно-генетическое изучение гаплоидов с использованием анализа фрагментов митохондриального генома 2 пар праймеров (nad1 exonB – nad1 exonC, nad1 BF2 – nad1 BR3), амплифицирующих фрагменты второго интрона первой субъединицы гена фермента NADH dehydrogenase, выявило различия в нуклеотидной последовательности ДНК митохондрий, позволившие проследить четкую корреляцию: все гаплоидные образцы линии K1 фертильны, гаплоиды линии K2 обладают цитоплазматической мужской стерильностью. Полученные результаты подтверждают ассоциацию цитоплазматической мужской стерильности у растений сахарной свеклы с изменениями структуры ДНК в митохондриальном геноме, что облегчает задачу создания линий с ЦМС и формирования высокопродуктивных гибридов на стерильной основе.

ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА МЕДИ У ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС, ХРОНИЧЕСКИ ПОЛУЧАЮЩИХ С ПИЩЕЙ ИОНЫ СЕРЕБРА

Н.В. Цымбаленко, Е.Ю. Ильичева *Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия*

Медь является важнейшим микроэлементом для всех организмов, участвуя в клеточном сигналинге, а также являясь кофактором ключевых жизненно важных ферментов. В то же время она может служить источником АФК. Ag(I) изoeлектронен Cu(I), поэтому он связывается транспортерами меди и встраивается в купроэнзимы, вызывая их инактивацию. Ранее нами было показано, что у взрослых крыс, содержащихся на Ag-диете (50 мг AgCl/кг веса ежедневно) в течение 30 дней, Ag всасывается в кишечнике, доставляется в печень, где встраивается в ЦП, нарушая его третичную структуру и ферментативные

функции: оксидазная активность в сыворотке крови исчезает. Беременные крысы, содержащиеся на Ag-диете, не вынашивают жизнеспособное потомство. В работе исследовали показатели метаболизма меди у крыс, получающих Ag в течение 6-ти месяцев (сначала с молоком Ag-матерей, а потом с кормом в виде AgCl). Для исследования были взяты контрольные и получающие Ag животные (Ag-крысы) в возрасте 5, 20, 40 и 180 дней жизни. Измерены показатели статуса меди в сыворотке крови, концентрация меди и серебра во внутренних органах и сыворотке крови. Охарактеризована экспрессия генов: медь связывающих и транспортирующих белков (MT, COMMD1, CTR1, CTR2, ATP7A, ATP7B, Cu(I)-шаперона супероксиддисмутазы CCS), а также цитозольных, митохондриальных, секреторных и мембраносвязанных купрозинимов (SOD1, изоформа 1 субединицы IV комплекса ЦО, ЦП и ГФИ-ЦП). Уровень транскрипции генов сопоставлен с удельным содержанием соответствующих белков, определенным методом иммуноблотинга: ЦП (сыворотка крови), COMMD1, SOD1, MT и COX IV (цитозоль и митохондрии клеток печени соответственно). Активность ЦП (оксидазная и ферроксидазная) и SOD1 измерена методом определения в геле и спектрофотометрически. К 40-му дню жизни у Ag-крыс оксидазная и ферроксидазная активности в сыворотке крови, как и активность генов метаболизма меди в печени (Ctr1, Ctr2, Mta, Commd1, Cox4i1, Ccs) снижаются в 2 раза. Кроме того, нет больших различий в значениях концентрации меди, ЦП и SOD1 в сыворотке крови, концентрации гемоглобина и морфологических индексов. Физиологические тесты не выявили различий между крысами контрольной группы и Ag180. Обсуждается вопрос адаптации гомеостаза меди у Ag-крыс к ее хроническому дефициту (*гранты РФФИ №16-34-60219, №14-04-01640*).

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОЗОЛЬНОГО НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО МЕДЬСОДЕРЖАЩЕГО КОМПЛЕКСА

А.Н. Савельев¹, Е.Ю. Ильичева^{2,3}, Ю.А. Орлов³, В.Ю. Тихоплав³, Л.В. Пучкова^{1,2,3} ¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого; ²Институт экспериментальной медицины; ³Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия

В безопасном транспорте меди, микроэлемента, необходимого для жизни и одновременно токсичного агента, участвуют транспортеры, шапероны, окислительно-восстановительные (Cu(I) – Cu(II)) системы и низкомолекулярные переносчики меди (НПМ). К НПМ относится метанобактин-подобное вещество (НПМ1) эукариотов. Оно связывает Cu(I) и перемещает его между цитозолем и митохондриями, сохраняя уровень меди в цитозоле. На поздних стадиях болезни Вильсона, ведущей к нарушению экскреции меди через желчь и ее накоплению в печени, у пациентов в сыворотке крови и в моче обнаружен НПМ2. Природа обоих НПМ и их физиологическая роль в метаболизме меди не установлены. В то же время, такие данные могут помочь в понимании гомеодинамики меди, а также быть использованы в качестве маркеров состояния обмена меди. В работе использованы две животные модели с блокированной экскрецией меди через желчь и модель, имитирующая избыток меди в состоянии окисления Cu(I). Первая модель – новорожденные крысы (фенокопия болезни Вильсона), у которых медь не экскретируется через желчь, а выводится с мочой. Вторая – адреналэктомированные крысы (нарушение экскреции меди через желчь). И третья – крысы, получавшие с пищей ион Ag(I). Так как Ag(I) изоэлектронен Cu(I), он связывается и переносится Cu(I)-переносчиками. Но Ag(I) не способен к редокс-превращениям и аккумулируется в том звене системы переноса Cu(I), за которым Cu(I) окисляется в Cu(II). В качестве контроля использованы взрослые крысы. Выделенная из печени цитозольная фракция была анализирована методом гель-фильтрации. В элюатах методом ААС была измерена концентрация Cu(Ag). Металлы обнаружены во фракциях, идентифицированных методом иммуноблотинга или по активности, как ЦП (132 кДа), SOD1 (35 кДа), металлотионеин (6–10 кДа). Только у крыс экспериментальных групп в низкомолекулярной фракции выявлено присутствие Cu(Ag) (НПМ3). НПМ3 в условиях нативного электрофореза в ПААГ перемещается в виде зоны, окрашивающейся кумасси, проявляет СОД-активность, в денатурирующих условиях в ПААГ разделяется на ряд фрагментов. НПМ3 чувствителен к обработкам эндопептидазами, РНКазой А и металл-окисляющей смесью. В сыворотке новорожденных обнаружен комплекс, сходный НПМ3. Обсуждается возможная идентичность НПМ3 с рибокинами.

ИЗМЕНЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА МЕДИ В ОТДЕЛАХ МОЗГА КРЫС В ТЕЧЕНИЕ РАЗВИТИЯ

Л.В. Пучкова, П.С. Бабич Институт экспериментальной медицины; Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург; Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия

Развитие нейродегенеративных заболеваний связано с нарушением метаболизма меди. Некоторые из них (болезнь Вильсона, болезнь Менкеса, ацерулоплазминеми) являются прямым следствием врожденных ошибок метаболизма меди, другие (болезни Паркинсона, Альцгеймера, прионная болезнь) сопровождаются повышением концентрации меди в мозгу и причины этого не установлены. Возможно, что наследственной причиной развития нейродегенеративных заболеваний, может быть нарушение гомеодинамики меди в раннем онтогенезе. В работе у новорожденных (5-, 10- и 20-дневных) и взрослых молодых крыс в коре, мозжечке, гиппокампе, сосудистом сплетении, гипоталамусе и гипофизе, а также в печени, сыворотке крови и СМЖ методом атомно-абсорбционной спектроскопии определена концентрация атомной меди. Параллельно, измерена относительная концентрация зрелых продуктов транскрипции генов церулоплазмينا (ЦП), двух Cu(I)/Cu(II)-транспортных АТФ-аз Р1 типа (ATP7A и ATP7B), CTR1 и SOD1. Содержание иммунореактивных полипептидов ЦП, CTR1 и SOD1 установлено методом количественного иммуноэлектрофореза или иммуноблотинга. Показано, что в исследованных отделах мозга медь накапливается прогрессивно до 20-го дня жизни и достигнутый уровень сохраняется у взрослых. Исключение составляет сосудистое сплетение, в котором, как и в печени, в первые дни жизни медь накапливается до концентраций в несколько раз превышающих содержание меди, а затем резко падает. В СМЖ концентрация меди не меняется. У новорожденных и взрослых во всех отделах мозга, и в сосудистом сплетении особенно, активен ген CTR1, кодирующий высоко аффинный импортер меди. ATP7A-мРНК обнаружена во всех отделах мозга и у взрослых ее содержание выше. ATP7B-мРНК в основном экспрессируется в гипофизе, гипоталамусе и сосудистом сплетении. Из двух сплайс-форм, образующихся из первичного продукта транскрипции гена ЦП, у новорожденных крыс преимущественно формируется ЦП-мРНК, программирующая синтез секреторного ЦП, у взрослых – GPI-Ср. Обсуждаются особенности метаболизма меди в мозгу в течение развития и возможные последствия его нарушения. *Поддержан грантом РФФИ #15-04-016670 и Минобрнауки РФ #6.1278.2014/К.*

ИНДУКЦИЯ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ТЕЛОМЕРАЗЫ hTERT АПОПТОТИЧЕСКОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗОЙ ENDOG ВЫЗЫВАЕТ ГИБЕЛЬ КЛЕТОК

Д.Д. Жданов, Д.А. Васина, В.С. Орлова, М.В. Покровская, С.С. Александрова, В.С. Покровский, Н.Н. Соколов
НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Активность теломеразы регулируется альтернативным сплайсингом мРНК её каталитической субъединицы hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase). Увеличение количества не активной сплайс-формы hTERT ингибирует теломеразную активность. В настоящее время механизм сплайсинга hTERT изучен недостаточно полно. Целью работы явилось изучение влияния апоптотической эндонуклеазы EndoG на альтернативный сплайсинг hTERT и активность теломеразы. Клетки линии карциномы кишечника человека CaCo-2 трансфицировали плазмидой pEndoG-GFP или контрольной плазмидой pGFP. ОТ-ПЦР в реальном времени и метод Вестерн блоттинга применяли для изучения экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT. Оценку активности теломеразы проводили методом TRAP (Telomeric Repeats Amplification Protocol). Для определения клеток в состоянии апоптоза и анализа клеточного цикла использовали проточную цитометрию. Установлена корреляция между уровнями экспрессии EndoG и сплайс-вариантов hTERT в клетках 12 линий рака кишечника человека. Увеличенный уровень экспрессии EndoG соответствовал пониженному уровню экспрессии полноразмерного активного сплайс-варианта hTERT и повышенному уровню экспрессии сплайс-варианта с редуцированной активностью. Сверхэкспрессия EndoG в клетках CaCo-2 вызывала снижение экспрессии полноразмерного активного варианта hTERT и увеличение экспрессии сплайс-варианта. Изменение пропорции сплайс-вариантов hTERT приводило к снижению активности теломеразы. Однако клетки продолжали делиться, их теломеры укорачивались до критических значений, что вызывало переход клеток в состояние репликативного старения. Последнее сопровождалось ингибированием клеточного цикла в G0/G1 фазе, а также активацией экспрессии и активности бета-галактозидазы (маркера состояния репликативного старения клеток). Дальнейшее культивирование приводило к активации апоптотических процессов и массивной гибели клеток. В клетках, трансфицированных контрольной плазмидой pGFP не наблюдалось изменения экспрессии сплайс-вариантов hTERT и ингибирования теломеразы. Клетки продолжали делиться, укорочения их теломер не происходило. Эти данные указывают на участие EndoG в процессе альтернативного сплайсинга мРНК каталитической субъединицы теломеразы и регуляции теломеразной активности.

СЕКРЕТИРУЕМЫЕ ПЕПТИДАЗЫ И МИКОТОКСИНЫ КАК ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ У НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *FUSARIUM*

В.Н. Лавренова¹, Т.Ю. Гагкаева², О.П. Гаврилова², Т.А. Семенова¹, М.А. Белозерский³, Я.Е. Дунаевский³

¹Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ²Всероссийский институт защиты растений, Санкт-Петербург; ³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Известно, что способность секретировать определённые соединения, в том числе ферменты и вторичные метаболиты, определяет трофический статус и экологическую функцию гриба в сообществе. Перспективным объектом для изучения молекулярных и биохимических адаптаций грибов-микромикотетов к условиям среды являются представители рода *Fusarium*, патогены многих культурных растений, продуценты опасных для человека и животных микотоксинов. Целью настоящей работы были анализ спектров внеклеточных пептидаз, характерных для разных штаммов и видов рода *Fusarium*, и оценка возможной роли пептидаз и микотоксинов в развитии патологического процесса в растении. В ходе работы были изучены моноспоровые культуры 12 штаммов 4 видов *Fusarium* (*F. poae*, *F. sibiricum*, *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides*). Величину класс-специфической активности секретируемых пептидаз определяли спектрофотометрически по степени гидролиза п-нитроанилидных субстратов, содержание трихотеценовых микотоксинов типа А в среде – методом иммуноферментного анализа. Патогенность оценивали с помощью инокуляции отрезков листьев овса суспензией конидий. Показано, что изученные штаммы, в основном, секретируют сериновые пептидазы семейств трипсина и субтилизина, а также аминокислотные пептидазы. Наилучшим продуцентом пептидаз среди исследованных видов являлся *F. langsethiae*, наихудшим – *F. poae*. По данным кластерного анализа все штаммы могут быть разделены на две группы: группу с низкой активностью секретируемых пептидаз и группу с высокой активностью этих пептидаз. Увеличение активности сериновых пептидаз в культуральной жидкости штаммов второй группы коррелировало с увеличением патогенности штаммов к листьям овса. На видовом уровне также были обнаружены положительные корреляции между активностью секретируемых пептидаз и продукцией микотоксинов, что, возможно, связано с общей скоростью метаболизма гриба. На уровне штаммов, напротив, прослеживались чёткие отрицательные корреляции между активностью секретируемых пептидаз и продукцией микотоксинов, что демонстрирует узкую специализацию некоторых штаммов на синтез только определённых факторов патогенности (т.н. trade-off эффект).

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ЧАСТИЧНОЙ СОСУДИСТОЙ ИЗОЛЯЦИИ

К.А. Попов, И.Ю. Цымбалюк, И.М. Быков, Е.Е. Есауленко

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

Для борьбы с кровотечениями печеночной паренхимы применяется временное пережатие печеночно-двенадцатиперстной связки (ПДС). Сложности этого приема связаны с развитием тяжелой ишемии печени. Снижение риска осложнений при острой временной окклюзии ПДС является актуальной проблемой хирургической гепатологии. В последнее время проводится большое количество исследований влияния на метаболизм натрия дихлорацетата (НДХА), механизм действия которого заключается в стимуляции активности пируватдегидрогеназного комплекса. Учитывая вышеизложенное, целью настоящей работы являлось изучение влияния НДХА на метаболические показатели печени и крови при частичной сосудистой изоляции гепатодуоденальной зоны у крыс. Эксперименты выполнены на 45 белых крысах-самцах массой 170–190 г. Работу осуществляли в соответствии с «Правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных». Под общей анестезией осуществлялась лапаротомия и пережималась ПДС на 10 минут (группа сравнения, n=15), затем через 15 минут реперфузии забирался материал для исследований. Опытная группа перед моделированием повреждения печени получала в течение недели НДХА в дозе 0,01 мг/г сут. Группу контроля составили 15 псевдооперированных крыс. В плазме крови и гомогенате печени определяли активности трансаминаз (АЛТ, АСТ) и концентрацию лактата с по-

мощью наборов реагентов (Витал Девелопмент Корпорэйшн). В ходе проведенных исследований было установлено снижение интенсивности цитолиза гепатоцитов при применении НДХА, подтвержденное показателями активностей трансаминаз. В плазме крови активности АЛТ и АСТ были ниже группы сравнения на 35 и 78% соответственно ($p < 0,05$), концентрация лактата статистически значимо не изменялась. В гомогенате печени возрастала активность АЛТ и АСТ на 53,4 и 66,6% соответственно ($p < 0,05$), что свидетельствует об активации реакций трансаминирования, которые участвуют в метаболических путях аминокислот. Концентрация лактата снижалась на 13,4% ($p < 0,05$). Полученные данные говорят о перспективе применения НДХА с целью предупреждения развития ишемических и реперфузионных последствий сосудистой изоляции печени.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ПЕПТИДЫ. ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ РЕГУЛИРОВАНИЯ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ФОСФОЛИПИДОВ КЛЕТЧНЫХ МЕМБРАН

В.П. Иванова *Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

Регуляторные пептиды (РП), как полифункциональные соединения, влияют на разнообразные функции множества белковых молекул, в том числе мембраносвязанных, активность которых определяется физико-химическими параметрами липидного бислоя клеточных мембран. Гидрофобная зона липидного бислоя, образованная углеводородными цепями фосфолипидов, в наибольшей степени подвержена динамическим перестройкам при воздействии внешних или внутренних регуляторных факторов. РП, как клеточные сигналы, могут включаться в регулирование процессов синтеза жирных кислот, в том числе синтеза длинноцепочечных полиеновых кислот. Как известно, $\Delta 6$ - и $\Delta 5$ -десатуразы обеспечивают синтез полиеновых кислот. РП могут регулировать активность десатураз или непосредственно, взаимодействуя с определенными участками молекулы фермента и изменяя ее трехмерную структуру, или опосредованно, индуцируя/супрессируя экспрессию генов десатураз, например, путем регулирования активности или синтеза фактора транскрипции генов $\Delta 6$ - и $\Delta 5$ -десатураз. В любом случае изменение условий катализа полиеновых кислот вызовет цепную реакцию: изменится спектр ацилов в фосфолипидах и связанный с этим процессом уровень текучести мембран, который отразится на микродомной организации клеточных мембран. Поскольку полиеновые жирные кислоты осуществляют тонкую и чувствительную настройку физико-химических характеристик клеточных мембран, то систему регуляции синтеза длинноцепочечных полиеновых кислот можно отнести к факторам, которые можно использовать для направленного воздействия на процессы формирования жидкокристаллической структуры клеточных мембран.

ПРИОННАЯ ТОКСИЧНОСТЬ И ГЕТЕРОЛОГИЧНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АМИЛОИДНЫХ БЕЛКОВ

А.Г. Матвеев^{1,2}, П.Б. Дроздова², М.В. Белоусов², С.А. Бондарев^{2,3}, Г.А. Журавлева^{2,3} *¹Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН; ²Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет; ³Лаборатория биологии амилоидов Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

Прионы – это белки, способные существовать в нескольких конформациях, по меньшей мере одна из которых является инфекционной. В дрожжах *Sacharomyces cerevisiae* их инфекционность приводит к тому, что прионы ведут себя как цитоплазматически наследуемые генетические элементы. Наиболее изученным из них является фактор $[PSI^+]$, который является прионной формой фактора терминации трансляции Sup35. Sfp1 является глобальным транскрипционным регулятором. Известно, что он связан с проявлением прионоподобного детерминанта $[ISP^+]$, и, подобно многим другим прионам дрожжей, содержит Q/N-богатые участки, однако способность этого белка образовывать амилоидные агрегаты ранее не исследовалась. Недавно нами было показано, что сверхэкспрессия *SFP1* может приводить к прион-зависимой летальности, что проявляется в том, что клетки, содержащие прион $[PSI^+]$, менее жизнеспособны, чем клетки без приона, в условиях увеличения экспрессии гена. Сильная конститутивная сверхэкспрессия *SFP1* приводила к несравнимо большей летальности, что позволило предположить, что эффект зависит от уровня продуцируемого белка. Однако в таких условиях Sfp1 вообще не детектируется в клетках, а при его визуализации *in vivo* он распределён диффузно, преимущественно в ядрах. Тем не менее, при экспрессии под контролем более слабого, но индуцибельного промотора *CUP1* белок присутствует в избытке и формирует множественные агрегаты в цитоплазме. Мы оценили детергент-устойчивость и размер этих агрегатов с помощью метода SDD-AGE, и выяснилось, что они устойчивы к SDS, но не к кипячению в буфере, содержащем SDS, что напоминает свойства амилоидных агрегатов Sup35 и других прионных белков. Более того, в клетках $[PSI^+]$ сверхэкспрессия *SFP1* приводит к увеличению размера агрегатов Sup35. Мы также выяснили, что повышение уровня шаперона Sis1 (Hsp40) компенсирует эффекты сверхэкспрессии *SFP1* как на токсичность $[PSI^+]$, так и на размер агрегатов Sup35. Мы предполагаем, что Sfp1 и Sup35 благодаря своим амилоидным свойствам способны коагрегировать, что влияет на токсичность приона $[PSI^+]$, а вовлечение Sup35 в агрегаты Sfp1 приводит к детекции агрегатов Sup35 большего размера. *Работа поддержана грантами СПбГУ (НИР 1.37.291.2015 и 1.50.1041.2014) и РФФИ (16-04-00202). Исследования проведены с использованием оборудования РЦ РМиКТ СПбГУ.*

ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТИОЛОВОГО МЕТАБОЛИЗМА У БОЛЬНЫХ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Е.А. Алексеенко, И.М. Быков, К.А. Попов, А.Н. Курзанов

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

Существенную роль в молекулярных механизмах развития и течения заболеваний респираторного тракта играет окислительный стресс (ОС), что связано с анатомо-физиологическими и эндогенными факторами интенсификации свободнорадикальных процессов в легких. Одними из важнейших компонентов антиоксидантной системы (АОС) являются тиоловые соединения и ферменты их метаболизма. Очень низкий Red-Ox потенциал таких соединений позволяет им выполнять функцию мощных антиоксидантов организма, которые не только самостоятельно ингибируют окислительные процессы, но и восстанавливают другие компоненты АОС. Целью настоящей работы являлось изучение содержания восстановленного глутатиона (GSH) и суммарных тиоловых групп, а также активностей глутатионпероксидазы (ГПО) и глутатионредуктазы (ГР) в крови пациентов с бронхиальной астмой (БА, $n=30$), средней степени тяжести, получающие стандартную терапию. Контрольную группу составили относительно здоровые доноры ($n=30$). Концентрацию GSH в эритроцитах и суммарных тиоловых групп в плазме крови определяли с помощью реактива Элмана. Активность ГР в эритроцитах определяли по способу, основанному

на регистрации убывли НАДФН при восстановлении глутатиона. Активность ГПО определяли по методу, основанному на регистрации убывли GSH при инкубации с гидроперекисью трет-бутила. В ходе проведенных исследований установлено, что концентрация GSH в эритроцитах больных БА была снижена на 12,6% ($p < 0,05$), а содержание тиоловых групп в плазме крови повышено на 14,3% ($p < 0,05$), что возможно связано с выходом тиоловых соединений из поврежденных клеток в кровь. Активность ГПО была снижена в 3,0 раза ($p < 0,05$), а активность ГР повышалась в 2,7 раза ($p < 0,05$). Полученные данные отражают дисбаланс в системе глутатиона у больных БА. Увеличение активности ГР направлено на поддержание концентрации GSH. Активность ГПО все же снижается, что свидетельствует о декомпенсации регуляторных систем организма. Полученные данные говорят о ведущей роли системы глутатиона в развитии и течении БА, а также демонстрируют перспективы применения тиолсодержащих антиоксидантов с целью коррекции метаболических нарушений у пациентов с БА.

ЧТО ОПРЕДЕЛЯЕТ ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ БИНАЗЫ НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ?

В.А. Митькевич, А.А. Макаров *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*

Некоторые рибонуклеазы (РНКазы) обладают селективным токсическим действием на злокачественные клетки, однако механизм их противоопухолевой активности во многом остается неясным. Биназа является катионной гуанил-специфичной РНказой из *Bacillus pumilus*. Было показано, что биназа проявляет токсическую активность в отношении целого ряда злокачественных клеток. Одной из ключевых особенностей, важных для потенциального использования биназы в терапии, является ее способность индуцировать гибель опухолевых клеток по пути апоптоза. При этом запускается как митохондриальный, так и лиганд-зависимый апоптоз. Важно, что действие биназы не приводит к некрозу клеток, как в культуре, так и на уровне целого организма в случае мышиных моделей. При этом биназа эффективно ингибирует рост первичных опухолей и метастаз в мышцах и запускает регенеративные процессы в их печени. Интерферон усиливает токсическое действие биназы на клетки цервикального рака, в которых статус p53 нарушен в результате экспрессии онкогенов вируса папилломы человека. Потенциальные акцепторы биназы на клетках млекопитающих это кислые липиды и гликопротеины, гепарансульфат-содержащие протеоглики, актин и ассоциированные с РНК белки. Клеточные мембраны нормальных и злокачественных клеток отличаются по составу этих компонентов, что во многом определяет избирательность действия биназы. В качестве внутриклеточных мишеней биназы рассматриваются РНК различного типа, предполагается ее вмешательство в процесс РНК-интерференции. Показано, что чувствительность клеток к действию биназы связана с экспрессией определенных онкогенов, а именно RAS, KIT, AML1-ETO, FLT3. Эти данные могут сфокусировать применение биназы в терапии, позволяя выявлять чувствительные к ее действию опухоли. *Работа поддержана Российским научным фондом, проект №14-50-00060.*

СИНТЕТИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ ПАТОГЕННОЙ АГРЕГАЦИИ БЕТА-АМИЛОИДА

С.А. Козин *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*

Бета-амилоид, короткий пептид с гетерогенной по С-концу последовательностью (1-39...43 аминокислотных остатка), вместе со своими структурно- и/или химически модифицированными изоформами, накапливается в мозгу пациентов, страдающих от болезни Альцгеймера (БА), в виде внеклеточных агрегатов со специфической надмолекулярной архитектурой «складчатых бета-листов». Эти агрегаты также содержат аномально высокие количества ионов биометаллов (цинка, меди, железа) и служат бесспорным нейроморфологическим признаком БА. Ранее было установлено, что изоформы бета-амилоида, выделенные из мозга пациентов БА, при введении в организм животных моделей БА вызывают патологическую агрегацию эндогенного бета-амилоида, и, таким образом, выступают в роли потенциальных патогенных агентов. Нами впервые показано, что синтетические пептиды, соответствующие изомеризованному по остатку аспарагиновой кислоты в положении 7 человеческому бета-амилоиду и металл-связывающему домену этой изоформы бета-амилоида, могут выступать в качестве инфицирующих молекул, вызывающих цепную реакцию патогенной олигомеризации и агрегации физиологического пула бета-амилоида, предположительно, посредством цинк-индуцированных межмолекулярных интерфейсов. Полученные результаты представляются важными для развития новых стратегий анти-амилоидной терапии и молекулярной диагностики болезни Альцгеймера. *Поддержано РФФИ (грант № 14-24-00100).*

ТКАНЕВАЯ ТРАНСГЛУТАМИНАЗА УЧАСТВУЕТ В ФОРМИРОВАНИИ КОВАЛЕНТНОЙ СВЯЗИ МЕЖДУ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗОЙ И A β 1-42 ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

А.Д. Никитина, В.Ф. Лазарев, Е.Р. Митяйлова, К.А. Бенкен, И.В. Гужова, Б.А. Маргулис
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

В основе болезни Альцгеймера (БА) лежит образование вне- и внутриклеточных белковых агрегатов пептида A β 1-42, формирующего токсичные амилоидные структуры. Помимо патогенного пептида, в сборку токсичных комплексов могут быть вовлечены и нормальные клеточные белки. Один из таких белков – тканевая трансглутаминаза (тТГ); известно, что ее активность достоверно увеличивается при нейродегенеративных патологиях, в частности при БА. Этот фермент, обеспечивающий ковалентное взаимодействие между остатками лизинов и глутаминов, увеличивает способность A β 1-42 к агрегации. Другой белок, принимающий участие в патогенных процессах агрегатообразования – фермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД). Ранее ГАФД была обнаружена в амилоидных бляшках у пациентов с БА и продемонстрирована способность этого белка взаимодействовать с A β 1-42. Кроме того, фермент ГАФД является донором лизинов, которые может использовать тТГ. Основываясь на этих данных, мы предположили, что тТГ может сшивать лизины ГАФД с единичным глутамином, расположенным в 15-ой позиции на молекуле A β 1-42. Целью нашей работы было исследовать роль тТГ в образовании комплексов ГАФД и A β 1-42 и определение цитотоксичности формирующихся амилоидоподобных структур. С помощью метода иммуно-ферментного анализа мы установили, что тТГ усиливает взаимодействие между ГАФД и A β 1-42, более того, участие тТГ ускоряет формирование ко-агрегатов ГАФД и A β 1-42 нерастворимых в додецилсульфате натрия. Для определения роли 15-ого глутамина A β 1-42 в формировании связи с ГАФД мы использовали препараты очищенных A β 1-16wt и A β 1-16Q15A. Оказалось, что тТГ не влияет на взаимодействие ГАФД и A β 1-16Q15A и на формирование их ко-агрегатов, в то же время, значительно ускоряя взаимодействие ГАФД с A β 1-16wt и их агрегацию. Важно отметить, что ГАФД с A β 1-16wt в присутствии тТГ формировал амилоидоподобные структуры (по данным атомно-силовой микроскопии),

и не формировал совместно с Aβ1-16Q15A. Наконец, комплексы ГАФД и Aβ1-16wt сформированные в присутствии тТГ показали значительно более высокий уровень токсичности на культуре первичных нейронов, чем комплексы ГАФД и Aβ1-16Q15A. Такие данные позволяют предположить, что участие тТГ играет важную роль в формировании Aβ1-42-содержащих белковых комплексов и значительно усиливает их токсичность.

ГОРИЗОНТАЛЬНЫЙ ПЕРЕНОС ПОЛИГЛУТАМИНОВЫХ ПАТОЛОГИЙ И РОЛЬ ГЛИКОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЭТОМ ПРОЦЕССЕ

Е.Р. Михайлова, В.Ф. Лазарев, А.Д. Никитина, Б.А. Маргулис, И.В. Гужова *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

Болезнь Хантингтона – наследственное заболевание, связанное с мутацией в гене белка хантингтина (Htt), что приводит к появлению аномально длинной полиглутаминовой последовательности на N-терминальном конце молекулы и к дальнейшей агрегации Htt в нейронах. Очаг болезни Хантингтона – шипиковые нейроны стриатума, но с течением времени зона поражения распространяется на соседние участки мозга. В последние годы обнаружено явление горизонтального переноса патологии, которое заключается в миграции патогенных белков между клетками мозга и их способности преобразовывать аналогичные белки акцепторной клетки в патогенные формы. Ранее нами было показано, что гликолитический фермент глицераальдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) увеличивает образование агрегатов и повышает их цитотоксичность. А целью данной работы было установить роль ГАФД в межклеточном переносе мутантного хантингтина. В настоящей работе мы показываем, что в клетках нейробластомы крысы PC-12HttQ103, несущих ген 1го экзона Htt с аномально длинным полиглутаминовым повтором (Q103), формирование агрегатов вызывает гибель клеток, а ГАФД в инактивированном состоянии высвобождается из повреждённых и мёртвых клетках в комплексе с polyQ. Кондиционированная среда, несущая эти комплексы, является токсичной для наивных клеток, а после удаления агрегатов – утрачивает эти свойства. В клетках агрегаты ГАФД колокализуются с агрегатами polyQ. При изучении вклада ГАФД в цитотоксичность патогенных комплексов, анализ гибели клеток показал, что ГАФД значительно усиливает токсичность полиглутамина. Также ГАФД способен проникать внутрь клеток и повышает проникающую способность polyQ. Также мы показали, что ГАФД увеличивает способность polyQ преобразовать нормальные клеточные аналоги в патогенные формы. Наконец, внеклеточные комплексы polyQ-ГАФД более токсичны для клеток, чем их внутриклеточные аналоги. Полученные данные позволяют предположить, что ГАФД значительно повышает токсичность агрегатов мутантного хантингтина, транспортирует его в клетки и способствует преобразованию нативных клеточных белков клетки-акцептора в патогенные формы.

ВЛИЯНИЕ МАЛЫХ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА НА ПОЛИМЕРИЗАЦИЮ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ НЕЙРОФИЛАМЕНТОВ

В.В. Нефёдова, М.В. Судницына, Н.Б. Гусев *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Важным компонентом цитоскелета нейронов являются нейрофиламенты, каркас которых формируют так называемые легкие цепи нейрофиламентов (NFL). Дистальная нейропатия Шарко-Мари-Ту 2 типа (ШМТ2) может быть связана с нарушением сборки нейрофиламентов, которая регулируется различными белками. Известны мутации малых белков теплового шока (sHsp), которые коррелируют с развитием болезни ШМТ2. Высказывается предположение, что мутантные белки sHsp могут влиять на формирование нейрофиламентов. Однако, до последнего времени не было данных о том, способны ли повсеместно экспрессируемые малые белки теплового шока (HspB1, HspB5, HspB6 и HspB8) взаимодействовать с белками нейрофиламентов. Методом ультрацентрифугирования было установлено, что при полимеризации тетрамеров NFL, индуцированной повышением ионной силы, происходит осаждение филаментов NFL, с которыми соосажаются HspB1, HspB5 и HspB8. В аналогичных условиях HspB6 практически не взаимодействует и не соосаждается с NFL. HspB6 и HspB8 не влияют, а HspB1 и HspB5 уменьшают количество осаждающихся нейрофиламентов, что, по-видимому, связано с уменьшением размеров образующихся олигомеров. При насыщении стехиометрия осажденного комплекса NFL-HspB1 составляет 2 к 1 при расчете на моль мономера. С использованием модифицированного пиренилмалеимидом NFL (PM-NFL) изучена кинетика полимеризации NFL. Установлено, что HspB1 и HspB5 эффективно тормозят, а HspB8 и HspB6 слабо влияют на полимеризацию PM-NFL. Методами динамического лазерного светорассеяния и аналитического ультрацентрифугирования установлено, что при низкой ионной силе HspB1 слабо взаимодействует с тетрамерами NFL, однако это взаимодействие значительно усиливается при повышении ионной силы и инициации полимеризации. Не выявлено существенных различий во взаимодействии NFL с HspB1 дикого типа и его мутантами (G84R, L99M, R140G, K141Q и P182S), экспрессия которых коррелирует с развитием болезни ШМТ2. Сделан вывод, что точечные мутации не влияют на взаимодействие HspB1 с NFL. В тоже время близко родственные малые белки теплового шока по-разному влияют на процессы формирования нейрофиламентов. *Работа поддержана грантами РФФИ 16-04-00016 и РНФ 14-35-00026.*

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЛЬБУМИНА И ЕГО ОЛИГОМЕРОВ С ТИОФЛАВИНОМ Т

Н.Р. Ровнягина, Т.Н. Тихонова, Е.А. Ширшин, Д.С. Молоденский, В.В. Фадеев

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В настоящее время происходит активное развитие разработки оптических методов детектирования различных социально значимых заболеваний. Термин амилоидоз обозначает группу заболеваний, вызванных неправильно свернутыми белками, которые образуют нерастворимые белковые агрегаты, накапливаясь в определенных тканях и органах и приводя к нарушению их нормальных функций. Высокомолекулярные соединения, сопутствующие амилоидозу, называются фибриллами и характеризуются вторичной структурой, богатой β-листами. Одним из наиболее распространённых маркеров для детектирования амилоидных фибрилл является тιοфлавин Т, встраивающийся в β-структуры агрегатов. Согласно данным ИК Фурье-спектроскопии, вторичная структура альбумина, основного транспортного белка, который составляет 60% от всей белковой фракции в плазме, в нативной форме также содержит β-листы. Существуют статьи, в которых показано взаимодействие тιοфлавина Т и БСА [1]. Поэтому даже слабая флуоресценция тιοфлавина Т, встроенного в нативный альбумин, может существенно влиять на количественную оценку содержания фибрилл с использованием данного зонда. В данной работе был исследован процесс связывания тιοфлавина с альбумином методом флуоресцентной спектроскопии, определена константа ассоциации комплекса. Использование время-разрешенной флуоресценции позволило определить среднее время жизни ти-

офлавина в растворе БСА, а также провести детальное исследование кинетик связывания тиофлавина с альбумином. В рамках данной работы также проводилось определение мод связывания тиофлавина с альбумином методом гель-фильтрационной хроматографии. Данный метод дал возможность объяснить, с какими структурами взаимодействует флуоресцентный краситель в растворе БСА, и позволил определить константы ассоциации тиофлавина с мономерными и димерными белковыми формами. Выводы, полученные с помощью гель-фильтрационной хроматографии, были подтверждены методом малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXS). *Это исследование было поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (проект 16-32-60168) и Российским научным фондом (проект 14-15-00602).*

1. Sen, Priyanka, et al. "Interactions of thioflavin T with serum albumins: spectroscopic analyses." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 74.1 (2009): 94-99.

УЧАСТИЕ СИСТЕМЫ ПОЛИ(АДФ-РИБОЗИЛ)ИРОВАНИЯ БЕЛКОВ В ПАТОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ НЕЙРОНА НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

С.И. Шрам¹, И.В. Кукушкина¹, А.М. Сури², А.С. Ефремова¹, Н.Ф. Мясоедов¹, В.Г. Пинелис²

¹Институт молекулярной генетики РАН; ²Научный центр здоровья детей МЗ РФ, Москва, Россия

Поли(АДФ-рибозил)ирование (ПАРирование) белков является универсальной регуляторной системой эукариотической клетки, ответственной за формирование и координацию клеточных реакций в ответ на постоянно возникающие стрессорные сигналы. В условиях патологии эта система выполняет не только защитные функции (поддержание целостности генома и др.), но также вовлекается в реализацию различных деструктивных процессов. Ранее было выявлено участие поли(АДФ-рибоза)-полимераз (ПАРП) в развитии целого ряда заболеваний нервной системы, в патогенезе которых важную роль играет окислительный стресс (ОС). Нами была исследована возможная роль системы ПАРирования в регуляции внутриклеточного уровня Ca^{2+} и функционального состояния митохондрий в нейронах при индукции в них ОС. Исследования проводились на культурах нейронально дифференцированных клеток феохромоцитомы крысы PC12. Индукцию ОС вызывали обработкой клеток H_2O_2 (0,1 – 1 мМ). Внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) и величину мембранного митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$) определяли микрофлуориметрическим анализом с использованием флуоресцентных индикаторов – Fura 2FF и Rh123. Инкубация клеток PC12 в присутствии H_2O_2 вызывала во всех клетках отсроченное (с латентным периодом от 10 до 60 мин) драматичное возрастание $[Ca^{2+}]_i$ и падение $\Delta\Psi_m$, а на более поздних сроках – гибель клеток. Деполяризация митохондрий в каждой рассматриваемой клетке всегда происходила на несколько минут позже возрастания $[Ca^{2+}]_i$. Фармакологическое ингибирование ПАРП не блокировало эти патологические реакции, но приводило к существенному изменению их кинетических характеристик. Наиболее существенными эффектами ингибирования было удлинение (примерно в 2 раза) латентного периода, предшествующего падению $\Delta\Psi_m$, и увеличение (примерно в 5 раз) скорости развития дисрегуляции $[Ca^{2+}]_i$. Было также установлено, что ингибирование ПАРП приводит к переключению программы клеточной гибели с некротической на апоптотическую. Полученные данные указывают на то, что вызываемые ОС нарушения ионного гомеостаза и функции митохондрий в нейронах тесно связаны с функционированием системы ПАРирования белков и видимо находятся под ее контролем. *Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-04-01870).*

БЕЛОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА TAG7 (PGLYRP1) ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С РЕЦЕПТОРОМ TNFR1 И ИНДУЦИРУЕТ АПОПТОЗ И НЕКРОПТОЗ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Д.В. Яшин, Е.А. Романова, Л.П. Сащенко Институт биологии гена РАН Москва, Россия

В нашем исследовании мы проанализировали механизмы программируемой клеточной смерти, которые запускаются в раковых клетках-мишенях под действием цитотоксического комплекса Tag7-Hsp70. Ранее нами было показано, что данный цитотоксический комплекс обладает противоопухолевыми свойствами и секретируется человеческими Т-лимфоцитами. В рамках данного исследования было показано, что этот комплекс индуцирует как апоптоз, так и некроптоз в опухолевых клетках. Механизм проведения апоптотического сигнала задействует классический путь с участием каспаз 3 и 8. Блокирование апоптоза приводит к переключению пути клеточной смерти на некроптоз, зависящий от активности RIP1 киназы. В проведение сигнала некроптоза участвуют клеточные органеллы лизосома и митохондрия. Оба этих пути клеточной смерти индуцируются через TNFR1 рецептор, который является рецептором известным цитокином TNF- α . Мы показали, что исследуемый Tag7-Hsp70 комплекс является новым лигандом для данного TNFR1 рецептора. При этом из двух компонентов комплекса Tag7-Hsp70 именно Tag7 связывается с TNFR1 рецептором. Взаимодействие белка Tag7 с TNFR1 препятствует связыванию как Tag7-Hsp70, так и TNF- α с рецептором, что приводит к ингибированию их цитотоксической активности. *Работа поддержана грантом РФФИ № 15-14-00031.*

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СЕРДЕЧНОГО ТРОПОМИОЗИНА, НЕСУЩЕГО КАРДИОМИОПАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ В ГЕНЕ TRPM1

А.М. Матюшенко¹, К.Э. Попруга¹, Д.В. Щепкин², Г.В. Копылова², Д.И. Левицкий¹ ¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва; ²Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Тропомиозин (Трм) – это актин-связывающий белок, играющий ключевую роль в регуляции сокращения скелетных и сердечных мышц. Мутации в гене сердечного Трм (TRPM1) зачастую ассоциированы с развитием таких тяжелых наследственных заболеваний человека, как гипертрофическая и дилатационная кардиомиопатии. Различными методами мы исследовали влияние целого ряда таких кардиомиопатических мутаций на структуру и функциональные свойства сердечного Трм. При этом мы изучали эффекты мутаций, расположенных в тех областях молекулы Трм, в которых она взаимодействует с тропонином Т – в области остатков 170–195 (мутации L185R, E180V и I172) и в области перекрытия N- и C-концов молекул Трм на поверхности актинового филамента (мутации M8R, K15N, I284V, M281T, и A277V). Методами дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и кругового дихроизма (КД) мы исследовали влияние таких мутаций на характер тепловой денатурации Трм. Показано, что мутации в области остатков 170–195 по-разному влияют на доменную структуру молекулы Трм. Так, мутации L185R и E180V повышали термостабильность C-концевой области Трм, тогда как мутация I172T

дестабилизировала эту область молекулы Trpm. Что касается мутаций в области перекрытия N- и C-концов молекул Trpm, то большинство из них не оказывало заметного влияния на структуру Trpm; исключение составляла лишь мутация A277V, которая повышала термостабильность C-концевой области Trpm. Все мутации в области перекрытия снижали вязкость растворов Trpm. Методом соосаждения показано, что почти все исследованные мутации снижают сродство Trpm к актину. При исследованиях температурных зависимостей светорассеяния комплексов Trpm с F-актином показано, что большинство мутаций снижает стабильность таких комплексов, за исключением мутаций A277V и E180V, которые увеличивали ее. В экспериментах, проведенных в искусственной системе подвижности (*in vitro* motility assay), было показано, что мутации L185R and E180V заметно повышают чувствительность к ионам кальция скорости скольжения реконструированных тонких филаментов, содержащих актин, тропонин и Trpm. Таким образом, кардиомиопатические мутации в гене Trpm могут оказывать существенное влияние на структуру и функциональные свойства Trpm. *Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 15-34-20136).*

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КОЭНЗИМА Q10 НА ПРОТЕОМНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭМОЦИОГЕННЫХ СТРУКТУР ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС С РАЗЛИЧНЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ПОВЕДЕНИЯ

Н.В. Кирбаева¹, Н.Э. Шаранова², А.В. Васильев¹

¹ФНЦ питания и биотехнологии; ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Стресс способен вызывать нейрохимические и поведенческие изменения в структурах головного мозга, а также приводить к увеличению потребления эндогенного коэнзима Q₁₀ (CoQ₁₀), создавая высокую вероятность его дефицита в организме. Кроме того, установлены различия в адаптации особей с разными индивидуально-типологическими параметрами к экстремальным воздействиям. Исходя из этого, целью работы стало изучение влияния CoQ₁₀ на протеомный профиль некоторых отделов головного мозга крыс с различными характеристиками поведения в условиях метаболического стресса. Работа выполнена на самцах крыс линии Вистар (n=112) с массой тела 210,2±36,7 г (M±SEM). Предварительно животные были разделены на группы устойчивых (n=56) и предрасположенных к стрессу особей (n=56). Разделение проводилось по результатам классического варианта теста «открытое поле». В качестве модели метаболического стресса использовали 5-дневное голодание с последующим восстановлением в течение 5 суток (вода ad libitum). Для изучения влияния CoQ₁₀ на стресс-индуцированный ответ организма крысы экспериментальных групп получали per os 10 мг/кг м.т. CoQ₁₀ в составе рациона. Таким образом, поведенчески активные и пассивные крысы были разделены на 14 групп, состоящие из 8 животных каждая. Животных выводили из эксперимента гильотинированием. В ходе сравнительного протеомного анализа удалось выявить ряд белков с дифференциальной экспрессией в структурах головного мозга поведенчески активных и пассивных животных. В результате проделанной работы было показано влияние острого метаболического стресса на изменение экспрессии белков головного мозга крыс, а также охарактеризована роль алиментарного воздействия при введении в рацион CoQ₁₀ на адаптационный статус крыс в условиях метаболического стресса. Полученные результаты демонстрируют специфику вовлечения отделов головного мозга в реализацию стрессорного и постстрессорного ответа у животных, а также указывают на различные пути ответа организма животных на стресс в зависимости от их индивидуально-типологических характеристик.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ БЕЛКОВ p53 И MDM2 В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ АУТОИММУННЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ.=

А.Х. Валиуллина, Р.М. Саярова, В.В. Соловьева, А.А. Ризванов, Э.Р. Булатов

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Рассеянный склероз (РС) представляет собой хроническое аутоиммунное заболевание, выражающееся в поражении когнитивных функций мозга. Основой патогенеза РС считается повреждение миелиновой оболочки нервных волокон центральной нервной системы. При развитии РС ключевую роль играют иммунные механизмы, регулирующие аутоиммунитет организма к собственным белкам. В настоящий момент в литературе описано большое количество экспериментальных работ по разработке ингибиторов взаимодействия p53-MDM2, способных активировать p53 и, таким образом, индуцировать p53-опосредованные молекулярные процессы, в первую очередь в опухолевых клетках. Однако, в настоящее время спектр потенциального применения данных ингибиторов не ограничивается лишь онкологией, а включает также нейродегенеративные и аутоиммунные заболевания. Несмотря на большой научный интерес, практически отсутствуют данные о действии ингибиторов на молекулярном и клеточном уровне при аутоиммунных заболеваниях, в частности при рассеянном склерозе. В данной работе мы использовали Nutlin-3a, ингибитор E3 убиквитин лигазы MDM2, для активации p53 в мононуклеарных клетках периферической крови человека. Для выделения клеток бралась кровь здоровых добровольцев и больных рассеянным склерозом. В работе применялся набор молекулярно-биологических методов, в частности, иммуноблоттинг, ПЦР в реальном времени, MTS-тест по определению клеточной пролиферации, проточная цитофлуориметрия и конфокальная микроскопия. Было показано, что Nutlin-3a изменяет уровень белка p53 в клетках и влияет на экспрессию его гена. Таким образом, MDM2 может являться потенциальной мишенью при аутоиммунных заболеваниях, таких как рассеянный склероз, системная красная волчанка и других. Тогда как, ингибиторы взаимодействия p53-MDM2, вероятно, могут служить модуляторами иммунного ответа. *Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 16-34-60213 мол. а. дк.*

ХИМИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ, ПРЕДОТВРАЩАЮЩИЕ АГРЕГАЦИЮ ФЕРМЕНТА ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ, ПОДАВЛЯЮТ ТОКСИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА КЛЕТОЧНОЙ И ЖИВОТНОЙ МОДЕЛЯХ

В.Ф. Лазарев, А.Д. Никотина, Е.Р. Михайлова, П.И. Семенюк, А.В. Толкачева, М.А. Шевцов, А.Л. Шаварда, И.В. Гужова, Б.А. Маргулис *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

Белок глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) известен как один из сенсоров окислительного стресса в клетке. Появление реактивных форм кислорода вызывает окисление нативной формы фермента и, в конечном счете, гибель клеток. Целью нашей работы было проверить способность веществ, подавляющих агрегацию ГАФД, препятствовать клеточной гибели, вызванной окислительным стрессом. Мы использовали модель окислительного стресса, основанную на обработке клеток нейробластомы человека SK-N-SH раствором содержащим перекись водорода. Вызванные инфекцией лентивируса по-

давление и повышение уровня внутриклеточной ГАФД приводили к уменьшению и увеличению, соответственно, количества агрегатов ГАФД, формирующихся в ответ на действие окислительного стресса; при этом выживаемость клеток в условиях стресса повышалась при низком уровне фермента и понижалась при высоком. Далее мы разработали основанную на методике ультрафильтрации тест-систему для скрининга малых молекул подавляющих агрегацию очищенной окисленной ГАФД; 5 отобранных с помощью новой тест-системы соединений демонстрировали предотвращение агрегации фермента в наномолярных концентрациях. Взаимодействие этих веществ с ГАФД было подтверждено с помощью методов дифференциальной калориметрии имолекулярного докинга. Обработка клеток нейробластомы с помощью отобранных соединений продемонстрировала способность двух препаратов блокировать формирование внутриклеточных агрегатов ГАФД и снижать токсическое действие перекиси водорода. Для дальнейшей апробации наиболее успешных препаратов мы использовали крыс, которым билатерально ввели в район стриатума известный индуктор окислительного стресса малонат натрия. Спустя 2 месяца животных тестировали на предмет нарушения двигательной функции с помощью метода сужающейся дорожки, анализировали уровень агрегатов ГАФД в спинномозговой жидкости и оценивали зону дегенерации с помощью магнитно-резонансной томографии. Лечение животных с помощью веществ RX409 и RX426 предотвращали появление двигательных нарушений, блокировали агрегацию ГАФД, и предотвращали поражение стриатума.

Такие данные позволяют предположить, что найденные нами соединения могут иметь терапевтическое применение для лечения последствий тяжелого окислительного стресса.

ПОЛУЧЕНИЕ, ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО МЕДЬ-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА СОРС ИЗ БАКТЕРИИ *THIOALKALIVIBRIO PARADOXUS* ARN1

Е.Ю. Саплинов¹, С.И. Цаллагов¹, Т.В. Ракитина², Е.М. Осипов¹, Н.И. Дергоусова¹, Т.В. Тихонова¹, В.О. Попов^{1,2}

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, ²НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

Медь входит в состав многих белков и ферментов. В свободной форме медь токсична даже в низких концентрациях. Некоторые организмы обладают способностью регулировать внутриклеточное содержание меди, что позволяет им существовать в условиях избыточных концентраций меди в окружающей среде. Оперон sorABCD отвечает за биосинтез белков, обеспечивающих связывание и транспорт ионов Cu(I)/Cu(II) у устойчивых к высоким концентрациям ионов меди бактерий *Pseudomonas syringae*. Известны два типа белков SorC. SorC типа A входит в состав оперона sorABCD и хорошо охарактеризован, известна его структура. Он имеет 2 разных сайта связывания для ионов Cu(I) и Cu(II). SorC типа B был впервые выделен и описан для бактерии *Pseudomonas fluorescens*. В его первичной структуре отсутствует мотив, отвечающий за связывание Cu(I). Структура и функция этого белка неизвестны. Объектом настоящего исследования является SorC типа B, который был обнаружен у бактерий рода *Thioalkalivibrio*, способных расти на тиоцианате как источнике азота, серы и энергии в присутствии высоких (до 700 мкг/л) концентраций ионов Cu(II). SorC из *Tv. paradoxus* содержит 160 аминокислотных остатков, 30 из них – сигнальный пептид, молекулярная масса зрелого белка 14 кДа. Гомология с известными SorC типа A и B не превышает 28%. В клетках *E.coli* получен рекомбинантный SorC без сигнального пептида с His6-тагом на C-конце и сайтом расщепления для TEV-протеазы. В результате проведения двух стадий металлохелатной хроматографии, разделенных стадией обработки целевого белка TEV-протеазой для отщепления His6-тага, был получен гомогенный препарат SorC. Методом тушения триптофановой флуоресценции показано, что SorC связывает Cu(II) в соотношении 1:1. В растворе SorC присутствует в виде смеси димера и тетрамера с молекулярной массой около 29 и 46 кДа. Получена пространственная структура SorC с разрешением 2.7 Å. В кристалле SorC образует димер. С сайты связывания ионов Cu(II) расположены на противоположных концах молекулы димера, строение сайтов связывания Cu(II) совпадает с таковым у SorC типа A. Лишь один сайт в димере содержал связанный ион меди. Причиной может быть восстановление ионов Cu(II) до Cu(I) под действием рентгеновского излучения и последующая их диссоциация. Работа поддержана грантом РФФИ № 16-04-01818.

МЕХАНИЗМЫ ФОТОПОВРЕЖДЕНИЯ СЕТЧАТКИ: ОКИСЛЕНИЕ ФОТОРЕЦЕПТОРНЫХ БЕЛКОВ

Е.Ю. Зерний¹, А.А. Назипова², О.С. Ганчарова¹, А.С. Казакова², М.В. Серебрякова¹, Е.Л. Немашкалова, Н.К. Тихомирова¹, В.Е. Бакшеева¹, Д.В. Зинченко³, А.А. Замятин¹, И.И. Сенин¹, С.Е. Пермяков²

¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ²Институт биологического приборостроения РАН, Пушкино; ³Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, Россия

Фотоповреждения сетчатки и возрастная макулодистрофия – дегенеративные офтальмологические заболевания, общим признаком которых является окислительное повреждение фоторецепторных клеток, часто имеющее необратимый характер и приводящее к слепоте. Молекулярные механизмы фотоповреждений сетчатки и белковые мишени светоиндуцированного окислительного стресса фоторецепторов остаются малоизученными. В работе созданы экспериментальные модели фотоповреждений сетчатки животных в условиях *ex vivo* и *in vivo*. С использованием полученных моделей установлено, что интенсивное облучение глаза видимым светом вызывает окисление аррестина и нейронального Ca²⁺-сенсора (НКС) рековерина – ключевых фоторецепторных белков, регулирующих десенситизацию зрительного рецептора родопсина. Методами протеомного анализа показано, что увеличение продолжительности облучения приводит к накоплению дисульфидных димеров аррестина, а также дисульфидных димеров, мультимеров/агрегатов и смешанных форм рековерина, содержащих тубулин и регуляторные субъединицы 26S протеасомы. Эти процессы сопровождают гистологически диагностированную дегенерацию фоторецепторного слоя сетчатки. Сравнение физиологического содержания и тиол-дисульфидного равновесия для пары димер/мономер рековерина позволило оценить значение редокс-потенциала в облученной фоторецепторной клетке как -160 мВ. При создании аналогичных условий *in vitro* происходит окисление рековерина и родственных ему фоторецепторных НКС, NCS1 и GCAP2, по консервативному в их структуре остатку цистеина (C39 в рековерине) с образованием дисульфидных димеров и окисленных мономеров, при этом специфика редокс-чувствительности указанных белков определяется поверхностной доступностью этого остатка в структуре их Ca²⁺-связанных и бескальциевых форм. В случае рековерина дисульфидная димеризация приводит к нарушению вторичной структуры, термостабильности и мембранной ассоциации белка, а также повышает его склонность агрегации, в то время как дальнейшее окисление C39 подавляет способность белка ингибировать фосфорилирование родопсина родопсинкиназой. На основании полученных данных предложены механизмы све-

тоиндуцируемого повреждения фоторецепторов за счет нарушений десенситизации родопсина и функционирования 26S протеасомы, связанных с окислением фоторецепторных белков.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИЙ КОНСЕРВАТИВНОГО БЕЛКА CG17337 У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Е.Н. Андреева¹, А.В. Иванкин¹, Е.Н. Кожевникова¹, Г.А. Павлова^{1,2}, А.В. Разуваева^{1,3}, А.В. Пиндюрин^{1,3}

¹Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск; ²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань;

³Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Консервативный белок дрозофилы CG17337 является малоизученным и относится семейству металлопептидаз M20. Нарушения экспрессии его гомологов у человека (идентичных по аминокислотной последовательности на 50–63%) ассоциированы с нефропатией при диабете 2-го типа, болезнью Паркинсона, различными видами рака (простаты, груди, желудка и глиобластомами). По литературным данным, ген CG17337 имеет повсеместный паттерн экспрессии у дрозофилы. Полученные нами данные масс-спектрометрического анализа указывают на то, что белок CG17337 может входить в состав SUUR-содержащих белковых комплексов. Белок SUUR является одним из немногих известных факторов, которые модулируют время репликации ДНК в геноме дрозофилы. Известно, что этот белок ассоциирован с теми же районами генома, что и белки хроматина HP1, ламин В-типа (Lamin Dm0) и гистон H1, а также непосредственно взаимодействует белками машины репликации CDC45L и PCNA. Мы получили поликлональные антитела, специфичные к белку CG17337 дрозофилы. По нашим данным этот белок локализуется как в цитоплазме, так и в ядре культивируемых клеток S2. Ядерная локализация белка CG17337 также подтверждается его детекцией на давленных препаратах политенных хромосом слюнных желез. Методом GST pull-down обнаружено взаимодействие между белками SUUR и CG17337 в экстрактах из яиц дрозофилы. Методом ко-иммунопреципитации показано взаимодействие белка CG17337 с белками SUUR и гистоном H1. При существенном снижении количества белка CG17337 в клетках S2 (посредством РНК-интерференции) снижается количество белков PCNA и HP1. По предварительным данным количество белка CG17337 регулируется в клеточном цикле, поскольку при обработке клеток S2 гидроксиметочевой или при однократном тимидиновом блоке наблюдалось снижение количества белка CG17337. Таким образом, наши результаты указывают на то, что белок CG17337 является компонентом хроматина и цитоплазмы. Полученные данные о взаимодействиях белка CG17337 с белковыми комплексами, вовлеченными в репликацию ДНК, могут служить базисом для понимания и дальнейших исследований таких процессов у млекопитающих и человека. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-04-01598.

РАЗРАБОТКА ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ ИЗОНИАЗИДА И ФТОРХИНОЛОНОВ, НАПРАВЛЕННЫХ НА ЛЕЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННО-РЕЗИСТЕНТНЫХ ФОРМ ТУБЕРКУЛЕЗА

М.Н. Агафонова, А.П. Любина, Л.К. Мухаметшина

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Развитие резистентности и дальнейшая невосприимчивость микобактерий (*M. tuberculosis*) к известным на сегодняшний день препаратам остается главной проблемой при лечении туберкулеза и особенно его резистентных форм. Поэтому проблема разработки новых противотуберкулезных препаратов весьма актуальна на сегодняшний день. Целью данного исследования является создание новых лекарственных препаратов на основе производных пиридина, содержащих фрагменты изониазида или различных фторхинолонов, обладающих на фоне низкой токсичности высокой противотуберкулезной активностью, против резистентных штаммов возбудителей туберкулеза. Подобные соединения перспективны, так как могут включаться в эндогенные циклы возбудителя туберкулеза. В рамках выполняемой работы, методом абсолютных концентраций на клинических штаммах *M. tuberculosis* была изучена способность исследуемых препаратов подавлять рост микобактерий. Способность полученных соединений оказывать влияние на ферментативные метаболические процессы микобактерий была изучена на модельных клетках. В качестве модели использовали культуру клеток дрожжей *S. cerevisiae*. В результате было показано, что некоторые из исследуемых соединений обладают высокой противотуберкулезной активностью и низкой токсичностью. Кроме того для ряда веществ показана способность стимулировать рост клеток *S. cerevisiae*, что свидетельствует о способности изучаемых соединений оказывать влияние на внутриклеточные метаболические процессы модельных клеток, что также подтверждают данные исследования протеомного профиля модельных клеток. Полученные данные свидетельствуют о том, что сочетание в структуре лекарственного соединения противотуберкулезной составляющей с одной стороны и производных пиридоксина (витамина В6) с другой стороны позволит с высокой вероятностью достичь поставленной цели – синтез высокоэффективного противотуберкулезного препарата в отношении устойчивых штаммов *M. tuberculosis*. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации (на 2016 – 2018 гг.).

ГЕМОЛИЗИН *MORGANELLA MORGANII*: БИОСИНТЕЗ, ВЫДЕЛЕНИЕ И ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ

А.М. Марданова¹, М. Х. Эль Эллак¹, Л.Ф. Миннуллина¹, З.Г. Гимадеев²

¹Институт фундаментальной медицины и биологии Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань,

²Медико-санитарная часть, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Гемолизины рассматриваются как важный фактор вирулентности многих патогенных и условно-патогенных бактерий. Показано, что более 50% клинических изолятов *Morganella morganii* проявляют гемолитическую активность. Однако в настоящее время гемолизины *M. morganii* остаются малоизученными. Целью работы было изучение особенностей биосинтеза гемолизина *M. morganii* на разных стадиях роста, выделение токсина из культуральной жидкости и определение цитотоксического действия штаммов с различной гемолитической активностью на культуру клеток HeLa-M. Определение цитотоксического эффекта бактериальных культур на эукариотические клетки проводили методом конфокальной микроскопии с использованием микроскопа Leica TCS SP5. Гемолитическую активность оценивали по гемолизу эритроцитов человека по методу (Senior, Hughes, 1987). Выделение и очистку гемолизина проводили методом фракционирования сульфатом аммония и гель-хроматографии на сефадексе G-100. Было проведено сравнение цитотоксического эффекта двух штаммов *M. morganii*, различающихся по гемолитической активности. Показано, что штамм 4, проявляющий способность к β-гемолизу, вызывал серьезное повреждение монослоя культуры клеток HeLa-M, в отличие от негемолитического штамма 1. Исследована дина-

мика биосинтеза гемолизина штаммом *M. morgani* 4 на среде LB. Показано, что гемолитическая активность появляется в среде уже на 2 час культивирования и достигает максимума на 3 час, после чего начинает снижаться. Оптимальным для биосинтеза является значение pH 7.0 и температура 30–37°C, активность повышается на среде с 50 мМ мочевиной. При фракционировании сульфатом аммония культуральной жидкости получена фракция (50–60% насыщения) с удельной активностью 421,8 ед/мг. В результате гель-хроматографии получен препарат белка с удельной активностью около 2700 ед/мг, степенью очистки 580 и выходом 17.2%. Таким образом, внеклеточная гемолитическая активность *M. morgani* появляется в среде в начале экспоненциальной фазы роста, зависит от состава среды и условий культивирования. Белок с гемолитической активностью выделен из среды культивирования в виде высокоочищенного препарата. Цитопатическое действие гемолитического штамма в отношении клеток HeLa может быть обусловлено действием внеклеточных гемолизина.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНО-КЛЕТОЧНО-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ В ГЕРОПРОФИЛАКТИКЕ

В.Н. Мещанинов

Институт медицинских клеточных технологий, Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

На проблему увеличения продолжительности жизни пациентов и повышения ее качества существенное влияние оказывают меры в медицине, направленные на повышение индивидуальной ориентированности лечения, селективность лечебного воздействия вещества в отношении возрастной группы, органа, ткани, клетки и даже субклеточной структуры (Анисимов В.Н., 2006; Хавинсон В.Х. и др., 2011; Скворцова В.И.; Скулачев В.П. и др., 2011). Исследованные нами геропрофилактические средства в среднетерапевтических дозах (антиоксиданты, интерлейкины, аминокислоты, трипептиды, а также их сочетания) у 2350 пациентов обоего пола зрелого (30–55 лет), пожилого (60–74 года) и старческого возраста с полиморбидной патологией в стадии стойкой ремиссии приводили к снижению биологического возраста при введении трипептидов в концентрациях – максимум на 23% ($p < 0,01$), преимущественно у пациентов зрелого возраста. Это сопровождалось во всех исследованных группах разнонаправленными изменениями биохимических показателей плазмы периферической крови и эритроцитов, не выходящими за границы референсных интервалов, а в группах зрелого и пожилого возраста – нормализацией показателей перекисного окисления липидов и содержания форменных элементов крови, включая стволовые гемопоэтические клетки, содержание которых в периферической крови с возрастом вне коррекции снижалось. Статобработка данных, включая корреляционный анализ, данные позволяют предполагать, что изученные метаболиты в реализации своего геропрофилактического механизма у данных разновозрастных категории пациентов имеет как минимум 3 относительно заметно выраженных механизма геропрофилактического воздействия: метаболический (у пациентов зрелого возраста), пептид-зависимый клеточно-метаболический (в пожилом возрасте), клеточно-ориентированный (в старческом возрасте). Все исследованные метаболиты также тяготели к тому или другому механизму действия. Полученные данные в дальнейшем позволяют осуществлять более индивидуализированную возраст-зависимую геропрофилактику среди пациентов с полиморбидной патологией. Обсуждается возможность прямого действия трипептидов как наиболее мощных геропрофилактических средств на ДНК клеток.

hnRNPs, SFPQ И ДРУГИЕ БЕЛКИ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ СПЛАЙСИНГ, В НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Н.В. Пашинцева^{1,2}, Л.С. Еремина^{1,2}, К.В. Лисицкая¹, Л.И. Ковалев¹, С.С. Шишкин^{1,2}

¹ФИЦ Биотехнологии РАН; ²Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Гетерогенные ядерные нуклеопротеины (hnRNPs) – РНК-связывающие белки, играющие важную роль в процессинге мРНК. Учитывая значение hnRNPs для посттранскрипционной регуляции генной экспрессии, неудивительно, что они вовлекаются в различные патологические процессы. В частности, имеются сведения об участии hnRNPs в процессах канцерогенеза, прогрессирования и метастазирования опухолей [Han S, Tang Y, Smith R. // Biochem J. 2010. V. 430(3). P. 379–92]. В данной работе при протеомном исследовании тотальных клеточных экстрактов и ядерных белков из пятнадцати клеточных линий человека (7 линий аденокарцином, 4 линии сарком, линии доброкачественной гиперплазии, нормальных миобластов, фибробластов и мезенхимальных клеток человека) было идентифицировано девять представителей hnRNPs (A1, A2B1, A3, C, F, G, H1, H3, L), содержание которых варьировало в различных клеточных линиях. Так, в клетках злокачественных опухолей hnRNP A1 присутствовал как мажорный белок (он выявлялся на двумерных электрофореграммах уже при окрашивании Кумасси голубым R-250). В культивируемых мезенхимальных клетках и нормальных миобластах человека содержание hnRNP A1 было как минимум на порядок меньшим (он обнаруживался только при окрашивании гелей нитратом серебра). При этом он практически исчезал после индукции дифференцировки миобластов культивированием в среде, содержащей 2% лошадиной сыворотки. Белок SFPQ, известный как фактор, влияющий на сплайсинг белка РТВ (hnRNP I), регистрировался как мажорный белок практически во всех исследованных клеточных линиях аденокарцином и сарком человека, тогда как в мезенхимальных стволовых клетках, а также в нормальных миобластах и фибробластах человека этот белок не выявлялся. Кроме того, в исследованных клеточных линиях человека удалось обнаружить и другие белки, участвующие в сплайсинге (SRSF3, PABPC1, RBM3), которые могут быть интересны с точки зрения их вовлеченности в процессы канцерогенеза.

РОЛЬ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ ГЛУТАТИОНА В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ АРАФ-1 И NF-κB В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЛИНИИ JURKAT

О.Л. Носарева, Е.А. Степоява, Е.В. Шахристова *Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия*

Опухолевая трансформация клеток характеризуется с одной стороны дисрегуляцией апоптоза, с другой – дисбалансом антиоксидантной системы. Важнейшим компонентом антиоксидантной защиты является восстановленный глутатион, который способен снижать деструктивное и цитотоксическое действие активных форм кислорода, выступая акцептором гидроксильного радикала и синглетного кислорода, а также образовывать смешанные дисульфиды с тиоловыми группами белков. Цель – оценить уровень Араф-1 и NF-κB в опухолевых клетках линии Jurkat при блокировании синтеза глутатиона *de novo*.

Объектом исследования служила опухолевая клеточная линия Jurkat, полученная из Института цитологии РАН (Россия). Культивирование опухолевых клеток линии Jurkat проводили суспензионным методом в полной питательной среде RPMI-

1640. Для достижения поставленной цели использовали ингибитор синтеза глутатиона бутионин-сульфоксмин (BSO) в конечной концентрации 1 mM. Содержание восстановленного (GSH), окисленного (GSSG) и белково-связанного глутатиона (белок-SSG) определяли спектрофотометрическим методом. Дополнительно рассчитывали величину соотношения GSH/GSSG – как показатель редокс-статуса клетки. Концентрацию Araf-1 и NF-κB определяли с помощью вестерн-блотт анализа. Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программы Statistica 6.0. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Шапиро–Уилка. Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни.

Добавление BSO в среду инкубирования опухолевых клеток линии Jurkat сопровождалось достоверно значимым снижением концентрации GSH в 5,13 раз ($p < 0,05$), белок-SSG в 7,00 раза ($p < 0,05$), GSH/GSSG в 4,03 раза ($p < 0,05$), Araf-1 в 1,87 раза ($p < 0,05$), увеличением содержания NF-κB в 1,97 раза ($p < 0,05$) на фоне сопоставимых значений GSSG по сравнению с показателем в интактных опухолевых клетках.

Полученные результаты указывают на участие компонентов системы глутатиона в изменении содержания факторов транскрипции – Araf-1 и NF-κB в опухолевых клетках линии Jurkat. Регулирование редокс-статуса с помощью системы глутатиона может рассматриваться как один из регуляторных механизмов апоптотической гибели при опухолевой прогрессии.

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА СОСТАВ БЕЛКОВ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

С.В. Сидоренко¹, О.Г. Лулева¹, О.О. Пономарчук^{1,2}, А.М. Тверской¹, А.А. Черкашин¹, О.В. Родненков³, Н.В. Алексеева¹, Л.И. Деев¹, Г.В. Максимов¹, Р. Григорчик², С.Н. Орлов^{1,4,5} ¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; ²Dept. of Medicine, University of Montreal, Канада; ³Российский кардиологический научно-производственный комплекс, Москва; ⁴Томский государственный университет, Томск; ⁵Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

Сосуды большого круга кровообращения увеличивают свой диаметр в ответ на снижение парциального давления кислорода. Было установлено, что эта уникальная функция реализуется только в условиях, когда перфузируемая жидкость содержит эритроциты. В основе этого явления лежит выброс АТФ из эритроцитов и активация P2Y рецепторов эндотелия. Эксперименты, проведенные в нашей лаборатории, показали, что гемолиз является основным механизмом выброса АТФ из эритроцита, вызванный несколькими стимулами, включая гипоксию (Blood. 2014 Sep 25;124(13):2150-7). Молекулярные механизмы нарушения целостности мембраны эритроцитов при гипоксии остаются не изученными. В этой связи мы сравнили действие гипоксии на гемолиз, выброс АТФ и на состав мембранных белков эритроцитов человека. Двадцать минут инкубации эритроцитов в бескислородной среде увеличивает содержание внеклеточного гемоглобина в ~1.5 раза ($p < 0.01$). Параллельные измерения значений свободного гемоглобина и содержания АТФ в образцах, показал положительную корреляцию между гемолизом и выбросом АТФ ($r_{xy} = 0.8088$, $p = 1.4 \times 10^{-5}$), что подтверждает участие гемолиза в выбросе АТФ в условиях гипоксии. Сравнительный анализ SDS-PAGE электрофореза теней эритроцитов, полученных при гипоксии и нормоксии, показал двухкратное увеличение содержания мембраносвязанного белка с Mw ~ 60 кДа. Изучение молекулярной природы этого белка и его роли в нарушении целостности эритроцита и выброса АТФ в условиях гипоксии является предметом наших дальнейших исследований.

ФАКТОРЫ, ОБУСЛОВЛИВАЮЩИЕ ХАРАКТЕР ПОВТОРНОГО РОСТА МИКРОТРУБОЧЕК ВЕРЕТЕНА ДЕЛЕНИЯ ПОСЛЕ ДЕПОЛИМЕРИЗАЦИИ ТУБУЛИНА У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Г.А. Павлова^{1,2}, Ю.В. Попова^{1,3}, А.Ф. Мунзарова^{1,4}, Ю.А. Галимова¹, А.В. Разуваева^{1,4}, Ф. Ренда⁵, М.П. Сомма⁵, А.В. Пиндюрин^{1,4}, М. Гатти⁵

¹Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск; ²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань;

³Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск; ⁴Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;

⁵Институт молекулярной биологии и патологии Национального исследовательского совета и Отделение биологии и биотехнологии, Римский университет Ла Сапиенца, Рим, Италия

Митотическое веретено деления – это динамичная молекулярная машина, которая состоит из микротрубочек (МТ) и ассоциированных с ними белков и необходима для расхождения сестринских хроматид к противоположным полюсам делящейся клетки. При наличии в клетке centrosом веретено деления формируется из МТ, сборка которых инициируется как около centrosом, так и возле кинетохоров – специфических структур, располагающихся на центромерах хромосом. Целью нашей работы является идентификация и характеристика генов и их белковых продуктов, вовлеченных в процесс кинетохор-зависимого роста МТ, в культивируемых клетках S2 *Drosophila melanogaster*. Наиболее перспективным способом поиска таких белков является исследование повторного роста МТ после холодовой обработки или воздействия коллемеидом. Прежде всего, мы исследовали влияние условий деполимеризации МТ на характер их повторного роста. Как и ожидалось, после обработки клеток холодом МТ повторно формируются гораздо быстрее, чем после обработки коллемеидом. Кроме того, обнаружилось, что деполимеризация МТ при -2°C нарушает кинетохор-зависимый рост МТ, но не влияет на рост МТ от centrosом. В то же время МТ одинаково хорошо растут и от centrosом, и от кинетохоров после деполимеризации МТ при 0°C . Напротив, в результате обработки коллемеидом наблюдается повторный рост МТ преимущественно от кинетохоров, а рост МТ от centrosом существенно нарушен. Данные результаты указывают на то, что кинетохор- и centrosом-зависимые способы сборки веретена деления используют, как минимум, частично различающиеся молекулярные механизмы. Для идентификации белков, вовлеченных в кинетохор-зависимое формирование МТ, мы выполняли процедуру РНК-интерференции генов-кандидатов (отобранных на основе анализа литературных данных), после чего исследовали процесс повторного роста МТ. Этот анализ выявил несколько белков, истощение которых тормозит или ускоряет изучаемый процесс. Полученные результаты расширяют знания о молекулярных механизмах кинетохор-зависимого роста МТ и позволяют построить модель регуляции этого процесса. Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации № 14.Z50.31.0005.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ КИНЕТОХОР-ЗАВИСИМОГО РОСТА МИКРОТРУБОЧЕК В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК S2 DROSOPHILA MELANOGASTER ПРИ ПОМОЩИ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

Ю.В. Попова^{1,2}, Г.А. Павлова^{1,3}, А.Ф. Мунзарова^{1,4}, А.В. Разуваева^{1,4}, Ф. Ренда⁵, М.П. Сомма⁵, А.В. Пиндюрин^{1,4}, М. Гатти⁵

¹Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск; ²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск;

³Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; ⁴Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;

⁵Институт молекулярной биологии и патологии Национального исследовательского совета и Отделение биологии и биотехнологии, Римский университет Ла Сапиенца, Рим, Италия

Кинетохор-зависимое образование микротрубочек (МТ) имеет важное значение для правильной сборки веретена деления клетки. Для понимания механизма, лежащего в основе этого процесса, мы проанализировали повторный рост МТ веретена деления после их деполимеризации в культивируемых клетках S2 *Drosophila melanogaster* при существенном снижении количества индивидуальных компонентов веретена деления. При помощи РНК-интерференции была поочередно «выключена» экспрессия десяти генов, отобранных на основе анализа литературных данных. А именно, в клетках было существенно снижено количество каждого из трех дестабилизирующих МТ кинезинов (Klp10A, Klp59C и Klp67A), двух белков, способствующих росту МТ на плюс-концах (Ebl, Mast/Orbit/Clasp), двух белков, связывающих и стабилизирующих кинетохор-ассоциированные пучки МТ (Mars/HURP и Mei-38/TPX2), двух белков, специфически связывающихся с минус-концами МТ (Asp и Patronin), и белка Dgt6, который является субъединицей комплекса augmin. Анализ повторного роста МТ в клетках, находящихся на стадии прометафазы и метафазы, показал, что истощение кинезинов не оказывает влияния на рост МТ от кинетохоров, в то время как отсутствие белков Ebl, Mast/Orbit, Mars, Mei-38 или Dgt6 нарушает этот процесс. Интересно, что истощение белков Asp или Patronin, напротив, усиливает рост МТ от кинетохоров. Общепринятая модель кинетохор-зависимого роста МТ в клетках, не подвергавшихся деполимеризации МТ, предполагает захватывание кинетохорами плюс-концов МТ, образующихся возле хромосом; полимеризация мономеров тубулина на этих плюс-концах приводит к образованию пучков МТ, минус-концы которых удаляются от хромосом. В целом полученные нами результаты согласуются с этой моделью, хотя точную роль белков Asp и Patronin в кинетохор-зависимом росте МТ еще предстоит выяснить. Выявленные факторы, необходимые для роста и стабилизации пучков кинетохор-зависимых МТ, расширяют знания о молекулярных механизмах формирования веретена деления. Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации № 14.Z50.31.0005.

СОСТОЯНИЕ БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДЕСТРУКТИВНОМ ПАНКРЕАТИТЕ НА ФОНЕ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

О.Н. Бушмина, С.А. Долгарева, Н.А. Быстрова, А.Л. Локтионов

Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Цель – изучение состояния белков и липидов мембраны эритроцитов при экспериментальном деструктивном панкреатите на фоне алкогольной интоксикации (АИ). Материал и методы исследования. Исследования на 80 здоровых крысах Вистар массой 120-160 г. АИ проводили принудительным внутрижелудочным введением 20% этанола в дозе 3 мл/кг через 24 ч в течение 30 дней. Острый деструктивный панкреатит (ОДП) вызывали на 25 день АИ перевязкой протока левой и правой долей поджелудочной железы, с последующей стимуляцией прозеринем. Эритроциты выделяли через 24 ч после последней АИ по методу E. Beutler, из которых получали мембраны методом G.T. Dodge. Электрофорез белков проводили по методу U.K. Laemmli. Липиды выделяли методом тонкослойной хроматографии. Результаты и обсуждение. В условиях ОДП установлено снижение содержания α - и β -спектрина, анкирина, анионтранспортного белка, актина, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, глутатион-S-трансферазы, моно- и диглицеридов, триглицеридов, фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилинозитола, сфингимилина и повышение уровня белков полосы 4.1 и 4.5, паллидина, дематина, тропомиозина, холестерина и его эфиров, свободных жирных кислот, лизофосфатидилхолина. При ОДП на фоне АИ по сравнению с острым панкреатитом наблюдаются однотипные, но более выраженные изменения структурно-функциональных свойств эритроцитов, а также значительное изменение соотношений различных фракций липидов и существенное снижение содержания мембранных глицерофосфолипидов и сфингомиелинов, составляющих основу двойного липидного каркаса клеточной мембраны и играющую основную роль в упорядочивании белковых макромолекул и нормальном метаболизме эритроцитов. Полученные данные свидетельствуют о значительных нарушениях в качественном и количественном отношении представителей липидного и белкового спектра мембраны эритроцитов, ответственных за структурообразование и стабилизацию мембраны эритроцитов, формообразование и гибкость мембраны, внутриклеточный метаболизм. Более значительные повреждения белково-липидного спектра мембраны эритроцитов наблюдаются при остром деструктивном панкреатите на фоне хронической алкоголизации.

КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТРОМ ДЕСТРУКТИВНОМ ПАНКРЕАТИТЕ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ЭТАНОЛОМ

А.В. Сорокин, С.А. Долгарева, Н.А. Конопля Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Цель – изучение возможностей коррекции нарушений структурно-функциональных свойств мембраны эритроцитов при экспериментальном остром деструктивном панкреатите (ОДП) на фоне хронической интоксикации этанолом (ХИЭ). Исследования проведены на крысах Вистар. ХИЭ проводили принудительным внутрижелудочным введением 20% этанола в дозе 3 мл/кг через 24 ч в течение 30 дней. ОДП вызывали на 25 день введения этанола перевязкой протока левой и правой долей поджелудочной железы, с последующей стимуляцией прозеринем. Животных делили на 5 групп по 9–10 особей в каждой: 1-я группа (контроль); 2-я группа – ОДП с ХИЭ; 3–5 группы – дополнительное введение сочетаний ридостина с рибоксином; дерината с эспа-липоном; полиоксидония с мексидолом. Препараты вводили в терапевтических дозах, начиная за 10 суток до забоя, который осуществляли через 24 ч после последнего введения этанола и препаратов. Эритроциты выделяли по методу E. Beutler, из которых получали мембраны методом G.T. Dodge. Электрофорез белков проводили по методу U.K. Laemmli. Липиды выделяли методом тонкослойной хроматографии. В условиях ОДП на фоне ХИЭ установлено снижение содержания

α - и β -спектрина, анкирина, анионтранспортного белка, актина, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, глутатион-S-трансферазы, моно- и диглицеридов, триглицеридов, фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилинозитола, сфингомиелина и повышение уровня белков полосы 4.1 и 4.5, паллидина, дематина, тропомиозина, холестерина и его эфиров, свободных жирных кислот, лизофосфатидилхолина, изменение соотношений различных фракций липидов, что свидетельствует о значительных нарушениях двойного липидного каркаса клеточной мембраны, играющего основную роль в упорядочивании белковых макромолекул и нормальном метаболизме эритроцитов. Из 30 исследованных показателей нарушениями оказались 100%. Введение ридостина и рибоксина нормализовало 16,7% и корригировало 20% показателей, более эффективным оказалось сочетание полиоксидония и мексикора, нормализуя и корригируя соответственно 26,7 и 30% нарушенных показателей структурно-функциональных свойств эритроцитов, комбинация дерината и эспа-липона выявила промежуточный эффект.

ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА С БЕЛКАМИ-ПАРТНЕРАМИ

К.В. Барина, Е.В. Шмальгаузен, В.И. Муронец

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В работе были исследовано взаимодействие альфа-синуклеина, основного компонента телец Леви, с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой. Нами было доказано, что определенные типы пост-трансляционной модификации (прежде всего, окисление цистеиновых остатков активного центра) вызывают индукцию апоптоза, а лекарственные препараты против болезни Паркинсона на основе производных депренила взаимодействуют именно с этим белком-мишенью. Кроме того, определенные ненативные формы ГАФД могут не только индуцировать апоптоз, но и связываться с амилоидогенными белками. Взаимодействие ГАФД человека, ее нативной и окисленной форм, и альфа-синуклеина изучали методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). В качестве антигенов выступали синуклеин, нативная или окисленная ГАФД. Было показано, что синуклеин безусловно взаимодействует с окисленной формой ГАФД. Сделать однозначный вывод о взаимодействии синуклеина с нативной ГАФД из этих опытов невозможно, так как для интерпретации данных необходимы антитела против нативной ГАФД, а связывание синуклеина с адсорбированной на планшете нативной ГАФД может быть объяснено изменением конформации фермента при взаимодействии со стенками лунки. Для проверки полученных данных нами были проведены эксперименты с использованием метода плазмонного резонанса. Также с помощью этого метода изучили связывание синуклеина с другим амилоидогенным белком – овечьим прионом. На чип был сначала иммобилизован рекомбинантный прион, а затем пропущен синуклеин. Показано, что образование комплекса приона с синуклеином происходит с очень высокой скоростью, причем самопроизвольно полученный комплекс практически не диссоциирует. Повышение ионной силы также не приводит к его диссоциации. Тот же чип, содержащий двойной белковый комплекс прион-синуклеин, был использован для изучения связывания синуклеина с окисленной ГАФД. По сути, такой эксперимент аналогичен популярному методу использования антител, ковалентно связанных с матрицей, для изучения взаимодействий между белками. На чип с ковалентно иммобилизованным овечьим прионом и адсорбированным на нем синуклеином наносили предварительно окисленную ГАФД. Образование комплекса окисленной ГАФД с синуклеином происходит со скоростью $1,51 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Однако полученный комплекс самопроизвольно диссоциирует.

ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДОВ-МИМЕТИКОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ *IN VITRO*

А.Д. Слободина^{1,2}, П.К. Шувалова¹, А.Л. Шварцман¹, С.В. Саранцева¹

¹НИЦ «Курчатовский институт», Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Гатчина, Россия; ²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Болезнь Альцгеймера (БА) – это нейродегенеративное заболевание позднего возраста, характеризующееся прогрессирующим нарушением памяти и когнитивных функций, развитием слабоумия, накоплением в головном мозге фибриллярных агрегатов амилоидного пептида бета, состоящего из 42 аминокислот (А β). К сожалению, на сегодняшний день отсутствуют окончательные представления об этиологии БА, процессах, лежащих в основе формирования агрегатов амилоидного пептида бета, и факторах, влияющих на их образование и разрушение. В настоящее время не существует лекарства, способного остановить или замедлить течение заболевания. Один из подходов к терапии БА направлен на поиск и разработку препаратов, предотвращающих или разрушающих А β агрегаты. Ранее при скрининге пептидных библиотек и анализе миметиков транстиретина нами были определены пептиды-миметики, блокирующие различные стадии образования амилоидных фибрилл (SH5, SH8, TTR 37-43). Однако данные пептиды не могли проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Для превращения уже найденных «ингибиторов образования амилоида» в потенциальные терапевтические мы модифицировали их, присоединив к их последовательности вектора, способные проходить через клеточные мембраны и ГЭБ. В качестве векторов были использованы короткие пептиды – домены белковой конструкции – TP2 и Arg9, а также пептид-миметик аполин-попротеина E – Cog14-10. Целью настоящего исследования было определение эффекта изучаемых составных пептидов (вектор + пептид) на агрегацию синтетического А β и оценка их способности разрушать его фибриллы *in vitro*. Для этого были использованы электронная и атомно-силовая микроскопия. Эти взаимодополняющие методы повышают объективность отбора эффективных антиамилоидных препаратов. В работе показано, что исследуемые пептиды с разной эффективностью ингибировали образование и рост амилоида. Для дальнейших экспериментов *in vivo* были отобраны пептиды с наибольшей эффективностью. *Работа поддержана грантами РФФИ № 15-29-01350 офу _м.*

АУТОИММУННАЯ ПАТОЛОГИЯ И СИСТЕМА АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОГО ГОМЕОСТАЗА

Л.А. Данилова, Л.А. Литвиненко, Н.А. Чайка, Н.П. Раменская, Е.Н. Красникова

Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Роль изменений состояния системы антиокислительного гомеостаза в формировании аутоиммунных процессов остается недостаточно изученной. Интенсификация процессов перекисидации в клетках сопровождается окислительной модификацией белков, которые приобретают антигенные свойства и способствуют развитию аутоиммунитета. Целью нашей работы явилось сравнительное исследование показателей свободнорадикального окисления (СРО) и системы антиокислительной защиты.

ты (АОЗ) крови у пациентов с аутоиммунной патологией. Обследованы дети в возрасте 4–14 лет: 99 – с сахарным диабетом I типа (СД I), 47 – с диффузным токсическим зобом (ДТЗ), 30 – с аутоиммунным тиреоидитом (АИТ), 63 ребенка с ювенильным ревматоидным (ЮРА) и хроническим артритом (ЮХА), 47 детей с псориазом, 26 – с бронхиальной астмой (БА) и 64 ребенка – контрольная группа в возрасте. Оценивались следующие показатели: продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) – конъюгированные диены и диенкетоны, малоновый диальдегид в плазме крови и эритроцитах, содержание церулоплазмينا в плазме крови, активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КТ), содержание метгемоглобина (мет-Hb) в эритроцитах. Во всех группах обследованных пациентов с аутоиммунной патологией обнаружены высокие показатели ПОЛ и увеличение уровня метгемоглобина по сравнению с данными контрольной группы. Показатели АОЗ крови при разной аутоиммунной патологии имели разнонаправленные изменения и отражали дисбаланс антиокислительного гомеостаза. У детей с СД I в дебюте, у детей с ЮРА и ЮХА, а также при псориазе наблюдалось снижение активности СОД. После лечения выявлена тенденция к повышению активности фермента. У детей с ДТЗ, АИТ и БА определялось повышение активности СОД. Колебания в активности каталазы были выражены в меньшей степени во всех группах обследованных детей. Содержание церулоплазмينا возрастало у всех детей с аутоиммунной патологией. Таким образом, исследование уровня СРО, активности антиокислительных ферментов крови у детей с аутоиммунными заболеваниями имеет большое значение для контроля эффективности лечения и обоснования применения антиоксидантов.

МЕХАНИЗМ ТРАНСПОРТА ПРОТЕАСОМ ВО ВНЕКЛЕТОЧНОЕ ПРОСТРАНСТВО

А.С. Цимоха¹, А.В. Селенина^{1,2}

¹Институт цитологии РАН; ²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Убиквитин-протеасомная система отвечает за большую часть регулируемого протеолиза в клетке. Протеасомы находятся не только в клетке, но и во внеклеточном пространстве. Показано, что протеасомы присутствуют в плазме крови, в альвеолярном секрете, спинномозговой жидкости. Биологические функции внеклеточных протеасом в настоящее время не ясны, однако, обнаружено, что у пациентов, страдающих от аутоиммунных заболеваний, злокачественных новообразований, сепсиса или травмы, концентрация внеклеточных протеасом в крови повышается, что имеет диагностическое и прогностическое значение. Важным шагом в понимании функции и механизмов транспорта протеасом во внеклеточное пространство является определение особенностей их субъединичного состава. Мы показали, что внеклеточная популяция протеасом представлена в основном свободными каталитически активными 20S протеасомами, что свидетельствует о том, что, во-первых, клеточная гибель не является причиной их появления во внеклеточном пространстве и, во-вторых, функционирование внеклеточных протеасом никак не связано с убиквитин-зависимой системой. Согласно современным представлениям протеасомы не являются классическими секретируемыми белками, и возникает вопрос, каким образом протеасомы выходят во внеклеточное пространство. Нами было установлено, что протеасомы находятся во внеклеточном пространстве в составе экзосом (экзосом и микрочастиц), с помощью которых, по всей видимости, клетка осуществляет транспорт протеасом во внеклеточное пространство. *Работа поддержана грантом Российского научного фонда (16-14-10343).*

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ БЕЛКОВ, ЛИПИДОВ И АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В М. SOLEUS КРЫС ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОЙ ИНТЕНСИВНОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ

Л.А. Данилова, Н.А. Чайка, Е.Н. Красникова, О.Б. Башарина

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Интенсивные физические нагрузки (ИФН) изменяют окислительную модификацию белков и липидов мембран миоцитов, что приводит к нарушению проницаемости и их целостности. Цель настоящего исследования заключалась в изучении параметров перекисного окисления белков (ПОБ), липидов (ПОЛ) и активности ферментов антиоксидантной защиты (АОЗ) в *m. soleus* у нетренированных крыс после ИФН. Эксперимент проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 200–220 г, которые были разделены на две группы: 1 – животные (n=14) контрольной группы, 2 – животные (n=52), которые выполняли однократную ИФН до отказа, заключающуюся в плавании с дополнительным грузом, составляющим 8% массы тела, в течение 1 мин с периодами отдыха – 1,5 мин. По окончании эксперимента в гомогенатах *m. soleus* оценивали: интенсивность ПОБ по уровню карбонильных производных (КП), интенсивность ПОЛ – по уровню малонового диальдегида (МДА), состояние АОЗ – по активности супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГП). Исследования проводили сразу после ИФН и через 2, 12, 24, 48, 72, 96, 120 ч отдыха. Результаты эксперимента показывают волнообразный характер динамики всех исследованных показателей. Отмечалось трехкратное повышение уровня КП через 2 ч и повторное (на 53%) – через 72 ч после ИФН. Повышению уровня КП в течение всего периода отдыха предшествовало увеличение продуктов ПОЛ – концентрация МДА была выше на 41%, 46% и 12%, сразу после ИФН, через 12 ч и 48 ч отдыха, соответственно. Отмечалось снижение активности СОД и ГП на 20–40% сразу после ИФН, повышение в 3,4 раза через 2 ч, в дальнейшем активность обоих ферментов имела тенденцию к снижению, но оставалась на достоверно высоком уровне в течение 12–96 ч для СОД и 12–24 ч для ГП. Таким образом, ИФН приводят к увеличению катаболизма белков и липидов, связанных с их окислительной модификацией и стимулируют процессы репарации миоцитов, что отражается в фазовом характере динамики показателей про/антиоксидантной системы, как результата реализации адапционных механизмов организма к физиологическому стрессу.

ВЫЯВЛЕНИЕ ХИМЕРНОГО АЛЬБУМИНОПОДОБНОГО БЕЛКА В ТКАНЯХ ПРОСТАТЫ ЧЕЛОВЕКА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОГО МАРКЕРА АТИПИЧНОЙ МЕЛКОАЦИНАРНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ

М.А. Ковалева¹, Л.С. Еремина^{1,2}, К.В. Лисицкая¹, И.А. Каменихина², Л.И. Ковалев¹, С.С. Шишкин^{1,2}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²Медицинский институт, Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Атипичная мелкоацинарная пролиферация рассматривается как дискуссионная стадия перерождения аденомы простаты в рак [Warlick S. et al. 2015]. При исследовании биопсийных образцов, взятых от пациентов с доброкачественными и злокачественными опухолями простаты, протеомными технологиями в 8 случаях был выявлен и идентифицирован масс-

спектрометрическими методами новый химерный альбуминоподобный белок, присутствующий в значительном количестве. Во всех этих случаях на гистологическом уровне у пациентов обнаруживалось в образцах наличие очагов атипичной мелкоацинарной пролиферации. По результатам идентификации указанного белка с помощью времяпролетной и tandemной масс-спектрометрии построена его аминокислотная последовательность, которая отличается от всех известных продуктов гена альбумина, в том числе и от обнаруженных ранее химерных альбуминоподобных белков, появляющихся на терминальных стадиях различных видов патологии урогенитального тракта. Возможный механизм появления выявленного нового белка – изменение соотношения протеазы / ингибиторы протеаз. В пользу этого предположения свидетельствует найденное при протеомном изучении белков клеточных линий, моделирующих аденому (BPH) и рак простаты (LNCaP, PC3, DU145), резкое уменьшение количества ингибитора сериновых протеаз серпина H1 (до 20-тикратного) и серпина B5 (5-тикратное). Поскольку для белковых продуктов гена альбумина известны варианты, являющиеся также носителями антиапоптотических лигандов, можно думать, что и выявленный белок, представляет существенный интерес, как потенциальный участник процесса малигнизации.

1. Warlick C. et al.// Prostate Cancer Prostatic Dis. 2015. 18(3). P.255-9.

ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОБМЕНА БИОПОЛИМЕРОВ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИИ КРЫС

И.В. Вольхина, Н.Г. Наумова

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Основными биохимическими показателями стресса являются повышение уровня глюкокортикоидов в крови, гипертрофия коркового вещества надпочечников и деструктивные повреждения слизистой оболочки желудка. В литературе имеются данные относительно индивидуальных особенностей организмов в их различных реакциях на стресс. Нами исследовано состояние обмена биополимеров соединительной ткани в плазме крови, стенках желудка и тонкой кишки у крыс с эрозивно-язвенными повреждениями слизистой желудка, а также у животных без повреждений в условиях иммобилизационного стресса в течение 8 дней. Показано, что иммобилизационный стресс вызывал у экспериментальных животных активацию катаболических процессов обмена коллагена и сиалогликопротеинов с максимумом на 3-й день опытов, что подтверждается наибольшим количеством эрозивно-язвенных повреждений слизистой желудка у экспериментальных крыс. У животных с эрозивно-язвенными поражениями стенки желудка все изменения исследуемых показателей обмена биополимеров соединительной ткани в плазме крови, стенках желудка и тонкой кишки были более выражены, чем у крыс без повреждений. Степень увеличения содержания свободного гидроксипролина и свободных сиаловых кислот, а также степень уменьшения концентрации белоксвязанного гидроксипролина и белоксвязанных сиаловых кислот в стенке тонкой кишки отражали интенсивность стрессогенных воздействий и активность процессов катаболизма биополимеров соединительной ткани. Изменения содержания свободного гидроксипролина в плазме крови и стенке желудка у крыс обеих групп коррелировали с изменениями соотношений массы надпочечников к массе тела животных. Степень изменений изучаемых показателей обмена коллагена в стенке желудка была меньше, чем у показателей обмена сиалосодержащих соединений в этих же тканях. Таким образом, наблюдались существенные различия в изменениях показателей обмена биополимеров соединительной ткани при иммобилизации крыс с различной реакцией на стресс.

СОВРЕМЕННАЯ КОНЦЕПЦИЯ О БИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ ДЕФЕНСИНОВ КАК ЭНДОГЕННЫХ ПЕПТИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ

В.Н. Кокряков^{1,2}, Г.М. Алешина¹, М.Н. Берлов^{1,2}, Е.В. Цветкова^{1,2}, Л.Е. Леонова², И.А. Янкелевич¹, Е.С. Умнякова¹, А.А. Колобов², Д.С. Орлов^{1,2}, О.В. Шамова^{1,2}, Т.В. Овчинникова³

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; ²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург; ³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Дефенсины – цистин-содержащие поликатионные пептиды, представленные практически во всех таксонах домена Eukaryota, основная биологическая функция которых заключается в обеспечении противомикробной защиты живых организмов. Дефенсины как эндогенные пептидные антибиотики животного, растительного и грибкового происхождения характеризуются широким спектром антимикробной активности. Основными мишенями их действия в микробных клетках являются цитоплазматическая мембрана и сопряженные с ней процессы окислительного фосфорилирования, а также аппараты репликации, транскрипции, трансляции и биосинтеза клеточной стенки. Нами впервые были описаны по структурно-функциональным свойствам β-дефенсины лейкоцитов крови кур и болотной черепахи, а также α- и θ-дефенсины макака-резуса и гамадрила, что подтвердило стереотипность структурной организации молекул дефенсинового суперсемейства, определяющую эффективность их антимикробного действия. Наряду с антибиотическим действием для многих изоформ дефенсинов описаны иммунорегуляторные свойства: хемокиновая активность в отношении клеток иммунной системы, опсонизирующая, стимулирующая дегрануляцию тучных клеток и проадреналиновая активности, способность взаимодействовать с системой комплемента. Необходимо подчеркнуть, что, в отличие от антимикробной активности, значительная часть перечисленных функциональных проявлений дефенсинов основана на лиганд-рецепторных взаимодействиях, преимущественно с участием рецепторов серпантинного типа, сопряженных с G-белками (рецепторы хемокинов, меланокортиновые рецепторы). Нами впервые было установлено, что через рецептор адренокортикотропного гормона в клетках коркового слоя надпочечников реализуется способность дефенсинов подавлять продукцию глюкокортикоидов, получившая в литературе название кортикостатической. Таким образом, представление о дефенсинах как ведущих молекулярных противомикробных факторах развилось в настоящее время в концепцию об эндогенных физиологически активных пептидах, наряду с антибиотической, широким спектром биологической активности, важной в реализации и регуляции врожденных и адаптивных иммунных реакций при фагоцитозе, воспалении и стрессе. *Работа поддержана грантом ФЦП. Соглашение с Минобрнауки России №14.604.21.0104 от 05.08.2014 г. RFMEFI60414X0104.*

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА В НЕЙТРОФИЛАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

И.В. Елистратова¹, С.Г. Морозов²

¹Главный военный клинический госпиталь внутренних войск МВД России; ²ФГБУ «НИИОПП» РАН, Москва, Россия

Белки теплового шока (heat shock proteins, HSP) – это гетерогенная группа белков, имеющих принципиально сходные функции, главная из которых – защита клетки в условиях стресса. В настоящее время HSP классифицируются согласно их молекулярной массе. В данной работе исследованы HSP90, HSP70 и HSP60 как наиболее важные регуляторы сигнальных путей стресса. Атопический дерматит (АД) – это хроническое воспалительное заболевание кожи, в патогенезе которого играют роль генетические факторы и внешние воздействия. Экспрессия HSP была изучена на нейтрофилах, выделенных из периферической крови больных АД (265 мужчин в возрасте от 18 до 38 лет) и 128 здоровых мужчин (от 18 до 34 лет). Индекс SCORAD больных – от 14 до 45. Исследование крови проводили однократно в первый день обращения к врачу. Популяцию нейтрофилов выделяли из периферической крови на градиенте плотности Перколла (Sigma). Клетки окрашивали моноклональными антителами к соответствующим белкам, интенсивность флуоресценции HSP определяли на плазматической мембране и в цитозоле нейтрофилов, измеряли на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, USA). Статистический анализ полученных данных проводили по программе ANOVA с использованием непараметрического анализа Ньюмена-Кейлса, при котором $p < 0,05$ даёт как статистически значимое различие между группами. Уровень экспрессии всех исследованных HSP на мембране нейтрофилов и в цитозоле имел бимодальный характер. В начале стадии обострения АД была выражена тенденция к повышению всех исследованных HSP, затем уровень их экспрессии снижался. Максимальное повышение уровня HSP регистрировалось в разгар острой стадии заболевания. При наличии сопутствующей контаминации кожи бактериальной или грибковой инфекцией уровень экспрессии HSP60 и HSP90 на мембране нейтрофилов и в цитозоле был достоверно выше по сравнению с показателями больных АД, у которых посев смывов с кожи не давал роста Грам-негативных бактерий или микофлоры. Наиболее значимое повышение экспрессии на мембране нейтрофилов больных АД выявлено для HSP90 и HSP60, тогда как уровень изменения экспрессии HSP70 носил, скорее, неспецифический характер. Выводы. Изменение экспрессии HSP60 и HSP90 на нейтрофилах крови может служить маркером интенсивности воспалительного процесса в коже при атопическом дерматите.

МАЛЫЕ МОЛЕКУЛЫ, ПОДАВЛЯЮЩИЕ ФУНКЦИЮ ШАПЕРОНА БТШ70, КАК СРЕДСТВА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

В.Ф. Лазарев, Д.В. Сверчинский, С.А. Нисканен, Е.Р. Михайлова, И.В. Гужова, Б.А. Маргулис

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Шаперон БТШ70 выполняет защитную функцию в раковых клетках различного происхождения, становясь тем самым важной мишенью для терапевтических препаратов. Часть таких соединений снижают экспрессию генов белков теплового шока (БТШ), в том числе БТШ70, другие направлены на подавление шаперонной активности БТШ70, его способности узнавать денатурированный белок-субстрат и возвращать ему активную конформацию. У клеток, в которых подавлена функция БТШ70, снижаются темпы роста, нарушается подвижность и в целом наблюдается утрата опухолевого фенотипа. С целью поиска шаперонных ингибиторов нами были созданы 2 тест-системы, и с их помощью проведен скрининг соединений из коллекции InterBioScreen (Черноголовка, Моск. обл.). В числе ингибиторов оказалась N-амино-этильная производная колхицина (АЭК), токсичность которой на 2–3 порядка ниже последнего. Скринингу была также подвергнута библиотека пептидных фрагментов БТШ70 (91 15-мерных пептидов, BioSynthesis, USA) и выявлен пептид, также способный снижать шаперонную активность белка, Incyt2. По данным тестов DARTS и дифференциальной калориметрии АЭК и Incyt2 связываются с БТШ70 и снижают его шаперонную активность *in vitro*. При совместном использовании с коммерческим препаратом доксорубин АЭК и Incyt2 усиливают противоопухолевую активность лекарства в клеточной модели меланомы мыши В16. Таким образом, нами продемонстрирована эффективность нового метода высокопроизводительного скрининга соединений, способных снижать шаперонную активность белка БТШ70. Два препарата, производная колхицина и пептидный фрагмент БТШ70, выявленные в скрининге, демонстрируют выраженную противоопухолевую активность в комбинации с коммерческим препаратом доксорубин и могут стать новыми противоопухолевыми препаратами широкого спектра действия. Работа поддержана грантом РНФ № 14-50-00068.

ПОИСК КЛЕТОЧНЫХ МИШЕНЕЙ ДЛЯ БЛОКИРОВАНИЯ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА ГЕПАТИТА «С»

М.В. Козлов, А.А. Клейменова, К.А. Кондукторов, А.З. Маликова, К.А. Камарова, С.Н. Кочетков

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Ароматические гидроксамовые кислоты (АГК) селективно подавляют размножение полноразмерного репликона вируса гепатита С (ВГС) в культуре гепатоцитов человека. Активность соединений данного класса определяется хелатирующей способностью гидроксамового остатка, но не связана с ингибированием металлосодержащих вирусных ферментов. Примечательно, что АГК не влияют на размножение вируса полиомиелита, что указывает на их специфическое анти-ВГС действие.

В качестве терапевтической мишени для пара-замещенных бензогидроксамовых кислот (п-БГК) идентифицирована гистондеацетилаза 6 (HDAC6), локализованная большей частью в цитоплазме и ассоциированная с тубулиновым цитоскелетом. Подавление деацетилирующей активности HDAC6 с помощью п-БГК приводит к гиперацетилированию α -тубулина, которое достоверно коррелирует с падением концентрации вирусной РНК ($r = -0,83$). Использование селективного ингибитора HDAC6 – тубастатина А – дает такой же результат, с той лишь разницей, что наблюдается полное совпадение концентрационной зависимости для обоих процессов. Однако, зависит ли функционирование репликона ВГС от ацетилирования микротрубочек или каких-то других белков-субстратов HDAC6 – остается невыясненным.

Ответ на этот вопрос может дать изучение другого блокатора репликации ВГС – коричной гидроксамовой кислоты (КГК). Данная кислота, являясь заведомым ингибитором HDAC6 при тестировании *in vitro*, не подавляет деацетилирование α -тубулина в гепатоцитах, но вызывает накопление ацетилированной формы кортактина – другого белка-субстрата HDAC6. Таким образом, ацетилирование микротрубочек не является обязательным условием анти-ВГС активности АГК.

Интересно, что кроме α -тубулина и кортактина HDAC6 контролирует уровень ацетилирования, а вместе с ним и активность шаперона Hsp90, существенного для стабилизации вирусного белка NS3. Весьма вероятно, что действуя по всем перечисленным направлениям одновременно, HDAC6 способна контролировать размножение ВГС.

ИНГИБИТОРЫ ФЕРМЕНТА РЕПАРАЦИИ ДНК ТИРОЗИЛ-ДНК-ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ 1 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ

А.Л. Захаренко, К.П. Волчо, О.А. Лузина, Т.М. Хоменко, Е.В. Суслов, О.Д. Захарова, Й. Рейниссон, Н.Ф. Салахутдинов, О.И. Лаврик
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (TDP1) – перспективная мишень для противораковой терапии, основанной на повреждении опухолевой ДНК, вызванном ингибиторами топоизомеразы 1 (Top1) [1]. TDP1 играет ведущую роль в репарации ковалентных комплексов Top1-DNA, образовавшихся под воздействием ингибиторов Top1, таких как клинические производные камптотецина [1]. Многочисленные данные свидетельствуют, что ингибирование TDP1 может усилить терапевтический эффект ингибиторов Top1 [2]. Нами был синтезирован и протестирован ряд новых типов ингибиторов TDP1, относящихся к разным химическим классам. Соединения класса бензопентатиепинов ингибируют TDP1 в диапазоне концентраций от 0,2 до 6,0 μM . Исследование цитотоксичности этих соединений показало, что они обладают умеренной токсичностью и вызывают апоптотическую гибель клеток линий MCF-7 и Hep G2 [3]. Другой класс ингибиторов TDP1, диазаадамантаны, оказались менее эффективны в отношении очищенного фермента (IC_{50} около 15 μM) [4], но соединения этого класса не токсичны в отношении опухолевых клеток в концентрациях до 100 μM . Отсутствие собственной цитотоксичности является важным преимуществом при совместном использовании соединений с ингибиторами Top1. Производные 7-гидроксикумарина оказались также достаточно эффективными ингибиторами TDP1 с величинами IC_{50} около 1 μM . Эти соединения нетоксичны в отношении клеток MCF-7 ($\text{CC}_{50} > 100 \mu\text{M}$), и оказались способны в концентрации 5 μM усиливать цитотоксичность камптотецина в отношении опухолевых клеток до 10 раз. Ингибирующую активность в диапазоне концентраций от 1 до 15 μM проявили также производные природного соединения усниновой кислоты (УК). Обнаружено, что структурные модификации УК введением цианогрупп приводят как к усилению воздействия на очищенный фермент, так и к снижению цитотоксичности. Таким образом, разработаны ингибиторы TDP1, перспективные для усиления эффективности противораковой терапии, основанной на клинических ингибиторах Top1. Проект поддержан грантом РНФ 16-13-10074.

1. E.Q. Comeaux and R.C. van Waardenburg. Drug Metab. Rev. 2014, 46, 494-507.
2. Y. Pommier et al., Chem. Biol. 2010, 17, 421-433.
3. A. Zakharenko et al., Bioorg. Med. Chem. 2015, 23, 2044-2052.
4. А.Л.Захаренко и др., Биоорг. хим. 2015, 41, 731-736.

РАЗРАБОТКА НОВЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ, НАРУШАЮЩИХ СТРУКТУРУ БАКТЕРИАЛЬНОГО НУКЛЕОИДА

Д.А. Корженевский¹, Д.А. Алтухов¹, Ю.К. Агапова¹, А.В. Власкина¹, В.И. Тимофеев¹, Т.В. Ракитина^{1,2}

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Способность бактериальных патогенов приобретать устойчивость к существующим антибиотикам диктует необходимость разработки нового поколения терапевтических субстанций, направленных на новые мишени, например, на белки, ассоциированные с бактериальным нуклеотидом (NAPs), которые регулируют архитектуру и функционирование бактериального генома. Анализ белков, входящих в семейство NAPs, показал, что наиболее перспективными в качестве фармакологических мишеней являются гистонподобные HU белки, т. к. они присутствуют во всех бактериях и не имеют гомологов у высших эукариот, а нокаут их генов приводит к существенному подавлению роста бактерии или её гибели. HU-белки весьма консервативны, поэтому ингибиторы, смоделированные на основании пространственной структуры одного белка, будут активны в отношении всего класса. Ранее методом молекулярного докинга мы выявили ряд потенциальных ингибиторов ДНК-связывающей активности HU белка микоплазмы *S. melliferum*, для трех из которых ингибирование удалось подтвердить методом торможения в геле (EMSA) [1].

Тестирование полученных соединений на способность ингибировать активность HU-белков из ряда бактерий показало, что они ингибируют образование комплексов HU белок-ДНК с IC_{50} 2,5–40 мкМ. Константы связывания наиболее активного соединения с модельными HU-белками, определённые методом изотермальной титрующей калориметрии (ИТС) были сопоставимы с константами связывания HU белков с дцДНК. Данное соединение также ингибировало рост микоплазмы *S. melliferum* и *M. gallisepticum* концентрационно-зависимым образом с IC_{50} , лежащими в диапазоне от 65 мкМ (2 часа обработки) до 20 мкМ (12 часов обработки). В настоящий момент методами РСА и ЯМР-спектроскопии [2] проводятся структурные исследования комплекса HU белок-ингибитор с целью оптимизации последнего. Оптимизированный ингибитор станет основой для создания антибактериального средства, эффективного в отношении микроорганизмов, устойчивых к традиционной антибактериальной терапии. Данная работа проводится при поддержке РНФ, соглашение № 15-14-00063.

1. K. Boyko, et al. FEBS J. 282 s. 1 (2015) p.388
2. Д.А. Алтухов, и др. ВМГУ Сер. 2. ХИМИЯ 57 (2016) с.226

ВЛИЯНИЕ УБАИНА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА КОРРЕЛИРУЕТ С ИЗМЕНЕНИЕМ АКТИВНОСТИ Na^+ , K^+ -АТРАЗЫ И СООТНОШЕНИЕМ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ Na^+ И K^+

А.М. Тверской, С.В. Сидоренко, Е.А. Климанова, О.А. Акимова, Л.В. Смольянинова, О.Д. Лопина, С.Н. Орлов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Наряду с ингибированием Na^+ , K^+ -АТРАЗы, убаин и другие кардиотонические стероиды (КТС) могут влиять на функции клеток независимо от их воздействия на внутриклеточное соотношение Na^+ и K^+ ($[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$). В этой связи мы сравнили концентрационную и временную зависимость действия убаина на соотношение $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$, активность Na^+ , K^+ -АТРАЗы и пролиферацию клеток эндотелия из пупочной вены человека (HUVCE). Воздействие 1–3 нМ убаина в течение 24–72 ч при-

водит к снижению соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ и увеличению пролиферации клеток на 20–50%. Мы обнаружили, что в этом диапазоне концентраций убаин увеличивает на 25–30% активность Na^+, K^+ -АТФазы, измеренную как скорость входа $^{86}Rb^+$. Кроме того, мы наблюдали прирост активности АТФазы на 15–20% при добавлении убаина в концентрациях от 1 до 10 нМ к микросомам, изолированным из почек свиньи. Добавление убаина в более высоких концентрациях ингибирует Na^+, K^+ -АТФазу, увеличивает соотношение $[Na^+]_i/[K^+]_i$, подавляет рост и вызывает гибель клеток. Мы обнаружили отрицательную корреляцию между соотношением $[Na^+]_i/[K^+]_i$ и активацией роста клеток, обработанных низкими дозами убаина в течение 48 или 72 ч, и положительную корреляцию этого соотношения с ингибированием пролиферации клеток, обработанных в течение 24 ч высокими дозами убаина. Полученные данные показывают, что ингибирование пролиферации HUVES при действии высоких доз КТС коррелирует с диссипацией градиентов Na^+ и K^+ , в то время как активация роста клеток, отмеченная при действии низких доз КТС, вызвана активацией Na^+, K^+ -АТФазы и уменьшением $[Na^+]_i/[K^+]_i$.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР Oct-1 СТИМУЛИРУЕТ СЕКРЕЦИЮ РАКОВЫМИ КЛЕТКАМИ БЕЛКА S100A4

Т.Н. Порцева, Е.В. Панкратова, Е.А. Духанина, А.Г. Степченко, С.Г. Георгиева

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Фактор транскрипции Oct-1 принадлежит семейству белков, содержащих высококонсервативный ДНК-связывающий ROU-домен. Oct-1 участвует в регуляции экспрессии генов «домашнего хозяйства» клетки и играет роль в регуляции транскрипции многих тканеспецифических генов. Недавно было показано, что высокий уровень белка Oct-1 в клетках опухоли является крайне неблагоприятным прогностическим признаком. Уровень белка Oct-1 имеет даже большее прогностическое значение, чем определение стадии (I–IV) заболевания. Одним из маркеров опухолевых клеток также является метастазин (Mts1/S100A4). В целом ряде работ показана прямая связь повышения секреции белка Mts1 с метастатическим потенциалом опухоли. Таким образом, изучение механизмов регуляции экспрессии и секреции Mts1/S100A4 в опухолях является важной задачей современной биологии. В этой работе мы изучали влияние гиперэкспрессии изоформ белка Oct-1A, Oct-1L, Oct-1X на экспрессию и секрецию метастазина Mts1. Нами были охарактеризованы различные культуры опухолевых клеток человека по уровню экспрессии Oct1 и S100a4 и определен уровень секреции исследуемыми клетками Mts1/S100a4 в культуральную среду. Для того, чтобы определить является ли транскрипционный фактор Oct-1 одним из факторов, регулирующих секрецию Mts1, клетки линии HeLa были стабильно трансфицированы конструкциями, экспрессирующими различные изоформы Oct-1: Oct-1A, Oct-1L и Oct-1X. Было определено содержание S100A4 в кондиционной среде клеток HeLa стабильно экспрессирующих изоформы Oct-1A, Oct-1L и Oct-1X с эпитопом 3xFLAG на C-конце. Во всех случаях при гиперэкспрессии изоформ Oct-1 в клетках HeLa мы обнаружили значительное увеличение секреции S100A4 в кондиционную среду. В настоящее время очень мало данных о молекулярных механизмах опухолевого эффекта Oct-1. Из результатов нашей работы следует, что высокий уровень Oct-1 в опухоли вызывает повышение секреции белка метастазина опухолевыми клетками и, возможно эта функция Oct-1 определяет высокий метастатический потенциал и неблагоприятный прогноз развития опухоли. Работа поддержана Российским научным фондом (грант №14-15-01032).

АГРЕГАЦИЯ БЕЛКОВ ХРУСТАЛИКА В РЕЗУЛЬТАТЕ СЕНСИБИЛИЗИРОВАННОГО ФОТОЛИЗА В АНАЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ

Е.Д. Сормачева¹, П.С. Шерин^{1,2}, Е.А. Зеленцова^{1,2}, Т.Г. Дужак^{1,2}, Ю.П. Центалович^{1,2}

¹Институт «Международный томографический центр» СО РАН; ²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

α -, β - и γ -кристаллины – основные белки хрусталика, которые за время жизни индивида не обновляются и с возрастом накапливают пост-трансляционные модификации. Ряд модификаций возникает под действием УФ излучения солнца. Показано, что оно может поглощаться как белками напрямую, так и молекулами с малым молекулярным весом – кинуренинами. Известно, что фотовозбужденные триплетные состояния могут реагировать с кристаллинами и приводить к их модификации, с последующей агрегацией и, как следствием, развитием катаракты. Целями данной работы являлись: (1) изучение реакций тушения триплетного состояния одного из продуктов распада кинуренина, кинуреновой кислоты (КНК), белками хрусталика; (2) анализ модификаций белков, образующихся в результате фотоиндуцированных реакций. Было установлено, что тушение триплетного состояния КНК α - и β -кристаллином происходит в результате реакций с аминокислотными остатками триптофана и тирозина с константами скорости $(9,4 \pm 0,9) \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ и $(6,0 \pm 0,2) \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$, соответственно. В случае с γ -кристаллином тушение происходит в результате реакций с остатками тирозина. Фотолиз кристаллинов в присутствии КНК приводит к образованию высокомолекулярных агрегатов. Для всех исследуемых систем было обнаружено образование новой полосы поглощения с максимумом на 325 нм. Масс-спектрометрический анализ показал монотонную гибель кристаллинов, деградацию триптофановых и тирозиновых остатков, окисление остатков триптофана и тирозина, а также образование модификации -2 Да на остатках триптофана. Полученные результаты показывают, что сенсibilизированный КНК фотолиз приводит к агрегации кристаллинов, однако имеют место существенные отличия между α -кристаллином и группой β - и γ -кристаллинов. Это, по-видимому, обусловлено существенной разницей в структуре этих белков. Авторы работы выражают благодарность РФФИ (проекты 14-03-00027 и 16-33-00669) за финансовую поддержку. Научные руководители – д-р. хим. наук Ю.П. Центалович, канд. физ.-мат. наук П.С. Шерин.

БЕЛКИ АНТИОКСИДАНТЫ – МИШЕНИ ДЛЯ ДЕЙСТВИЯ КСЕНОБИОТИКОВ

Н.А. Терехина, Г.А. Терехин, А.Г. Орбиданс, Е.В. Жидко *Пермский государственный медицинский университет им. Е.А. Вагнера, Пермская государственная фармацевтическая академия, Пермь, Россия*

Показатели антиоксидантной защиты являются чувствительными к действию ксенобиотиков. Цель работы – оценить влияние карбофоса и этанола на показатели антиоксидантной защиты в эритроцитах и плазме крови крыс. Острое отравление вызывали внутрижелудочным введением карбофоса в дозе 0,75 LD₅₀. Острую интоксикацию этанолом моделировали на интактных животных и на фоне предварительной алкоголизации. Острое отравление вызывали внутрижелудочным введением 40% раствора этанола в дозе 0,5 LD₅₀. Предварительную алкоголизацию крыс проводили в течение месяца путем ежедневного внутрижелудочного введения этанола в дозе 1/3 LD₅₀. Сорбенты (полисорб, литовит, сапропель) вводили в дозе

3000 мг/кг через 30 минут после введения ксенобиотика. В плазме крови 173 крыс определяли содержание церулоплазмينا по методу В.С. Камышников (2003), трансферрина по Dati F. et al. (1996), в эритроцитах крови определяли содержание восстановленного глутатиона по методу Beutler E. (1990) и проницаемость эритроцитарных мембран по методу В.Н. Колмакова (1982). Об усилении процессов свободнорадикального окисления при остром отравлении карбофосом свидетельствует интенсификация хемилюминесценции в плазме и эритроцитах крови. На фоне лечебного введения сорбентов показатели хемилюминесценции нормализуются. Не установлено достоверных изменений интенсивности хемилюминесценции плазмы крови при остром отравлении крыс этанолом. Проницаемость эритроцитарных мембран уменьшается при острой интоксикации этанолом, увеличивается при отравлении карбофосом, нормализуется при лечении сорбентами. Содержание церулоплазмينا в плазме крови при остром отравлении карбофосом уменьшается в 2 раза по сравнению с контролем. При остром отравлении этанолом в крови животных увеличивается содержание антиоксидантов церулоплазмينا и глутатиона. На фоне предварительной алкоголизации остается повышенным уровень церулоплазмينا, снижается содержание глутатиона и трансферрина. Введение сорбентов при остром отравлении этанолом способствует нормализации содержания церулоплазмينا. При остром отравлении этанолом на фоне предварительной алкоголизации выявлено корректирующее влияние сорбентов на показатели антиоксидантной защиты организма. Экспериментально обосновано использование сорбентов при острых отравлениях этанолом.

SLOW-BINDING INHIBITORS OF ACETYLCHOLINESTERASE WITH LONG TARGET RESIDENCE TIME AND REBINDING AS LONG-LASTING ACTION DRUGS AGAINST NEUROLOGICAL DISEASES

Patrick Masson¹, Konstantin Petrov^{1,2}, Sofya Lushchekina^{2,3}, Irina Zueva², Alexandra Kharlamova², Evgeniy Nikolsky^{1,4,5}

¹Kazan Federal University, Neuropharmacology Lab., Kazan; ²A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry of Russian Academy of Sciences, Kazan; ³N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences, Moscow; ⁴Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Russian Academy of Sciences, Kazan; ⁵Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Slow-binding inhibitors present considerable advantages over classical reversible inhibitors in pharmacology [1]. Human acetylcholinesterase (AChE) is slowly and reversibly inhibited by C-547, an alkyl ammonium derivative of 6-methyl uracil. Kinetic analysis showed that slow-binding inhibition is of type B: after fast formation of initial enzyme-inhibitor complex ($K_i=140$ pM), a slow induced-fit step allows establishment of the final complex ($K_i^*=22$ pM). Slow $k_{off}=0.05$ min⁻¹ makes a long residence time on target, $\tau=20$ min. On the other hand, human butyrylcholinesterase (BChE) is reversibly inhibited in a fast-binding process of mixed-type ($K_i=1.77$ μ M; $K_i^*=3.17$ μ M). The selectivity ratio of inhibition, AChE/BChE, is higher than 10,000. Crystal structure and molecular dynamics simulations of binding/dissociation processes of C-547 and a non-charged analogue with both cholinesterases showed that the slow-binding step on AChE results from enzyme conformational change that allows C-547 to cross the bottleneck in the active site gorge of the enzyme. This step is followed by formation of tight complex at the bottom of the gorge [2].

Pharmacokinetics (PK) of C-547, intravenously injected (0.05 mg/kg) into rat was studied using non-compartmental and compartmental analyses. PK was described using a 3-compartment model (rapid distribution in blood, distribution in tissues, elimination). The steady-state volume of distribution is very large (3800 ml/kg), 15 times higher than V_0 , indicating a very good tissue distribution. MRT= 3 hrs, and C-547 is slowly eliminated ($k_{el}=0.17$ hr⁻¹; $t_{1/2}=4$ hrs) from the bloodstream. However, it takes about 10 hrs following drug administration for recovering 100% of red blood cell AChE activity.

Effect of C-457 on whole animal model of *myasthenia gravis* persists for more than 24h, even though the drug is not analytically detectable in the blood. A PK/PD model was built to account for such a pharmacodynamical (PD) effect. Long-lasting effect results from micro-PD mechanisms: the slow-binding nature of inhibition, high affinity of C-547 for AChE and long residence time on target at neuromuscular junction (NMJ): $\tau=1/k_{off}$. In addition, NMJ spatial constraints i.e. high concentration of target (AChE) in a small volume, and slow diffusion rate (k_{out}) of free C-547 out of NMJ, make possible effective rebinding of ligand. Thus, compared to other cholinesterase inhibitors used for palliative treatment of *myasthenia gravis*, C-547 is very affine for AChE, is the most selective drug, displays a slow pharmacokinetics, and has the longer duration of action. This makes C-547 a promising drug leader for treatment of *myasthenia gravis*, and constitutes a template for development of other drugs against neurological diseases and for neuroprotection.

[1] Masson, P. and Lushchekina, S. (2016) Slow-binding inhibition of cholinesterases, pharmacological and toxicological relevance. *Arch. Biochem. Biophys.* **593**, 60-68.

[2] A.D. Kharlamova, S.V. Lushchekina, K.A. Petrov, E.D. Kots, F. Nachon, M. Villard-Wandhammer, I.V. Zueva, E. Krejci, V.S. Reznik, V.V. Zobov, E. E. Nikolsky, and P. Masson (2016) Slow-binding inhibition of acetylcholinesterase by a 6-methyluracil alkyl-ammonium derivative: mechanism and advantages for *myasthenia gravis* treatment. *Biochem. J.* **473**, 1225-1236.

АВТОМАТИЧЕСКИЙ КМ/ММ ПОДХОД ДЛЯ ПОИСКА ЭФФЕКТИВНЫХ МУТАНТОВ АБЗИМОВ

А.В. Головин, О.И. Золотарева, А.О. Маслова

Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Методы компьютерного анализа позволяют предположить вероятные пути прохождения реакций и конформационной динамики белков во время каталитического акта. Применение современных точных методов квантовой химии ограничено вычислительной мощностью современных суперкомпьютеров. Такие методы обладают важной составляющей, это наблюдение за эволюцией системы во времени без наложения ограничений на ожидаемый результат. Использование алгоритмов термостата со стохастической компонентой приводит к недетерминистическому моделированию выбранной системы, что расширяет область конформационного пространства доступного такого рода методам и уменьшает влияние исследователя на получаемый результат. Значимой проблемой является частота каталитических актов в ферменте. Моделирование КМ/ММ МД заметно медленнее чем классическая молекулярная динамика. Решением является использование метода метадинамики, который позволяет ускорять некоторые процессы. Опираясь на выбранную стратегию моделирования, мы сформулировали задачу по поиску мутантов каталитического антитела A17 способного к расщеплению параоскона. Ранее было предложено, что протекание реакции происходит в две стадии. Первая стадия это образование ковалентного интермедиата A17 с параосконом с участием Тyт37. Реакция первой стадии происходит по SN2 механизму, где нуклеофилом является депротонированный Тyт37. В изолированном состоянии тирозин является слабым нуклеофилом. Стимулирование отрыва протона для образования эффективного нуклеофила является перспективной тактикой для улучшения активности абзима. Можно предполо-

жить, что такое стимулирование может быть основано на добавление акцептора протона в близости от Тут37 или добавление положительного заряда для локальной стабилизации депротонированного остатка тирозина.

Альтернативной тактикой является стабилизация параксона в состоянии близкому к атаке. Очевидно, что факт выбора тактики приведет к потере важных составляющих реакции. Для решения этой дилеммы мы разработали подход по комбинаторной генерации моделей мутантов и после первичного отсева очевидно бессмысленных мутантов мы провели селекцию на предложенной выше библиотеке моделей мутантов. Селекция проводилась методом моделирования реакции с помощью метадинамики. После ранжирования из десятков тысяч мутантов были выбраны лучшие 10 и для них было проведено множественное моделирование реакции для выявления статистически лучших. Так же для лучших десяти мутантов была исследована стабильность положения лиганда в предреакционном состоянии. Новый цикл ранжирования позволил нам выделить два лучших мутанта. Экспериментальная валидация подхода подтвердила эффективность отобранных мутантов, увеличение скорости реакции в ~200 раз. Последующее исследование структуры этих мутантов методом РСА подтвердило консервативность структуры мутантов абзима, что являлось основным предположением при использовании предложенного подхода.

МНОГОСТУПЕНЧАТОЕ ГИБРИДНОЕ QM/MM МОДЕЛИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ: ДЕЛО ВУСНЕ

А.О. Залевский^{1,2}, А.В. Головин¹ ¹Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Вычислительные методы, такие как моделирование классической молекулярной динамики прочно вошли в арсенал методов для изучения структур и динамики биомолекул. Однако моделирование реакций в ферментах при помощи этих методов невозможно. Основной барьер – необходимость моделирования при помощи квантово-механических расчетов, для фермента это невозможно в силу огромного вычислительного времени, которого потребуют расчеты для систем такого размера. Перспективным подходом является гибридное QM/MM-моделирование – где большая часть системы моделируется “быстрыми” методами классической молекулярной механики, а активный центр “медленными” квантово-механическими расчетами. Однако, распространение этой методологии затруднено из-за отсутствия удобных инструментов, комбинирующих мощные и признанные в сообществе вычислительные пакеты.

Одной из целей настоящей работы является реализация универсального программного интерфейса и вспомогательных инструментов, которые позволят объединить один из самых популярных пакетов для моделирования молекулярной динамики GROMACS с набором ключевых программ для квантово-химических расчетов: MOPAC2012, DFTB, ORCA, Firefly, GAMESS-US, Gaussian и др. Особенностью интерфейса является система плагинов на языке программирования Python для минимизации затрат на интеграцию новых пакетов для квантово-химических расчетов. Применимость подобного подхода продемонстрирована на примере реакции гидролиза фосфорорганического субстрата – экотиофата бутирилхолинэстеразой человека. Используя целую палитру вычислительных методов: молекулярный докинг, моделирование молекулярной динамики и гибридное QM/MM моделирование в сочетании с техниками увеличения эффективности сканирования конформационного пространства (метадинамика) мы смогли восстановить механизм реакции. Без априорного знания механизма, протестировав несколько потенциальных путей, нам удалось восстановить механизм протекания первой стадии реакции – образование ковалентного интермедиата экотиофата и бутирилхолинэстеразы, а также второй стадии – его гидролиз молекулой воды. На основании полученного механизма сконструированы и протестированы на нескольких уровнях теории *in silico* мутанты, влияющие на различные стадии реакции: связывание, образование ковалентного интермедиата, гидролиз. Интересно отметить, что среди де novo сконструированных мутантов обнаружился вариант G117N, имеющий согласно ранее известным данным, эффективность на 2 порядка лучше, чем дикий тип. Таким образом, ранее ограниченно применявшийся подход, усиленный вспомогательными кодами собственной разработки, являет мощным и универсальным инструментом для модификации ферментов. Работа выполнена в рамках проекта РНФ № 16-14-00191.

СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ ВЫСОКОЙ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ ГИСТОНОПОДОБНОГО HU-БЕЛКА ИЗ МИКОПЛАЗМЫ SPIROPLASMA MELLIFERUM KC3

К.М. Бойко^{1,2}, Т.В. Ракитина^{2,3}, Д.А. Корженевский², А.В. Власкина², Ю.К. Агапова², Д.Э. Камашев², С.Ю. Клейменов^{1,4}, В.О. Попов^{1,2}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²Курчатовский комплекс НБИКС-технологий, НИЦ «Курчатовский институт»; ³Лаборатория белков гормональной регуляции, Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ⁴Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

HU-белки являются одними из наиболее часто встречающихся белков в прокариотических организмах, играя важную роль в процессах репликации, репарации и рекомбинации ДНК. В бактериях, в которых HU-белки являются единственными представителями нуклеоид-ассоциированных белков (NAPs), таких как *B. subtilis* и *M. genitalium*, генетическое удаление этих белков является летальным. Эти небольшие (около 90 а.к. на мономер) белки аннотированы в большинстве бактерий с секвенированным геномом. Установлены пространственные структуры ряда HU-белков, включая структуры мутантных форм и комплексов с ДНК. Все известные HU-белки существуют в виде стабильных и компактных димеров, состоящих из нескольких перекрученных α -спиралей, двух β -слоев и двух протяженных «рук», отвечающих за связывание с ДНК. В связи с существованием HU-белков, обладающих различной термостабильностью, небольшим размером белковой молекулы, а также сходству пространственных структур, эти белки являются удобной моделью для исследования структурных основ термостабильности.

Нами была получена пространственная структура HU-белка из микоплазмы *Spiroplasma melliferum* KC3 (HUSpm) с наименьшим для этого класса ферментов разрешением – 1.36 Å. Пространственная организация HUSpm сходна с таковой для известных представителей белков этого класса – димер, с центральным гидрофобным кором, стабилизированный водородными связями. Однако детальный анализ структуры показал, что в случае HUSpm имеет место усиление димерного гидрофобного кора за счет ряда аминокислотных замен, а также отсутствие солевых мостиков в димерном интерфейсе с сопутствующим увеличением числа водородных связей.

Исследования температурной стабильности белка методом ДСК показало, что термостабильность HUSpm находится на уровне белков данного класса из термофильных организмов. Анализ структуры HUSpm позволил установить структурные

мотивы, ответственные за высокую термостабильность белка, что было подтверждено сайт-направленным мутагенезом с последующей проверкой полученных точечных мутантов методом ДСК. *Исследование выполнено за счет грантов Российского научного фонда №15-14-00063 – в части исследования пространственной структуры HUSpt и №14-24-00172 – в части проведения работ по характеристике термостабильности белка методом ДСК.*

МОДЕЛИРОВАНИЕ КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ МУТАЦИЙ, ЛОКАЛИЗОВАННЫХ В ЦЕНТРЕ СВЯЗЫВАНИЯ ИОНА МЕДИ В АЗУРИНЕ

Ю.В. Чижов¹, И.В. Крауклис¹, В.Г. Маслов², К.А. Мошков¹, В.Е. Стефанов¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, ²Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия

Включение ионов Cu в предковые белковые структуры было одним из важных этапов эволюции, поскольку обратимое изменение валентности этих ионов значительно ускорило протекание многих биохимических процессов. Эффективность этих эволюционных достижений подтверждается ранним формированием весьма консервативных по своей структуре Cu-комплексов, не менее 3 млрд. лет тому назад, и их широким распространением. Пример – «синие» Cu-центры в бактериальных азуринах, растительных пластоцианинах, церулоплазмине и факторах V и VIII свертывания крови человека, образованные «каноническими» остатками His, Cys и Met. Все это обуславливает актуальность изучения таких медьпротеидов методом рентгеноструктурного анализа (РСА) и различными спектральными методами с применением квантово-химических расчетов. Основной методический прием здесь – точечные замены «канонических» остатков на другие. В настоящей работе методами стационарной и нестационарной теории функционала плотности с гибридным функционалом B3PW91 и базисом 6-31G(d) для атомов C, N и O (6-31++G** – для атомов H) и псевдопотенциалом LANL2DZ для атома Cu были определены пространственные, электронные, спектральные и магнитные свойства сигма-комплексов Cu(II)- и Cu(I)-азурина «дикого типа» и мутантной формы этого белка с заменой Cys112Asp. При оптимизации геометрии для сохранения формы комплекса фиксировались альфа-атомы C в аминокислотных остатках-лигандах Cu и учитывалось дисперсионное взаимодействие в рамках GD3 формализма. Показано, что расчетные геометрии хорошо согласуются с данными РСА. Для оценки силового воздействия со стороны Cu-центра на его окружение в белковой глобуле были использованы расчетные градиенты потенциальной энергии (силы) на альфа-атомах C. Характерной особенностью электронной структуры окисленного состояния изученных форм азурина является наличие вакантной β -LUMO в середине зоны энергетической щели. Интенсивные LMCT переходы в области 600–700 нм приводят к синей окраске Cu(II)-комплекса в случае азурина «дикого типа», чего не наблюдается для мутантной формы азурина. Обнаруженное согласие расчетных и известных экспериментальных спектров поглощения Cu(II)- и Cu(I)-центров изученных форм азурина свидетельствует о возможности достоверной характеристики спектральных свойств медь-протеидов.

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ БАКТЕРИИ THIOALKALIVIBRIO PARADOXUS

С.И. Цаллагов¹, К.М. Поляков², Т.В. Тихонова¹, В.О. Попов^{1,3}

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН;

³Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

Тиоцианатдегидрогеназа из бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* (TcDH) катализирует реакцию окисления тиоцианата с образованием цианата и молекулярной серы и переносом электронов на белок-акцептор. TcDH является медь-зависимым ферментом. Методом рентгеноструктурного анализа были решены три структуры TcDH с различным содержанием ионов меди в активном центре. Структуры содержат один (структура I, разрешение 1.7 Å), три (структура II, 1.9 Å) и пять ионов меди (структура III, 2.3 Å). Кристаллы структуры I были получены кристаллизацией свежeweделенного препарата TcDH. Кристаллы структуры II получены кристаллизацией препарата TcDH, обработанного солями Cu(II). Кристаллы структуры III получены обработкой кристаллов структуры II раствором соли Cu(I). Мономер TcDH имеет уникальный ход полипептидной цепи. Структура образована β -пропеллером из 7 лопастей. Активный центр расположен в полости в центре пропеллера. Вход в полость активного центра возможен с одной стороны β -пропеллера, с другой стороны полость закрыта C-концевым участком молекулы. В кристаллах мономеры TcDH образуют тетрамер, в котором можно выделить два симметричных димера с сильными контактами. Все три структуры похожи. Отличия наблюдаются в области активного центра. В структуре I единственный ион меди координируется остатками His381, His206, Asp314 и молекулой H₂O и имеет заселенность 0.5. Часть остатков активного центра разупорядочены. В структуре II первый ион меди расположен также, как ион меди в структуре I, и имеет полную заселенность. Второй ион меди координирован остатками Lys103, His135, His528 и молекулой H₂O и также имеет полную заселенность. Третий ион меди расположен в канале, ведущем в активный центр фермента. Он координирован остатками His482, Asp480 и молекулой H₂O и имеет заселенность 0.2. В структуре III выявлено еще два сайта связывания ионов меди. Четвертый ион меди координируется His437, His482, H₂O, пятый – His136 и тремя H₂O. Первые четыре иона меди имеют тетраэдрическую координацию. Пятый ион меди имеет плоскую квадратную координацию и расположен на расстоянии 3.1 Å от второго иона меди. Подобное строение активного центра ранее описано не было. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-24-00172.*

СПЕКТРОСКОПИЯ ЯМР В ОПРЕДЕЛЕНИИ СТРУКТУРЫ, ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ И ДИНАМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФАКТОРА ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ ERF1 ЧЕЛОВЕКА

В.И. Польшаков¹, А.Б. Манцызов¹, Е.В. Иванова², Б.Д. Елисеев², Е.З. Алкалаева², Chi-Fon Chang³, Л.Ю. Фролова², Л.Л. Киселев²

¹Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; ²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия; ³Institute of Biomedical Sciences, Academia Sinica, Taipei, Taiwan

Терминация биосинтеза белка на рибосоме эукариот контролируется кооперативным взаимодействием двух белковых факторов – eRF1 и eRF3. Фактор первого класса eRF1 содержит три пространственно разделенных домена, каждый из которых ассоциирован со специфической функцией [1]. N-терминальный домен вовлечен в узнавание одного из трех стоп кодонов (UAA, UAG или UGA) матричной РНК в декодирующем центре малой субъединицы рибосомы. Средний (M) домен уча-

существует в гидролизе связи пептидил-тРНК в пептидилтрансферазном центре большой субъединицы рибосомы. С-терминальный домен eRF1 связывается с eRF3, повышая эффективность терминации трансляции. Информация о структуре eRF1 в растворе и динамических свойствах белка важна для понимания природы этих сложных процессов. Нами определены структуры высокого разрешения каждого из трех доменов eRF1 человека (идентификаторы PDB: 2LLX для N-домена, 2HST для M-домена, 2KTV и 2KTU для двух конформеров C-домена) [2–4]. Для каждого из доменов, включая их функционально важные области, были найдены достоверные различия между конформацией белка в растворе и кристалле. Определены динамические свойства белковой цепи eRF1. Методами гетероядерной спектроскопии ЯМР найден интерфейс взаимодействия M-домена eRF1 с рибосомой эукариот, при этом показано, что белок специфически связывается с 60S субъединицей рибосомы, не взаимодействуя с 40S субъединицей. Получены отнесения сигналов ¹H, ¹³C и ¹⁵N цепи полноразмерного белка eRF1 (~50 kDa) [5]. Сравнение параметров ЯМР отдельных доменов и полноразмерного белка проливает свет на сложные динамические свойства полноразмерного eRF1. Экспериментальные данные ЯМР, подкрепленные результатами анализа длинной траектории молекулярной динамики белка и функциональными исследованиями нескольких мутантных форм eRF1 вносят вклад в понимание молекулярного механизма терминации трансляции эукариот. *Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант 14-14-00598) и РФФИ (гранты 10-04-13308-РТ-оми и 11-04-00974-а).*

1. Song H. et al., Cell, 2000, 100, 311-321.
2. Ivanova E.V. et al., FEBS J., 2007, 274, 4223-4237.
3. Mantsyzov A.B. et al., FEBS J., 2010, 277, 2611-2627.
4. Polshakov V.I. et al., Protein Sci., 2012, 21, 896-903.
5. Polshakov V.I. et al., Biomolec.NMR Assign., 2015, 9, 37-42.

ПРОБЛЕМА ОЛИГОМЕРНОГО СОСТОЯНИЯ УНИВЕРСАЛЬНЫХ АДАПТЕРНЫХ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА 14-3-3

Н.Н. Случанко *Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия*

Множество функций белков 14-3-3, способных распознавать фосфорилированные формы белков-партнеров и участвовать тем самым в регуляции различных внутриклеточных процессов, обусловлено наличием их димерной структуры. В отличие от специфического связывания фосфо-партнеров, шапероноподобная активность 14-3-3 не зависит от фосфорилирования белков-субстратов, и ее механизм понятен не до конца. Димерное состояние 14-3-3, критичное для выполнения основных функций, регулируется различными способами, включая фосфорилирование. Так, фосфорилирование Ser58, расположенного в зоне контакта субъединиц в N-конце белка, дестабилизирует димер 14-3-3 и сдвигает равновесие в сторону мономерных форм, которые существенно менее изучены и долгое время вообще считались неактивными. При этом большая часть гипотез литературы, касающихся мономеров 14-3-3, не имела экспериментального подтверждения. Поскольку модификация остатка Ser58 *in vitro* вызывает неполную диссоциацию белка, для получения стабильной мономерной формы 14-3-3 мы использовали искусственные аминокислотные замены в области интерфейса, что позволило впервые получить и исследовать свойства мономеров 14-3-3. Оказалось, что они вполне способны существовать независимо, хотя и менее стабильны, сохраняют способность взаимодействовать с некоторыми фосфопартнерами (tau белок, HSPB6), и даже превосходят димерные формы по шапероноподобной активности на различных белках-субстратах с разными механизмами агрегации. Тем не менее, особенности структуры мономерных форм 14-3-3 оставались неисследованными. С помощью целого набора биоинформатических подходов мы обнаружили значительную склонность N-концевого участка белков 14-3-3 к разупорядоченности и предположили, что, будучи структурированной в димерах 14-3-3, эта область молекулы претерпевает переход в менее упорядоченное состояние при их диссоциации. Это подтверждается данными спектроскопии кругового дихроизма и малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (SAXS), полученными при исследовании нового мутантного белка 14-3-3, несущего одновременно мономерирующие мутации и мутацию, имитирующую фосфорилирование (S58E). Вероятно, регулируемый баланс димерных/мономерных форм 14-3-3 используется клеткой для тонкой подстройки нужных ей функций. *Работа подержана грантом РФФИ 14-04-00146а.*

БЕЛОК-ЛИПИДНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ И АЛЬТЕРНАТИВНАЯ ДИМЕРИЗАЦИЯ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ В ПЕРЕДАЧЕ СИГНАЛА РЕЦЕПТОРНЫМИ ТИРОЗИНКИНАЗАМИ

Э.В. Бочаров¹, Д.М. Лесовой¹, К.С. Минеев¹, П.Е. Брагин¹, П.К. Кузьмичев^{1,2}, П.Е. Волынский¹, О.В. Бочарова¹, А.С. Арсеньев^{1,2}

¹ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ² Московский физико-технический институт (государственный университет), Москва, Россия

Рецепторные тирозинкиназы (РТК), играя ведущую роль в процессах клеточного роста, дифференцировки и адгезии, принимают непосредственное участие в управлении развития и гомеостаза всех тканей организма человека. Необходимым условием передачи биохимических сигналов через плазматическую мембрану является димеризация РТК, как лиганд-зависимая, так и независимая, сопровождаемая конформационными перестройками всех доменов рецептора, включая α-спиральные трансмембранные (ТМ) сегменты. Относительно небольшие размеры комплексов ТМ доменов РТК, встроенные в детергентные мицеллы и липидные бицеллы, делают возможным определение их пространственной структуры при помощи гетероядерной спектроскопии ЯМР высокого разрешения. С помощью методов белковой инженерии с использованием бактериальной и бесклеточной систем экспрессии мы для структурных исследований нарабатывали ¹⁵N, ¹³C изотопно-меченые препараты ТМ фрагментов РТК семейства рецепторов эпидермального фактора роста HER/ErbB, широко известных из-за их причастности к ряду онкологических заболеваний. Изучая гомо- и гетеро-димеризацию ТМ доменов HER/ErbB, мы экспериментально установили их различные конформации, соответствующие, предположительно, как неактивному, так и активированному состояниям рецептора. Мы показали, что смена типа мембраноподобного окружения и, соответственно, изменение его физических свойств (в том числе плотности упаковки акильных цепей и проницаемости для воды) приводит к альтернативной димеризации ТМ доменов HER/ErbB, а также к различному состоянию цитоплазматических примембранных участков, включая их взаимодействие с поверхностью мембраны. Из сопоставления полученных результатов с литературными данными для рецепторов HER/ErbB предложен новый механизм передачи сигнала РТК через мембрану клетки посредством аллостерических конформационных переключений, обусловленных изменением белок-липидного взаимодействия из-за альтернативной димеризации лиганд-связывающих, трансмембранных, примембранных и киназных доменов РТК вследствие свя-

звания лиганда. Новые принципы передачи сигнала через мембрану дополняют молекулярные схемы активации РТК, предложенные ранее, и объясняют ряд парадоксов, наблюдаемых при активации РТК дикого типа и с патогенными ТМ мутациями. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 15-04-07983-а.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ ПУТЕМ СОВМЕСТНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ И МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА

Д.М. Карлинский, А.А. Зинченко, Л.Д. Румш, А.Н. Некрасов

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Современные методы молекулярного моделирования позволяют достаточно успешно предсказывать пространственную организацию относительно коротких фрагментов полипептидной цепи длиной 20–40 остатков в зависимости от первичной структуры рассматриваемых фрагментов. Ограничение длины пептидного фрагмента обусловлено точностью потенциальных полей, описывающих взаимодействие между функциональными группами аминокислотных остатков. Настоящая работа посвящена разработке подходов, позволяющих снять или снизить ограничение на размер исследуемых полипептидных цепей, посредством объединения методов молекулярного моделирования и докинга молекул. Ключевой задачей объединения методов является выяснение вопроса, насколько близкими к нативной структуре должны быть структурные блоки, полученные методами молекулярного моделирования, чтобы их можно было использовать при сборке белковой молекулы методом докинга. В качестве объекта исследования была использована молекула панкреатической РНКазы А. Для разделения белка на «структурные блоки» использовали метод анализа информационной структуры белков [1]. Возмущения в нативные конформационные состояния полученных таким образом структурных элементов вводили при помощи метода молекулярной динамики (пакет GROMACS), после чего измененные структурные блоки использовали в процедуре докинга для восстановления третичной структуры белка. Было показано, что для успешного докинга необходимо сохранение взаимной ориентации элементов вторичной структуры в моделируемых структурных блоках. Частичное разрушение элементов вторичной структуры на стадии молекулярного моделирования мало сказывалось на конечном результате докинга. Процедура докинга была успешной даже при величине среднеквадратичного отклонения двугранных углов полипептидного остова до 65°.

1. Nekrasov A.N., Anashkina A.A., Zinchenko A.A. A new paradigm of protein structural organization. Proceedings of the 2nd International Conference “Theoretical Approaches to BioInformation Systems”, pp. 1-22. Institute of Physics. Belgrade, 2014, Serbia. ISBN: 978-86-82441-40-3.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ СОСТОЯНИЯМИ РАЗЛИЧНЫХ ДОМЕНОВ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ I КЛАССА

К.С. Минеев¹, Э.В. Бочаров¹, П.Е. Брагин¹, К.Д. Надеждин^{1,2}, Е.В. Новикова^{1,2}, С.А. Гончарук¹, О.В. Бочарова¹, А.С. Арсеньев^{1,2}

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ²Московский физико-технический институт (государственный университет), Москва, Россия

Мембранные белки I типа являются одним из наиболее интересных объектов структурной биологии. Данные белки содержат большие внутри- и внеклеточные домены, однако их трансмембранный (ТМ) домен состоит из одной α -спирали. Большинство мембранных белков I типа являются клеточными рецепторами и активны в виде гомо- или гетеродимерных комплексов. Полноразмерные белки I типа не кристаллизуются, поэтому молекулярные механизмы активации для таких белков описаны на уровне пространственных структур отдельных доменов в различных состояниях. Так, в лаборатории Биомолекулярной ЯМР спектроскопии ИБХ РАН были получены более 10 структур димеров ТМ доменов различных рецепторов данного класса. Однако, отнесение полученных структур изолированных доменов к определенному функциональному состоянию полноразмерного белка является трудновыполнимой задачей и обычно осуществляется на основе косвенных данных, таких, как эффекты от точечных мутаций. Для выявления взаимосвязи между состояниями отдельных доменов необходимо исследовать пространственную структуру связок из нескольких доменов рецепторов и такие работы в настоящий момент проводятся в лаборатории на примере рецепторов семейств TLR, HER, TNFR. В частности, было изучено влияние цитоплазматических примембранных регионов рецептора TLR4 на структуру и способность к димеризации его ТМ доменов, что позволило объяснить ряд свойств рецептора, описанных в литературе. Была исследована структура и внутримолекулярная подвижность связи из ТМ и внутриклеточного доменов рецептора нейротрофинов р75. Показано, что в различных олигомерных состояниях движения и структура внутриклеточного домена никак не связаны с конформацией ТМ домена, а примембранные регионы рецептора подвижны и имеют неупорядоченную структуру в широком круге сред, имитирующих мембранное окружение, в том числе в липид/белковых нанодисках и липосомах. Полученные результаты позволили опровергнуть предложенный ранее механизм активации рецептора р75 и сформулировать новую гипотезу. Для проведения дальнейших исследований белковых конструкций, содержащих трансмембранный и внутриклеточный домены мембранных белков I типа были разработаны новые методики и технологии, в том числе предложены и опробованы новые мембраноподобные среды, применимые для ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 14-14-00573.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ pH-СЕНСОРНОГО РЕЦЕПТОРА ИРР

А.Г. Петренко, И.Е. Деев *Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН*

В результате поиска эндогенного агониста рецепторной тирозинкиназы нами была выявлена ее способность активироваться внеклеточной слабощелочной средой. ИРР является близким гомологом рецепторов инсулина и инсулин-подобного ростового фактора, однако не взаимодействует с их агонистами, а гомологи ИРР не реагируют на изменения pH среды. Активация ИРР щелочью является типичным лиганд-рецепторным взаимодействием, поскольку оно дозозависимо с насыщением, специфично по отношению к другим рецепторам, определено структурными особенностями внеклеточной части ИРР и характеризуется его конформационными изменениями. Свойство ИРР реагировать на повышение pH внеклеточной среды сохранено в его эволюции от амфибий до млекопитающих. Полученные данные позволяют заключить, что ИРР является клеточным сенсором pH. Для анализа структуры и функции ИРР нами использовались три подхода. Физиологический – с использованием линии нокаутных мышей с генетически инактивированным рецептором. Данные мыши жизнеспособны в

нормальных условиях, однако при экспериментально индуцированном алкалозе у них нарушается компенсаторный ответ – нокаутные мыши не способны экскретировать избыточный бикарбонат почками. Тем не менее увеличение концентрации бикарбоната в крови постепенно компенсируется накоплением углекислоты, что позволяет сохранять pH крови в рамках физиологических величин. Генетический – путем сравнительного анализа транскриптомов почек нормальных и ИРР нокаутных мышей глубоким сиквенированием. Таким образом были выявлены белки, изменение экспрессии которых вследствие выключения гена ИРР являются статистически значимыми, в их числе мембранные транспортеры ионов. Молекулярный – моделирование структуры ИРР на основе сравнения аминокислотных последовательностей трех членов минисемейства рецептора инсулина и дальнейшего анализа pH-сенсорной функции ИРР путем создания рецепторных химер и направленного точечного мутагенеза. На основе полученных результатов предложена модель активации ИРР, основанная на изменении взаимного расположения отдельных доменов внеклеточной части рецептора. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект #14-50-00131).*

Т-КАДГЕРИН В ПРОЦЕССАХ РОСТА И РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

К.А. Рубина, В.А. Ткачук

Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В современной биологической науке достаточно хорошо изучены морфогенетические процессы, происходящие в эмбриогенезе, однако существенно меньше известно о генетических и эпигенетических механизмах построения архитектуры, поддержания целостности органов и тканей и их васкуляризации во взрослом организме. В последнее время помимо основных молекул, участвующих в процессах ангиогенеза, таких как факторы роста, цитокины и хемокины, большое внимание уделяется изучению навигационных молекул, которые определяют направление роста вновь формирующихся сосудов. Помимо контролирования траектории роста сосудов в эмбриогенезе и регенерации, навигационные молекулы играют важную роль при патологическом ангиогенезе. Т-кадгерин является навигационной молекулой, для которой ранее было обнаружено участие в регуляции направленного роста аксонов. Во взрослом организме человека максимальная экспрессия Т-кадгерина выявляется в сердечно-сосудистой и нервной системах, повышение его экспрессии наблюдается при различных патологиях.

Т-кадгерин, впервые был обнаружен более 20 лет назад в эмбриональном мозге цыпленка (Ranscht and Dours-Zimmermann, 1991), в развивающейся нервной системе он функционирует как «молекула отталкивания». Т-кадгерин является многофункциональной молекулой. Гомофильное взаимодействие между молекулами Т-кадгерина на контактирующих клетках лежит в основе регуляции процессов ангиогенеза. В зрелых сосудах Т-кадгерин функционирует как сигнальная молекула, регулирующая проницаемость эндотелиального монослоя. Т-кадгерин является рецептором ЛНП, опосредующим их сигнальные эффекты в сосудистой стенке и миграцию клеток по градиенту ЛНП, что может приводить к ремоделированию кровеносных сосудов. Изучение роли Т-кадгерина в процессах физиологического и патологического ангиогенеза, ремоделирования сосудов важно для понимания фундаментальных механизмов морфогенетических процессов в эмбриогенезе и во взрослом организме, а также для решения современных задач регенеративной медицины.

НОВЫЕ СТРАТЕГИИ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ РЕГУЛЯТОРОВ СОПРЯЖЕННЫХ С G-БЕЛКАМИ РЕЦЕПТОРОВ

А.О. Шпаков *Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург*

Сопряженные с G-белками рецепторы (GPCR) образуют обширное семейство, включающие более 1200 их типов. Они имеют сходную топологию в мембране и включают 7 трансмембранных участков, образующих канал, где в большинстве GPCR расположен ортостерический сайт, с которым с высоким сродством связываются агонисты и антагонисты. После связывания с агонистом GPCR переходит в активную конформацию, что ведет к изменению 3D-структуры его цитоплазматических участков и вызывает активацию G-белков и сопряженных с ними эффекторных белков. GPCR являются мишенями для 40% лекарственных препаратов. В последние годы активно развиваются новые стратегии для создания регуляторов GPCR. Одна из них состоит в разработке внутриклеточных агонистов и антагонистов GPCR на основе пептидов, которые структурно соответствуют функционально важным участкам цитоплазматических петель рецепторов. GPCR-пептиды взаимодействуют с комплементарными им внутриклеточными участками гомологичного рецептора, вследствие чего они либо активируют сигнальные каскады (в отсутствие гормона), функционируя как внутриклеточные агонисты, либо подавляют передачу сигнала от активированного гормоном рецептора, действуя как внутриклеточные антагонисты. Другая стратегия состоит в разработке низкомолекулярных агонистов и антагонистов GPCR, лигандами которых являются значительные по размеру тиреотропный, лютеинизирующий и фолликулостимулирующий гормоны. Для этих GPCR ортостерический сайт, с которым связывается гормон, расположен в эктодомене, в то время как аллостерический сайт, с которым связываются низкомолекулярные регуляторы, в трансмембранном канале. Низкомолекулярные агонисты имеют ряд преимуществ перед гликопротеиновыми гормонами: 1) могут проявлять активность полных и инверсионных агонистов и антагонистов; 2) активны при пероральном введении; 3) проникают в клетку и активируют еще незрелые или мутантные формы GPCR; 4) функционируют как низкомолекулярные шапероны, предотвращая протеосомную деградацию GPCR. *Работа поддержана РФФИ (проект № 16-04-00126).*

STUDIES OF AN ORPHAN ECTOPICALLY EXPRESSED OLFACTORY GPCR, OLFR558/PSGR2

Vladlen Z. Slepak, Alexey Pronin *University of Miami, Miller School of Medicine, Miami, USA*

In the recent years, it has been established that G protein-coupled receptors (GPCRs) that belong to the class of olfactory receptors can be expressed outside the nasal cavity. For example, they were found in the gut, where they are not responsible for the sense of smell, but detect chemicals in their environment. For the most part, the ligands of these ectopically olfactory receptors (termed Olfrs in mice, ORs in humans) are not known, and little is known about their function. However, their abundance (hundreds of genes), selective expression in tissues and the fact that they belong to GPCR superfamily, make them very attractive as drug targets. This project investigates one such receptor, Olfr558. We identified this receptor while searching for novel receptors expressed on the

mouse ocular surface (cornea). Our subsequent studies using a novel method of in situ mRNA hybridization (RNAscope) also detected it in the blood vessels of the eye. It is known that human ortholog of this receptor, known as PSGR2, is dramatically up-regulated in human prostate cancer and it is an established biomarker of malignancy of a prostate tumor. Human and mouse genes are nearly identical (95%), which is unique for GPCRs in general, and particularly for sensory chemoreceptors. While this unusual evolutionary conservation points to indispensability and importance of its physiological function, the role of Olfr558/PSGR2 has not been investigated. Our strategies to understanding the function of this receptor involve the gene knockdown studies and search for small chemicals that might work as agonists and antagonists of this receptor. Our data show correlation between the presence and activity of this receptor and growth rate of cancer cell lines. We also established an expression system, performed a screen of a chemical library and identified potential hits. In this presentation, we will describe successful technical approaches we use to facilitate functional expression of Olfr558, and potential pitfalls in studying the biology of ectopically expressed orphan olfactory receptors.

HOW INSULIN BINDS: STRUCTURE OF A MICRO-RECEPTOR COMPLEX AND IMPLICATIONS FOR ANALOG DESIGN

Michael A. Weiss *Department of Biochemistry, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, OH 44106*

The discovery of insulin in 1921 represented a landmark in molecular medicine and led to extensive investigation of the structure and function of this globular protein hormone with application to therapeutic analog design. This presentation provides a summary of the current structural understanding of the active conformation of insulin in relation to its mechanism of receptor binding. Implications of recent crystal structures and NMR studies will be discussed as a foundation for the engineering of novel ultra-stable single-chain analogs, intended as basal (long-acting) insulin formulations for use in regions of the developing world lacking access to refrigeration yet challenged by a global pandemic of Type 2 diabetes mellitus (“diabesity”). A key constraint in the design of therapeutic insulin analogs is posed by their physical degradation to form amyloid. Spectroscopic studies of insulin fibrils has provided structural constraints regarding the molecular structure of a protofilament and distorted conformations of insulin proposed as intermediates in the process of fibrillation. Consideration of such constraints has highlighted the potential utility of single-chain insulin analogs containing foreshortened connection domains. Such foreshortened tethers must accommodate induced fit of the hormone on receptor binding, a binding mechanism that entails splaying of the C-terminal segment of the B chain. Insight into the hormone-binding surfaces of the ectodomain of the insulin receptor and “micro-receptor” models of the hormone-receptor complex have enabled visualization at low resolution of how the splayed B chain inserts between domains of the receptor. These recent structures provide a new and promising foundation for analysis of structure-activity relationships with direct application to the design of novel insulin analogs. Efforts are underway toward the optimization of insulin analogs to address unmet needs of patients with diabetes mellitus in affluent societies and in the developing world.

The speaker is grateful to Drs. M. C. Lawrence, J. G. Menting and C. Ward (WEHI, Melbourne) for their generous collaboration and encouragement in the course of these long-term studies. Additional collaborative ties with V. Chauhan, F. Ismail-Beigi, S.B. Kent, N. Phillips, D. F. Steiner (deceased), R. Tycko, J. Whittaker, N. Wickramasinghe and Y. Yang are warmly acknowledged. This work was supported in part by the US NIH and the Leona M. and Harry B. Helmsley Foundation.

1. Menting, J.G., Whittaker, J., Margetts, M.B., Whittaker, L.J., Kong, G.K.-W., Smith, B.J., Watson, C.J., Žáková, L., Kletvikova, E., Jiráček, J., Steiner, D.F., Chan, S.J., Dodson, G.G., Brzozowski, A.M., Weiss, M.A., Ward, C.W., & Lawrence, M.C. (2013) *Nature* 493, 241–245.
2. Menting, J.G., Yang, Y., Chan, S.-J., Phillips, N.B., Smith, B.J., Whittaker, J., Wickramasinghe, N.P., Whittaker, L., Pandeyarajan, V., Wan, Z.-I., Yadav, S.P., Carroll, J.M., Stokes, N., Roberts, Jr., C. T., Ismail-Beigi, F., Milewski, M., Donald F. Steiner, D.F., Chauhan, V.C., Ward, C.W., Weiss, M.A., & Michael C. Lawrence, M.C. (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (PNAS-Plus)* 111, E3395–404.

СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ РЕЦЕПТОРА p75

С.А. Гончарук^{1,2}, К.С. Минеев², А.С. Арсеньев² ¹*Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова;* ²*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

Рецептор нейротрофинов p75 играет важнейшую роль в жизнедеятельности нейронов. В отличие от специфических Trk-рецепторов, p75 способен связывать различные нейротрофины (NGF, BDNF, NT3, NT4), а также их незрелые формы. Кроме того, он способен регулировать активность других нейротрофиновых рецепторов, например, TrkA. Способность связывать множество как вне-, так и внутриклеточных лигандов говорит об участии рецептора в запуске различных сигнальных каскадов, что подтверждается множеством экспериментальных данных. Несмотря на высокий интерес к данному белку, механизм активации p75, взаимосвязь между его структурой и функцией, а также влияние олигомеризации на работу рецептора остаются плохо изученными. В данной работе представлена пространственная структура связки трансмембранного и внутриклеточного доменов рецептора. Данные были получены с использованием ЯМР-спектроскопии в составе различных мембран-моделирующих сред (мицеллы, бицеллы, нанодиски). Показаны различные олигомерные состояния рецептора и их роль в образовании Cys257-димера, необходимого для передачи сигналов от нейротрофинов. Полученные данные позволяют откинуть часть имеющихся в литературе гипотез о функционировании рецептора и дают новые важные данные для проверки оставшихся теорий. *Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-14-00573).*

ПОЛУЧЕНИЕ ФРАГМЕНТОВ РЕЦЕПТОРА TLR4 ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ МЕТОДОМ ЯМР

М.В. Гончарук^{1,2}, С.А. Гончарук^{1,2}, К.С. Минеев², А.С. Арсеньев² ¹*Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова;* ²*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

Толл-подобные рецепторы (Toll-like receptor, TLR) – клеточные рецепторы I типа, играющие важную роль в работе как врожденного, так и приобретенного иммунитета. В их состав входит внеклеточный домен (ECD), задействованный в узнавании молекулярных паттернов – структурных компонентов различных патогенов (PAMP), единственный трансмембранный (TM) домен и внутриклеточный TIR домен, вовлеченный в процесс передачи сигнала внутрь клетки. Рецепторы TLR образуют гомо-/гетеродимерные сигнальные комплексы с PAMP, что запускает сигнальный каскад реакций, воспалительный процесс и активацию иммунного ответа. Детальное изучение механизмов работы TLR важно с фундаментальной, медицинской и биологической точек зрения. Тем не менее, структурно-функциональные особенности этих полноразмерных рецепторов на молекулярном уровне полностью не изучены. Определение ЯМР структуры полноразмерных рецепторов/их комплексов осложнено из-за их размеров, а так же из-за трудностей биохимического получения достаточных количеств TLR в на-

тивной конформации в средах, моделирующих мембрану. В связи с этим при исследовании структуры и функции полноразмерных рецепторов чаще всего встречается подход, предполагающий изучение их фрагментов. В данном исследовании разработаны подходы, позволяющие экспрессировать гены отдельных доменов TLR4 (TIR и TM-TIR) в количествах, необходимых для структурного анализа методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения. Для внутриклеточного фрагмента TLR4 и его связи с TM доменом рецептора с учетом склонности к образованию высокомолекулярных комплексов разработаны протоколы очистки и рефолдинга. Получены необходимые количества целевых белковых фрагментов и проведены первые ЯМР-эксперименты. *Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-14-00573).*

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СЕКРЕТИРУЕМЫХ ФАКТОРОВ СЕМЕЙСТВА AGR С ИХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ ИЗ СЕМЕЙСТВА ТРЕХПЕТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ

Н.Ю. Мартынова, Ф.М. Ерошкин, Г.В. Ермакова, А.С. Иванова, П.А. Комаров, А.В. Байрамов, Д.Д. Короткова, А.Г. Зарайский
ФГБУ науки Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

В представленной работе проводилось изучение взаимодействия белков шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, принимающих участие в регенерации: секретируемого белка XAgr2 из семейства белков Agr (Anterior GRadient), и примембранного белка Tfr4 (Three Finger Protein), относящегося к группе трехпестельных белков Lуб. Белок XAgr2 (*Xenopus* Agr2) является одним из маркеров регенерации почки задней конечности и хвоста у головастика *Xenopus laevis*. Ранее другими авторами было показано взаимодействие гомолога XAgr2 тритона с трехпестельным белком Prod1 – фактором, определяющим проксимодистальное направление регенерирующей бластемы. В геноме *Xenopus laevis* было обнаружено 6 гомологов Prod1, названных Tfr1-6. Tfr – 10 кДа белки, входящие в семейство трехпестельных белков Lуб, имеющих достаточно консервативную третичную структуру, стабилизированную четырьмя или пятью дисульфидными связями и заякоренных на клеточной мембране с помощью гликофосфатидилинозитола (GPI). С помощью ко-иммунопреципитации мы показали, что наиболее вероятным рецептором для XAgr2 является белок Tfr4. Дополнительным подтверждением этого взаимодействия являются одинаковые временные и пространственные паттерны экспрессии данных белков в ходе раннего развития и при регенерации. Кроме этого, блокирование трансляции мРНК XAgr2 и Tfr4 при помощи морфолиновых антисмысловых олигонуклеотидов вызывает однотипные аномалии головного мозга и ингибирует регенерацию хвоста у головастика *Xenopus laevis*. Изучение данных белков представляет фундаментальный интерес, поскольку они принимают участие в каскадах, управляющих процессами формирования нервной системы и регенерацию. Их изучение может в перспективе иметь важное значение для биомедицины. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект #14-50-00131).*

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФЛАВОЦИТОХРОМ С СУЛЬФИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ЭКСТРЕМОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ THIOALKALIVIBRIO PARADOXUS

А.В. Лильина¹, Е.М. Осипов¹, Т.В. Тихонова¹, Д.Ю. Сорокин¹, В.О. Попов^{1,2}

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

Thioalkalivibrio paradoxus является представителем галоалкалофильных сероокисляющих бактерий, обитающих в содовых озерах. Основным источником энергии для *Tv. paradoxus* является окислительный метаболизм соединений серы. Одним из ключевых ферментов серного метаболизма является флавоцитохром С сульфиддегидрогеназа (FCC, КФ 1.8.2.3), катализирующая окисление сульфид-ионов с переносом электронов на цитохромы С. FCC является гетеродимером, состоящим из каталитической флавин-содержащей субъединицы и электрон-транспортной гем-содержащей субъединицы. В настоящей работе FCC был выделен из бактерии *Tv. paradoxus*, выращенной на тиоцианате в присутствии избытка Cu(II). *In vitro* фермент катализирует окисление сульфида при использовании в качестве акцептора электронов цитохрома С из сердца лошади. Кинетические параметры реакции, определенные при 25°C и pH 8,5 (pH-оптимум реакции), равны: $V_{max}=54\pm9$ мкмоль цитохрома С в минуту на 1 мг FCC, $K_m=1.9\pm0.4$ и 8 ± 3 мкМ для сульфида и цитохрома С, соответственно. Для определения трехмерной структуры FCC методом рентгеноструктурного анализа были получены монокристаллы белка. Предварительно методом термофлуоресцентного анализа был найден оптимальный для кристаллизации белковый буфер. На синхротроне ESRF (Гренобль, Франция) был собран набор дифракционных данных от монокристаллов FCC с разрешением 2,7 Å. Независимая часть элементарной ячейки содержит гетеротетрамер, состоящий из флавиновой, гемовой и двух медьсвязывающих субъединиц. Структура флавиновой субъединицы FCC из *Tv. paradoxus* близка по укладке известным структурам FCC из *A. vinosum* (r.m.s.d.=0,81 Å) и *T. tepidum* (r.m.s.d.=0,76 Å). В отличие от известных структур FCC, гемовая субъединица которых содержит два гема, в исследуемом белке гемовая субъединица содержит только один гем. Медьсвязывающие субъединицы подобны белку CopC из *E. coli*, имеющему центры связывания Cu(I)/Cu(II) и предположительно отвечающему за устойчивость к меди. Медьсвязывающие субъединицы отличались от CopC наличием α -спирали и способностью связывать только Cu(II). Гетеротетрамер, состоящий из FCC и димера CopC-подобного белка ранее описан не был. Сокристаллизация этих белков может быть связана с ролью этого комплекса в метаболизме меди и серы. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 14-24-0017.*

ДЕЙСТВИЕ ФОТОПЕРЕКЛЮЧАЕМОГО АНАЛОГА МОНОГЛИЦЕРИДА НА ЛИПИДНЫЕ КУБИЧЕСКИЕ ФАЗЫ

П.К. Кузьмичев, Е.А. Шевченко, М.В. Чудинов, Ю.В. Березовская, В.В. Чупин

Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Россия

Липидные кубические фазы (LCP) состоят из непрерывных липидных бислоев, пронизанных водными каналами. Липидные кубические фазы широко используются для кристаллизации мембранных белков и, следовательно, в исследованиях пространственной структуры белков методами рентгеновской кристаллографии. Данный подход был успешно применен в изучении сигнальных семиспиральных рецепторов, сопряженных с G-белками. Обычно для инициации кристаллизации в реакционную смесь добавляют преципитанты (буферные растворы с высокой концентрацией соли). В данном исследовании мы предлагаем новый подход – использовать фотопереключаемые аналоги моноолеинов для получения кубической фазы с изменяемым параметром кристаллической решетки. Нами был синтезирован ряд новых аналогов моноолеина, имеющих в своем составе диазо-группу. Структура их была подтверждена с помощью ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Мы встроили

ли полученные соединения в фосфолипидные везикулы и детергентные мицеллы и показали способность к транс- цис- изомерии при облучении светом с длиной волны 365 нм. Также были охарактеризованы липидные кубические фазы с диазо- аналогами, и их свойства с помощью измерения малоуглового рентгеновского рассеяния на приборе RIGAKU. Одно из синтезированных нами соединений 3-(4-{[4-(октилокси) фенил] диазенил} фенокси) пропан-1,2-диол (1% моль) было встроено в липидную кубическую фазу моноолеина. Согласно данным малоуглового рентгеновского рассеяния добавление моноолеинового аналога в кубическую фазу не изменило ни параметр решетки (106,3 Å), ни тип симметрии (Pn3m). После облучения светом с длиной волны 365 нм наблюдалось уменьшение параметра решетки до 98,8 Å. Данный эффект для кубической фазы моноолеина аналогичен эффекту от добавления преципитанта при постановке экспериментов белковой кристаллизации. Спонтанное возвращение к исходному состоянию происходило в темноте в течение трех суток. Таким образом, нами была показана возможность контролировать параметры решетки кубической фазы моноолеина путем добавления фотопереключаемого диазо-моноглицерида. Данный подход в будущем может быть использован для кристаллизации мембранных белков.

ПОЛУЧЕНИЕ ИЗОТОПНО-МЕЧЕНЫХ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ФРАГМЕНТОВ БЕЛКА ПРЕДШЕСТВЕННИКА β -АМИЛОИДА: БЕСКЛЕТОЧНАЯ И БАКТЕРИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ В СРАВНЕНИИ

О.В. Бочарова¹, А.С. Урбан^{1,2}, К.Д. Надеждин^{1,2}, П.К. Кузьмичев^{1,2}, П.Е. Волынский¹, Э.В. Бочаров¹, А.С. Арсеньев^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Россия

Отсутствие значительного прогресса в раскрытии начальных стадий патогенеза болезни Альцгеймера (наиболее распространенной формы деменции) вызвано не только сложностью этого процесса, но также трудностью получения и структурных исследований гетерогенных белков, имеющих как водорастворимые, так и трансмембранные (ТМ) сегменты. Продукция таких белков в биоинженерных системах имеет обычно небольшой количественный выход, а получение синтетических изотопно-меченых производных дорого, в то время как сам белок обычно нестабилен и имеет тенденцию выпадать в осадок даже в небольших концентрациях и в присутствии мембраноподобных систем. В результате, помимо досконально изучаемых процессов агрегации и межмолекулярных взаимодействий амилоидных А β -пептидов, остается не до конца раскрытым механизм их образования из мембранного белка APP (Amyloid Precursor Protein, белок предшественник β -амилоида). Притом считается, что селективное воздействие на аномальное расщепление белка APP, – наиболее перспективный терапевтический подход, влияющий непосредственно на первичное звено патогенетического процесса болезни Альцгеймера.

Нами проведено сравнение методов продукции ТМ фрагментов APP (в том числе семейных мутантных форм), соответствующих первым шагам последовательного протеолиза APP γ -секретазой в мембране. Данные рекомбинантные фрагменты получали как в бесклеточной системе синтеза, так и в бактериях *E. coli*. Предложенная нами система бактериальной продукции при росте на средах для самоиндукции позволяет получать с литра среды до 9 мг ТМ фрагментов APP природного изотопного состава и до 6 мг изотопно-меченого образца для структурных ЯМР исследований. В бесклеточной системе экспрессии выход очищенного белка составляет до 2 мг с 1 мл трансляционной смеси. В этой системе при тщательной оптимизации экспериментальных условий даже при падении выхода в 2 раза для мутантных форм ТМ фрагментов APP удается снизить в 1,5–2,7 раз стоимость ¹³C, ¹⁵N-меченого ЯМР образца. Сравнение наших результатов и методик, используемых другими лабораториями, показывает явное преимущество бесклеточной системы над бактериальной продукцией, особенно в случае изотопно-меченых ТМ фрагментов белков. Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 14-04-01603-а и СП-1856.2015.4.

N-КОНЦЕВОЙ ДОМЕН КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ТЕЛОМЕРАЗЫ ДРОЖЖЕЙ *HANSENULA POLYMORPHA*

О.А. Петрова¹, Е.В. Родина², М.Э. Зверева², В.И. Польшаков³, А.Б. Манцызов³, И. Каллио⁴, В. Ламзин⁴, О.А. Донцова^{1,2}

¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Кафедра химии природных соединений, Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ³Лаборатория магнитной томографии и спектроскопии, Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; ⁴European Molecular Biology Laboratory, c/o DESY, Hamburg, Germany

Теломераза представляет собой обратную транскриптазу, которая участвует в поддержании стабильности генома, синтезируя повторяющиеся теломерные последовательности на концах эукариотических хромосом. Теломеразная активность детектируется во всех иммортализованных клетках, например, стволовых, половых и зародышевых, однако, с другой стороны, теломераза также отвечает за неограниченное деление клеток в 80% типов раковых образований. Основными компонентами теломеразного комплекса являются теломеразная обратная транскриптаза, каталитическая субъединица (TERT или Est2 в дрожжах) и теломеразная РНК, содержащая матричный участок, комплементарный последовательности теломерного повтора (TR, TER или TLC1 в дрожжах). Для поддержания длины теломер *in vivo* требуются дополнительные компоненты, такие как Est1 и Est3. Изучению теломеразы препятствует весьма низкая стабильность её компонентов. Структурных данных для этих компонентов на настоящий момент практически нет. Известно, что белки из термостабильных организмов обычно более стабильны своих нетермостабильных аналогов. В связи с этим, в качестве модельного организма нами были выбраны термофилы дрожжи *Ogataea polymorpha* (*Hansenula polymorpha*), способные выживать при температурах до 50 градусов. Нами были идентифицированы белки TERT (Est2), Est1 и Est3, а также теломеразная РНК в геноме этих дрожжей. Мы достоверно подтвердили, что идентифицированные нами гены действительно отвечают за соответствующие компоненты теломеразного комплекса. N-концевой домен каталитической субъединицы (TEN), обладающий отдельными функциями и свойственный только для теломеразных обратных транскриптаз, был клонирован и выделен из *E. coli* в нативных условиях в достаточном для дальнейших исследований количестве. Для TEN-домена удалось получить 15N и 15N13C замещенный белок, снять спектры ЯМР, провести отнесение сигналов и определить структуру белка. Также удалось получить кристалл этого белка. Уточнение структуры ведется в данный момент. Таким образом, структура TEN-домена теломеразной каталитической субъединицы будет достоверно определена и в кристалле, и в растворе. Кроме того, были показаны некоторые свойства TEN-домена, например, взаимодействие с нуклеиновыми кислотами.

РОЛЬ БЕЛКА DDX19 В РЕГУЛЯЦИИ ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ ЧЕЛОВЕКА

Т.В. Михайлова, А.В. Шувалов, Е.З. Алкалаева

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

DDX19 – белок человека, принимающий активное участие в транспорте мРНК через ядерную пору. Его дрожжевой гомолог Dbr5 ассоциирован с полисомами в клетках и влияет на сквозное чтение стоп кодонов в штаммах с мутантными факторами терминации трансляции. Нами было продемонстрировано, что DDX19 также ассоциирован с активно транслирующими рибосомами в клетках. А с помощью реконструированной *in vitro* трансляционной системы эукариот, нам удалось показать, что DDX19 действительно регулирует терминацию трансляции путем стабилизации рибосомного терминационного комплекса. Для получения данных о молекулярном механизме этого процесса, мы выбрали условия связывания белка DDX19 с рибосомами и терминационными комплексами. Оказалось, что самые стабильные комплексы образовывались в присутствии негидролизуемого аналога АТФ – АМРРNP. Нами были получены рибосомные комплексы, содержащие DDX19 в присутствии и в отсутствии факторов терминации и нуклеотидов. В дальнейшем с помощью криоэлектронной микроскопии проводился анализ структур этих комплексов. *Работа была поддержана грантом РФФИ (15-54-74001 ЕМБЛ_а).*

КОНФОРМАЦИОННАЯ ВАРИАБИЛЬНОСТЬ ДИКОГО ТИПА И МУТАНТНОЙ ФОРМЫ ТРАНСМЕМБРАННОГО ДОМЕНА БЕЛКА-ПРЕДШЕСТВЕННИКА БЕТА-АМИЛОИДА

А.С. Урбан^{1,2}, Э.В. Бочаров², К.Д. Надеждин^{1,2}, А.С. Арсеньев^{1,2}, О.В. Бочарова² ¹Факультет биологической и медицинской физики, Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный; ²Лаборатория биомолекулярной ЯМР-спектроскопии, Институт биоорганической химии им. М.М. Шенякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Несмотря на определенные успехи в изучении патогенеза болезни Альцгеймера (БА), его начальные этапы до сих пор остаются неизвестными. Амилоидогенные Аβ-пептиды, формирующие бляшки в тканях головного мозга пациентов, являются продуктами последовательного внутримембранного протеолитического расщепления белка-предшественника бета-амилоида (ПБА). Более половины семейных мутаций в ПБА, приводящих к БА, находятся в его трансмембранных и примембранных регионах, включая металл-связывающий, и, считается, что они влияют на структурно-динамические свойства, димеризацию и протеолиз ПБА в мембране. Известно, что «Австралийская» аутосомно-доминантная мутация APP L723P ассоциирована с развитием ранней формы болезни Альцгеймера. Показано, что она приводит к увеличению секреции Аβ42 в клеточной линии СНО. Для того, чтобы установить причины влияния мутации L723P на процесс патогенного образования Аβ-пептидов, мы провели структурно-динамические ЯМР-исследования высокого разрешения дикого типа и мутантной формы фрагмента ПБА Gln686-Lys726, содержащего полноразмерный трансмембранный домен, который является изначальным субстратом для протеолиза ПБА γ-секретазой в мембране. ¹³C/¹⁵N изотопно-меченные фрагменты ПБА были получены с использованием высокоэффективных систем бактериальной и бесклеточной экспрессии и солюбилизованы в различных мембраномиметиках. Мы зарегистрировали повышенную гибкость и частичную дестабилизацию С-концевой части α-спирали мутанта L723P в сравнении с фрагментом дикого типа, что может способствовать облегченному протеолизу γ-секретазой в области ε-сайта трансмембранного домена ПБА и, в результате, увеличению скорости образования Аβ-пептидов. Также мы заметили, что «Австралийский» мутант постепенно переходит из α- в β-конформацию, и этот процесс сопровождается постепенным образованием агрегатов высокой молекулярной массы. Таким образом, мутантные фрагменты ПБА являются многообещающими объектами для изучения молекулярных механизмов начальных стадий амилоидогенеза и идентификации структурно-функциональных детерминант ПБА необходимых для понимания патогенеза БА. *Работа поддержана грантами РФФИ 14-04-01603-а и 1856.2015.*

ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗА – ПЕРВЫЙ ФЕРМЕНТ НОВОГО МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПУТИ РАЗЛОЖЕНИЯ ТИОЦИАНАТА У ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Т.В. Тихонова, С.И. Цаллагов, К.М. Поляков, Д.Ю. Сорокин, В.О. Попов

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Тиоцианат (SCN-) – токсичное, химически устойчивое соединение, образующееся как в результате природных процессов, так и как побочный продукт работы промышленных предприятий. Бактериальное разложение тиоцианата может протекать двумя путями: с разрывом связи C≡N и образованием карбонилсульфида (COS) на первой стадии или с разрывом связи C–S и образованием цианата (OCN⁻). Разложение тиоцианата по первому пути катализируется хорошо изученным Со-содержащим ферментом – тиоцианатгидролазой. Ферменты, отвечающие за цианатный путь разложения тиоцианата, неизвестны. Некоторые виды бактерий рода *Thioalkalivibrio* способны расти на среде, содержащей тиоцианат (KSCN) как единственный источник энергии, азота и серы. Увеличение содержания меди в ростовой среде стимулирует скорость потребления тиоцианата и рост биомассы. Из периплазматической фракции бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* выделен фермент тиоцианатдегидрогеназа (TcDH), катализирующий первую стадию окислительного разложения тиоцианата с образованием эквимольных количеств NCO⁻ и SO и переносом электронов на цитохромы с и искусственные акцепторы электронов с редокс потенциалом 220–250 мВ. Гены, гомологичные TcDH (идентичность выше 40%), были обнаружены в геномах бактерий разных родов и классов, включая альфа-, бета- и гамма-протеобактерии. Все аминокислотные последовательности, гомологичные TcDH, содержат 7 консервативных остатков His, предположительно ответственных за связывание металл-содержащего кофактора. TcDH представляет собой димер 2×54 кДа, каталитически активная форма TcDH содержит 3–5 ионов Cu на субъединицу, замещение ионов меди на редокс неактивные ионы цинка приводит к потере ферментативной активности. TcDH конкурентно ингибируется ионами CN⁻ и CNO⁻. Методом рентгеноструктурного анализа получена пространственная структура TcDH с разрешением до 1.45 Å. Укладка полипептидной цепи представляет собой 7-лопастный бета-пропеллер. Активный центр расположен в центральной полости бета-пропеллера. В зависимости от предварительной обработки препаратов TcDH перед кристаллизацией получены структуры, содержащие от 1 (каталитически неактивная форма) до 5 ионов меди в активном центре. Возможный механизм окисления тиоцианата обсуждается. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 14-24-00172.*

ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОЕ ПРЕДСКАЗАНИЕ СТЕРЕОСПЕЦИФИЧНОСТИ АБЗИМОВ

К.А. Коновалов *Кафедра химии природных соединений, Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Биологическая активность соединений, содержащих асимметрический центр, зачастую обусловлена лишь одним стереоизомером, поскольку природные ферменты обладают стереоспецифичностью. Фосфоорганические соединения, применяемые человеком, например, зарин – боевое отравляющее вещество, являются смесью стереоизомеров. Абзимы – антитела, проявляющие каталитическую активность, могут быть отобраны для нейтрализации фосфоорганических соединений. Эффективное применение абзимов ограничено их низкой реакционной способностью и неизвестной стереоспецифичностью. При селекции абзимов на рацемическом субстрате стереоспецифичность не контролируется, а её последующее экспериментальное определение часто сопряжено со значительными трудностями. Для преодоления ограничений экспериментальных методов, мы разработали вычислительный подход для предсказания стереоспецифичности абзимов. Подход основан на использовании метода молекулярной динамики с применением метадинамики для измерения способности каждого из стереоизомеров лиганда образовывать нековалентный комплекс с абзимом. Исходя из этих данных, строится предсказание стереоспецифичности. Подход имеет ряд преимуществ над более простыми методами, например, докинг, позволяя проследить весь путь связывания лиганда из растворителя, учитывая подвижность белка и явно учитывая растворитель. Объектом нашего исследования являлся набор абзимов – Fab фрагментов рекомбинантных иммуноглобулинов человека с экспериментально доказанной реакционной способностью по отношению к 8-метил-8-азабцикло[3.2.1]октил фенилфосфонату (ХОР). С помощью программ Gromacs 5.1.2/Plumed 2.2 были рассчитаны траектории образования нековалентного комплекса абзимов и ХОР в силовом поле AMBER99SB-ILDN. Показана стереоспецифичность в процессе комплексообразования абзимов и ХОР. На основе полученных данных были построены предсказания стереоспецифичности. Наш подход позволил правильно предсказать стереоспецифичность всех абзимов из исходного набора, которая была впоследствии подтверждена экспериментально. Предложенный подход служит отправной точкой для автоматического предсказания мутаций, которые могли бы привести к изменению стереоспецифичности.

ЯМР ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ WBSCR27, АССОЦИИРОВАННОЙ С СИНДРОМОМ ВИЛЬЯМСА

С.С. Марьяшина¹, О.А. Петрова¹, С.-F. Chang², Т.-Н. Huang³, И.А. Остерман¹, А.Б. Манцызов¹, П.В. Сергиев¹, В.И. Польшаков¹

¹МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; ²Genomics Research Center, Academia Sinica, Taipei, Taiwan; ³Institute of Biomedical Sciences, Academia Sinica, Taipei, Taiwan

Белок WBSCR27 недавно обнаружен в человеческом протеоме. Ген этого белка входит в область делеции, вызывающей тяжелое генетическое расстройство – синдром Вильямса. Анализ аминокислотной последовательности показал наличие сайта связывания S-аденозилметионина – распространенного ко-фактора метилирования. Ближайшим гомологом, найденным в ходе поиска среди анонсированных белков, оказалась метилтрансфераза рРНК WBSCR22. Это дает основания предполагать, что WBSCR27 обладает метилтрансферазной активностью. Сравнение последовательности WBSCR27 с белками из базы данных RCSB PDB показало отсутствие близких гомологов с известной структурой. Для получения структурной информации об этом белке были использованы методы спектроскопии ЯМР. Методы многомерной гетероядерной спектроскопии ЯМР были использованы для отнесения сигналов ¹³С α , ¹³С β , ¹³С', ¹Н α , ¹Н β , ¹НН и ¹⁵Н белковой цепи. Полученные значения химических сдвигов были использованы для идентификации элементов вторичной структуры белка и его динамических свойств. Обнаружена высокая подвижность N-концевого фрагмента белка, а также области 200–230 а.о. Данные о вторичной структуре и подвижности подтверждены анализом 3D спектра ¹Н-¹⁵Н HSQC-NOESY. Таким образом, на данный момент сделано отнесение большей части сигналов основной цепи белка, идентифицированы сигналы боковых цепей, определена вторичная структура и найдены фрагменты белка, обладающие повышенной подвижностью. Полученные данные будут использованы для установления структуры WBSCR27 в растворе и определения динамических свойств белковой цепи WBSCR27 методами спектроскопии ЯМР, что позволит приблизиться к пониманию деталей молекулярного механизма действия метилтрансферазы WBSCR27. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 14-14-00598).

ДВА МЕМБРАНО-СВЯЗАННЫХ СОСТОЯНИЯ OMPF ПОРИНА YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS

Е.А. Зелепуга¹, О.Д. Новикова¹, Т.И. Рокицкая², Е.А. Котова², Г.А. Набережных¹, В.И. Горбач¹, В.А. Хоменко¹, Ю.Н. Антоненко²

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток; ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Ранее мы показали, что при pH 7 OmpF порин из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* (YOmpF) в водном растворе находится преимущественно в виде тримеров, тогда как при pH 3 – в мономерной форме (Т. Rokitskaya, BBA, 2016). Обе молекулярные формы белка имеют высокое сродство к мембране, однако только связывание тримеров приводит к формированию в липидном бислое поринового канала. В то же время, образованный при нейтральных значениях pH тримерный канал порина устойчив к закислению среды, и, таким образом, процесс формирования проводящего состояния белка является необратимым. Сравнительная характеристика двух конформационных состояний YOmpF (мономерного непорообразующего и тримерного порообразующего), способных к связыванию с мембраной, была выполнена с помощью молекулярных моделей мономера и тримера порина. Расчеты с использованием программы MOE (CCG) и on-line ресурсов PPM сервера (<http://opm.phar.umich.edu/>) показали, что несмотря на незначительное изменение относительных площадей гидрофильной и гидрофобной поверхностей при образовании тримера YOmpF, включение в мембрану олигомера порина энергетически более выгодно. Так, $\Delta G_{transfer}$ для тримера белка существенно меньше (–185.3 ккал/моль) по сравнению с мономером (–55.8 ккал/моль). Определение ориентации гидрофобного (Н) и дипольного (D) моментов показало, что в мономере они находятся под углом 52°41', а в тримере – практически совпадают. Можно предположить, что в процессе олигомеризации YOmpF происходит перераспределение гидрофильных и гидрофобных областей на поверхности молекулы белка, в том числе за счет того, что часть гидрофильной поверхности мономера попадает в область межмономерного интерфейса. В результате происходят значительные изменения в направлении векторов Н и D (на 65°46' и 45°31' соответственно). Кроме того, в тримере порина YOmpF Н и D ориентированы перпендикулярно плоскости мембраны подобно суммарному дипольному моменту тримера OmpF *E. coli*, описанному в литературе. Наблюдаемое нами увеличение значений Н и D для тримера YOmpF по

сравнению с таковыми для мономера, возможно, является свидетельством того, что для проявления функциональной активности встроенному в мембрану белку необходимо взаимодействие с липидным окружением. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта № 15-1-5-004 по программе «Дальний Восток».

СТРУКТУРНАЯ АДАПТАЦИЯ ВОСЬМИГЕМОВЫХ НИТРИТРЕДУКТАЗ К ПОЛИЭКСТРЕМАЛЬНЫМ УСЛОВИЯМ

А.В. Попинаков¹, М.Ю. Антонов², Т.В. Тихонова¹, В.О. Попов¹ ¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН;

²Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, Якутск, Россия

Механизмы структурной адаптации белков полиэкстремофильных организмов к условиям обитания на данный момент остаются мало изученными, что определяет актуальность исследований данной области. В данной работе исследование механизмов структурной адаптации проводилось на примере семейства восьмигемовых нитритредуктаз (ONRs). Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей и структур ONRs из полиэкстремофилов и нормалофилов выявил следующие механизмы адаптации к полиэкстремальным условиям. Для аминокислотного состава ONRs из галоалкалифилов были показаны адаптационные стратегии, характерные как для галофилов (+E, +V, -K, +R), так и для алкалифилов (+E, -K). Кроме того, было показано увеличение содержания триптофана (+W) и фенилаланина (+F) – явление, ранее не описанное для белков из галоалкалифилов. Сравнительный структурный анализ выявил дополнительные D, E на открытой поверхности ONRs галоалкалифилов, образующие отрицательно заряженные сети на поверхности белка. Данная стратегия адаптации направлена на привлечение редких протонов в щелочных условиях и уменьшение агрегации молекул в гиперсоленых условиях. Стабильность гексамера ONR галоалкалифилов при высоком pH и солености также обусловлена усилением гидрофобно-гидрофобных межсубъединичных контактов. Стратегия увеличения доли малых гидрофобных остатков (+A+V) и уменьшения доли крупных гидрофобных остатков (-K, -I, -L), типичная для многих галофильных белков, реализуется на уровне гидрофобного кора ONRs галоалкалифилов и способствует росту конформационной подвижности, и, следовательно, активности фермента в гиперсоленом растворе. Внутримолекулярные взаимодействия между дополнительными консервативными ароматическими а.о. (+W, +F) ONRs галоалкалифилов и гемовым окружением стабилизируют молекулу и способствуют повышению гидрофобности окружения гемов. Увеличение гидрофобности белкового окружения гемов приводит к изменению редокс-потенциала гемов, изменению каталитической активности. Таким образом, проявляется уникальная стратегия адаптации ONRs галоалкалифилов, связанная с увеличением доли ароматических W, F в аминокислотном составе. Работа проведена при финансовой поддержке Российского научного фонда, соглашение № 14-24-00172.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА КОМПЛЕКСОВ ИЗ БЕЛКА VIRE2

Ю.С. Гусев, И.В. Волохина, М.И. Чумаков Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

Белок вирулентности VirE2 почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* обеспечивает перенос фрагмента ее Ti-плазмиды (одноцепочечной (оц)Т-ДНК) в геном широкого круга растений и некоторых видов животных в виде оцДНК-VirE2-VirD2-белкового комплекса. Предполагается, что белок VirE2 участвует в нескольких важных для этого процесса функциях, в том числе, образует сомоорганизующийся комплекс с оцДНК, защищает ее от эндонуклеаз эукариотической клетки, переносе оцДНК через мембрану клетки-мишени [1]. В докладе представлены данные по компьютерной оценке возможности белка VirE2 формировать комплексы, которые могут обеспечить транспорт оцДНК через модельную мембрану. Проанализированы вероятностные 3D модели комплексов из двух и четырех субъединиц белка VirE2 [2], их встройка в мембрану, которые описаны в работах [3–4]. В комплексе из двух индивидуальных белков VirE2 нами ранее обнаружена пора с диаметром канала 1.2–1.6 нм [2, 4]. В работе представлены новые данные, полученные с помощью метода полноатомной молекулярной динамики в программе Namd 2.10 с использованием силового поля CHARMM27, по исследованию модели комплекса из двух белков VirE2 при времени моделирования 50 нс. Установлено, что комплекс из двух субъединиц белков VirE2 достигает равновесного состояния к 27 нс и при анализе модели до 50 нс комплекс не распадается и остается стабильным.

1. Dumas F., Duckely M., Pelczar P., Van Gelder P., Hohn B. PNAS USA. 2001. V. 98. P. 485-490.
2. Volokhina I.V., Gusev Yu.S., Mazilov S.I., Chumakov M.I. J. Bioinf. Comput. Biol. 2012. V.10. P. e1241009.
3. Чумаков М.И., Мазиллов С.И., Гусев Ю.С., Волохина И.В. Биологические мембраны. 2010. Т. 27. № 5. С. 449-454.
4. Волохина И.В., Гусев Ю.С., Мазиллов С.И., Чумаков М.И. Биохимия. 2011. Т. 76, № 11. С. 1576-1582.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕХАНИЗМА СЕКРЕЦИИ И ДОСТАВКИ ТОКСИНА ПАТОГЕННОГО ШТАММА *BACTEROIDES FRAGILIS* К ЭУКАРИОТИЧЕСКИМ КЛЕТКАМ

Н.Б. Захаржевская, В.Б. Цветков, А.А. Ванюшкина, А.М. Варижук, Д.В. Ракитина, В.В. Подгорский, И.И. Вишняков,

Ф.В. Лисицин, Е.А. Гущина, В.М. Говорун ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия

Bacteroides fragilis является частью нормальной микрофлоры толстой кишки, однако его патогенный штамм обуславливает развитие диареи, предположительно, посредством токсина – фрагилизина. При исследовании генома *Bacteroides fragilis* не было выявлено ни одного из известных механизмов секреции, кроме везикулярного трафика. Цель работы: доказательство факта переноса токсина везикулами, а также определение физико-химических основ взаимодействия фрагилизина с липидами. Локализацию токсина в составе фракционированного клеточного лизата и везикул *Bacteroides fragilis* определяли посредством ТЭМ. Исследование липидного состава мембраны бактерии было выполнено посредством метода SHOTGUN с использованием квадрупольного времяпролетного масс спектрометра (Q-TOF Maxis, Bruker Daltonics, Germany). Моделирование и последующий докинг фосфатидилэтаноламина (PE) и фосфатидилхолина (PC) с токсином был проведен посредством программного обеспечения SYBYL X1.2 (Tripos Inc., St. Louis, USA). Анализ интенсивности флюоресценции фрагилизина при добавлении PE и PC был проведен с использованием прибора Chirascan spectrometer (Applied Photophysics). Определение коэффициента диффузии и подвижности функциональных групп липидов и белка было выполнено методом двумерной DOSY ЯМР с использованием Bruker Avance III 500 MHz NMR спектрометра. В ходе анализа везикул методом иммуноблота и иммуноглот мечення удалось выявить значительное количество токсина в зрелой форме. Исследование фракционированного лизата определило мембранную локализацию фрагилизина. Согласно данным масс-спектрометрии наиболее

представленными классами липидов мембраны являлись PC и PE. Моделирование процессов взаимодействия указанных липидов с токсином показало потенциальные гидрофобные и электростатические взаимосвязи длинноцепочечных жирных кислот липидов с активным центром белка, а также возникновение координационных связей между ионом цинка активного центра белка и кислородом, входящим в состав фосфатной и карбонильной групп липидов. Посредством метода тушения флуоресценции и ЯМР было подтверждено взаимодействие указанных липидов и токсина. Таким образом, везикулы были определены, как механизм секреции и доставки токсина к эукариотическим клеткам. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (14-24-00159).*

НАНОМАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛИ

А.В. Баранов *Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия*

Гибридные наноструктуры, состоящие из полупроводниковых коллоидных нанокристаллов (квантовых точек, КТ) и молекул с различными функциональными свойствами могут быть использованы для увеличения эффективности фотоиндуцированных функциональных свойств молекул. Здесь КТ являются высокоэффективными абсорберами световой энергии, которая может быть без потерь передана функциональному компоненту наноструктуры. В данном докладе особое внимание будет уделено методам формирования, фотофизическим свойствам и взаимодействию с биологическими объектами комплексов КТ с тетрапиррольными молекулами, которые широко используются в фотодинамической терапии (ФДТ) онкологических заболеваний. В качестве молекул выбраны, уже использующиеся в медицинской практике "Фотодитазин" (хлорин е6, Ce6) и "Фотосенс" (Al-сульфофталоганин, СФП). Рассмотрены механизмы формирования водорастворимых комплексов КТ/тетрапирролы и их возможная стехиометрия. На примере комплексов КТ CdTe с СФП и КТ CdSe/ZnS с СФП показано наличие эффективной передачи энергии фотовозбуждения от КТ к молекуле с увеличением эффективности генерации активных форм кислорода. Особое внимание уделено комплексам, формируемым из свободных от кадмия (Cd-free) КТ на основе цинка (ZnS и ZnSe), а также КТ ZnS, допированных ионами Cu и Mn, которые существенно менее токсичны. Для этих комплексов показано наличие эффективного переноса световой энергии от КТ на молекулы, а для КТ ZnSe/ZnS в комплексе с Ce6, прямо продемонстрировано увеличение эффективности ФДТ на примере клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ). В заключение, рассмотрены влияние кинетики комплексов КТ с L- и D-цистеином на эффективность их проникновения в клетки АКЭ, перспективы развития комбинированной рентгеновской и ФД терапии опухолей, а также конструктивные решения элементов для генерации активных форм кислорода на основе гетеросистем с КТ.

МАКРО-, МИКРО И НАНО-СПЕКТРОСКОПИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

В.А. Олейников^{1,2}, К.Е. Мочалов^{1,2} *¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (Московский инженерно-физический институт), Москва, Россия*

Корреляционная микроскопия приобретает все большее значение благодаря широким возможностям в плане (1) получения структурной информации с высоким пространственным разрешением; (2) получения данных о составе и функциональных свойствах методами оптической микроспектроскопии и (3) реконструкции трехмерной структуры (томография). Проблемы корреляционной микроскопии связаны главным образом с возможностью и точностью совмещения данных, получаемых методами с существенно разными значениями пространственного разрешения (от долей нанометра для электронной и сканирующей зондовой микроскопии до сотен нанометров, характерных для оптических методов). В настоящей работе рассмотрены подходы преодоления этих проблем, в частности, за счет использования методов оптической микроскопии и микроспектроскопии сверхвысокого разрешения. Описан оригинальный подход, разработанный авторами, основанный на объединении методов оптической микроспектроскопии, сканирующей зондовой микроскопии и ультрамикротомографии [1-3]. Потенциал комплексного подхода продемонстрирован на примере установления корреляций между флуоресцентными поляризационными свойствами жидкокристаллической среды, содержащей полупроводниковые флуоресцентные нанокристаллы (квантовые точки) и особенностями 3-D распределения нанокристаллов в жидкокристаллической матрице [4]. Продemonстрированы возможности микроскопии ближнего поля (Scanning Near-Field Optical Microscopy, SNOM) [3].

Подход, основанный на использовании микроскопии ближнего поля, стал основой развития методов спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) с пространственным разрешением. Совмещение методов сканирующей зондовой микроскопии с использованием эффекта усиления КР на конце иглы зондового микроскопа (Tip Enhanced Raman Scattering, TERS), позволяет с высокой точностью контролировать параметры получения TERS. В настоящей работе рассмотрены методы возбуждения/сбора излучения в локальных TERS-активных областях, а также способы формирования зондов для TERS. Представленные результаты основаны на развиваемых авторами подходах получения комплексной информации на микро- и нанометровом уровне и создании нового поколения приборов, позволяющих регистрировать, анализировать и отображать эту информацию. *Работа поддержана Министерством образования и науки РФ, ФЦП № 14.616.21.0042 уникальный идентификатор RFMEFI61615X0042.*

1. Mochalov K.E. et al, ACS Nano, 2013, 7(10), 8953-8962.
2. Mochalov K.E. et al, Physics Procedia, 2015, 73, 168-172.
3. Ефимов А.Е. и др., Письма в ЖТФ, 2016, 42(4), 9-15.
4. Bobrovsky A., et al, Adv. Mater., 2012, 24(46), 6216-6222.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОПОЛИМЕРОВ ПЛАЗМЫ И СЫВОРОТКИ КРОВИ ЖИВОТНЫХ

С.Ю. Зайцев *Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, Москва, Россия*

Рост и развитие, адаптация организма животных в разные сроки постнатального периода сопровождаются закономерными изменениями физиолого-биохимического статуса (ФБС), которые отражаются на качественном и количественном составе крови. Существует много физиолого-биохимических методов крови человека и животных. Одним из оригинальных методов для комплексной оценки изменений ФБС является измерение динамического поверхностного натяжения (ДПН) плазмы или сыворотки крови животных [1]. Значения ДПН в характеристических точках, соответствующих временам «существования»

поверхности от 0,01 до 1000 с и углы наклона кривых (тензиограмм) характеризуют процессы адсорбции поверхностно активных веществ сыворотки крови на границу раздела жидкость/воздух [1]. Эти показатели специфичны для животных разного вида, пола, возраста. Например, ДПН сыворотки крови у кобылок в возрасте 1 месяца $\sigma_1 \dots \sigma_3$ значительно (на 2...15%) ниже, а значение λ_0 (на 70...103%) выше по сравнению с таковыми для взрослых кобыл. Значение λ_0 может служить специфическим показателем, который изменяется в зависимости от пола у жеребцов и кобыл (от 7,4 до 12,9 мНм-1с1/2). Изменения биохимического состава крови, связанные со структурно-функциональным развитием животных в постнатальном онтогенезе согласуются с изменениями ДПН, что отражается величиной коэффициента корреляции. Не только у кобыл, но и у коров сильно выражена корреляция уровня белков (прежде всего – альбуминов) со значениями λ_0 , σ_0 , σ_1 . Изучение модельных систем показало, что максимальные значения ДПН определяются солевым (кальций, калий, натрий) составом сыворотки крови, а минимальные значения – постепенной адсорбцией липидов (триглицериды, фосфолипиды, холестерол) и белков (общий белок, альбумины и т.д.) из объема на границу раздела фаз. Поэтому разработка методологии определения ДПН биологических жидкостей животных, сопоставление их с модельными системами, выявление особенностей изменения в зависимости от физиологического состояния организма, особенно биохимического состава сыворотки крови, является важным направлением совершенствования методов оценки ФБС и ранней диагностики болезней животных. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №14-16-00046).*

1. Zaitsev S.Yu. Advances in Colloid and Interface Science 2016 CIS_1665 in press DOI: 10.1016/j.cis.2016.06.007

ФОРМИРОВАНИЕ ВНУТРИ- И МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ncDNA. АСМ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

Г.Е. Позмогова, А.М. Варижук, А.Д. Протопопова, Н.Ф. Баринев, Д.В. Клинов

ФНЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Внимание к изучению свойств фрагментов полинуклеотидов, способных формировать неканонические вторичные структуры (ncDNA), опосредовано, в первую очередь, их биологической значимостью. Регуляторная роль, например, G-квадруплексов, GQ (четырёхцепочечных ncDNA структур) показана сегодня для ключевых процессов биогенеза (Wickramasinghe, Arzouk et al. 2015), для механизмов развития ряда заболеваний (Haeusler, Donnelly et al. 2014; Pang, Rong et al. 2015; Simone, Fratta et al. 2015), изменения вирулентности патогенов (Harris and Merrick 2015; Pang, Rong et al. 2015). Широко исследуются различные аспекты применения GQ-олигонуклеотидов в медицине, диагностике и нанотехнологии (Pang, Rong et al. 2015; Rouleau, Beaudoin et al. 2015; Wang, Liu et al. 2015). Исследования закономерностей и схем сборки внутри- и межмолекулярных ncDNA, безусловно, требуют не только применения совокупности синтетических, физико-химических и биохимических методов, но и разработки специальных подходов.

Мы предложили новый системный метод описания молекулярной динамики формирования и дефолдинга GQ ДНК (Tsvetkov, Pozmogova et al. 2015), синтезировали широкий набор природных и оригинальных модифицированных ncDNA-олигонуклеотидов, провели AFM-исследования высокого разрешения с использованием модифицированных подложек (Klinov, Neretina et al. 2009). В результате было показано формирование моно- и мультимерных ncDNA-структур. Впервые описана самосборка протяженных ДНК GQ-«стопок» и разветвленных pH-чувствительных узлов (I-junction) ДНК, стабилизированных интеркалированными C-C⁺ парами. Анализ полученных данных позволил выявить зависимость схемы и эффективности сборки от условий ее проведения, длины петель GQ, структуры C-блока IM (I-motif) и др.; предложить термодинамически обоснованные схемы формирования IM- и GQ-ассоциатов. Понимание закономерностей формирования внутри-/межмолекулярных ncDNA и их способности к самосборке позволит уточнить наши представления о механизмах процессов рекомбинации, транслокации и др. и откроет возможности для создания новых диагностических и 3D наноконструкторских методов. *Настоящая работа поддержана грантом РНФ № 14-25-00013.*

ЭЛЕКТРОАНАЛИЗ В БИОХИМИЧЕСКИХ И БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

В.В. Шумянцева^{1,2}, Т.В. Булко^{1,2}, Е.В. Супрун¹, А.В. Кузиков¹, Л.В. Сиголаева¹, Л.Е. Агафонова¹, А.И. Арчаков¹

¹Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; ²ООО «ИБМХ – ЭкоБиоФарм», Москва, Россия

Разработаны методы электрохимического анализа в следующих областях биохимии для биомедицины: • Электрохимический анализ ферментативной активности цитохромов P450. На основе анализа электрокаталитической активности различных изоформ цитохромов P450 (2B4, 1A2, 3A4, 51b1 (стерол-14 α -деметилазы *Mycobacterium tuberculosis* CYP51b1), 11A1 (P450_{sc}), 17A1, BM3, CYP109A1) разработан метод фармакокинетического мониторинга и исследования лекарственных средств на уровне биотрансформации. Разработанный метод применим для оценки субстратного и ингибиторного потенциала цитохромов P450, а также для целенаправленной регуляции биотрансформации лекарственных веществ, путем изменения активности системы цитохрома P450. Методы количественного определения белков-кардиомаркеров в плазме крови на основе электрохимического иммуноанализа плазмы для диагностики инфаркта миокарда (ОИМ). Предел обнаружения кардиомиоглобина составляет 10 нг/мл (6×10^{-10} М). Разработан метод анализа тропонина I на основе анализа сигналов наночастиц золота или серебра с помощью инверсионной вольтамперометрии с пределом обнаружения 18 пг/мл (8×10^{-13} М). Метод регистрации биоаффинных взаимодействий аптамер–тромбин на основе анализа сигналов наночастиц золота с помощью инверсионной вольтамперометрии. Аптамеры были использованы в качестве альтернативы антителам с целью повышения чувствительности метода. Методы регистрации электрохимической активности бактериальных клеток *E. coli* JM109 для оценки антибактериальных свойств лекарственных препаратов и антибиотикорезистентности. Разработан метод анализа электрохимической активности белков и пептидов в зависимости от их аминокислотного состава и методики регистрации аминокислотных замен, модификаций и образования функционально значимых комплексов. Разработан метод электроанализа миоглобина в качестве кардиомаркера с помощью графитовых печатных электродов, модифицированных полимерными антителами к миоглобину на основе молекулярно импринтированных полимеров (МИП), полученных методом электрополимеризации. *Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и образования РФ (Соглашение № 14.576.21.0045, уникальный идентификатор RFMEF157614X0045)*

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АДДУКТОВ КСЕНОБИОТИКОВ С БЕЛКАМИ КРОВИ

В.Н. Бабаков¹, Я.А. Дубровский¹, Е.П. Подольская² ¹НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА; ²Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия

В живом организме ксенобиотики могут претерпевать различные биотрансформации, в результате окислительно-восстановительных реакций формировать аддукты с низко- и высокомолекулярными соединениями (такими как белки и ДНК). Химический канцерогенез в существенной мере инициируется модификацией ДНК генотоксическими карциногенами. Однако помимо ДНК, мишенями реакционноспособных нуклео- и электрофильных соединений являются белки и пептиды. Белковые аддукты с ксенобиотиками активно исследуются и рассматриваются как биомаркеры карциногенной или токсической дозы. Самые доступные белки крови – сывороточный альбумин и гемоглобин – являются и наиболее исследуемыми белками на способность к взаимодействию с ксенобиотиками. Аддукты с альбумином могут быть обнаружены вплоть до нескольких недель после контакта с ксенобиотиками, а с гемоглобином или другими белками эритроцитов – все время жизни эритроцитов – до 4 месяцев. Другие белки крови, специфически взаимодействующие с ксенобиотиками, также могут приобретать долгоживущие нестандартные посттрансляционные модификации, сохраняющиеся все время жизни белка. Модифицированные аминокислоты в белковой последовательности – стабильный индикатор взаимодействия белка с ксенобиотиком, который зависит от третичной и четвертичной структуры белка; и этот показатель является важным признаком для дальнейшей диагностики. Разработаны процедуры целевого и обзорного масс-спектрометрического анализа с помощью методов ВЭЖХ-МС/МС и МАЛДИ-МС/МС аддуктов сывороточного альбумина и гемоглобина человека с ксенобиотиками различной химической природы. Предложены подходы к получению стандартов аддуктов белков с ксенобиотиками для дальнейшего использования в целевом анализе. Предлагаются подходы к аффинному концентрированию белков, специфически взаимодействующих с ксенобиотиками, на примере холинэстераз плазмы крови и эритроцитов. По масс-спектрометрическому анализу пептида активного центра холинэстераз, возможна детекция ингибитора фермента даже при уровне ингибирования менее 1%. Масс-спектрометрическое определение аддуктов ксенобиотиков с белками крови и разработанные подходы к их определению могут применяться различных областях биомедицины, токсикологии, фармакологии и судебной медицины.

ФОСФОЛИПАЗА A2. ОТСЛЕЖИВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С МЕМБРАНОЙ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ

И.А. Болдырев, Д.С. Третьякова, А.С. Алексеева, Ю.Н. Уткин, Е.Л. Водовозова

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Фосфолипаза A2 (ФЛА2) – фермент гидролизующий сложно-эфирную связь фосфолипида в sn-2 положении. Большой интерес к ФЛА2 связан с её важной ролью в развитии воспалительных процессов в организме. Хотя фермент к настоящему времени изучен достаточно подробно, механизм его взаимодействия с мембраной, в которой находится субстрат-фосфолипид, изучен весьма слабо. С одной стороны, это обусловлено сложным характером взаимодействия — за связывание с мембраной и за гидролиз липидов в ФЛА2 отвечают разные участки. С другой стороны, имеющаяся методическая база позволяет отслеживать гидролиз липидов в мембране, но не позволяет фиксировать само взаимодействие фермента с мембраной. Целью нашей работы было исправить этот методический пробел и создать систему отслеживания взаимодействия ФЛА2 с мембраной. Мы разработали два флуоресцентных зонда — меченные аналоги фосфатидилхолина, которые представляют собой высокоэффективную донорно-акцепторную пару. В качестве донора выступает 1,3,5,7-тетраметил-BODIPY флуорофор (максимум испускания 505 нм). В качестве акцептора — (2,3;5,6-бисциклогексил)-BODIPY (максимум испускания 545 нм). Радиус Фёрстера для этой пары флуорофоров составляет 52 Å. Зонды спроектированы так, что их структуры отличаются незначительно, поэтому их поведение в мембране сходно, а латеральное распределение равномерно. Эффективность переноса энергии между зондами определяется расстоянием между ними. В интактной мембране это расстояние не меняется – неизменным остается и уровень флуоресценции. Если с мембраной что-то происходит, то расстояние между зондами изменяется и сигнал флуоресценции реагирует на это изменение. Новые зонды позволяют отслеживать роль фазового состояния мембраны и действие ингибиторов ФЛА2. Вместе с этим новые зонды позволяют получать новую информацию о взаимодействии фермента с мембраной. Так, с их помощью нам удалось обнаружить негидролитическую активность гетеродимерных фосфолипаз из яда гадюки Никольского. Эти фосфолипазы связываясь с поверхностью мембраны с помощью двух центров связывания искривляют поверхность мембраны и, таким образом, разрушают упаковку липидов.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГИДРАТАЦИИ МОЛЕКУЛЫ ВИРУСА ГРИППА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ И АГРЕГАТАХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТА НЕЙРАМИНИДАЗЫ

Н.С. Гребёнкина, Н.А. Контаров, Н.В. Юминова *НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия*

Известно, что функционирование многих белков и ферментов зависит от степени гидратации их поверхностей. Так, Ю.И. Хургиным с соавторами была показана зависимость активности альфа-химотрипсина от величины упругости паров воды. О влиянии гидратации на функциональную активность вирусных антигенных белков на сегодняшний день ничего неизвестно. Гидратация может оказывать влияние на связывание антигенного белка с рецептором «клетки-мишени», влиять на интерпретацию данных по определению активности антигенного белка. В наших исследованиях в качестве модели поверхностного антигенного вирусного белка была выбрана нейраминидаза (NA) вируса гриппа. С помощью модели адсорбции Брунауэра–Эммета–Теллера (БЭТ) рассчитаны величины монослоя воды α при различных значениях упругости паров воды. Из полученных изотерм БЭТ можно сделать вывод о наличии гистерезиса, заключающегося в различном значении монослоя α при сорбции и десорбции воды с поверхности фермента, что связано, вероятно, с высокой степенью кооперативности образующейся гидратной оболочки. Таким образом, для NA вируса гриппа показана зависимость ферментативной активности от степени гидратации поверхности фермента. Изучение закономерностей катализа ферментами, солюбилизованными в органических растворителях с помощью обращенных мицелл поверхностно-активных веществ (ПАВ) позволяет выявлять пути регуляции активности данного фермента. Введение воды в систему обращенных мицелл изменяет степень их

гидратации, которая определяется следующим образом: $\omega_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{ПАВ}]$ Зависимость каталитической активности НА вируса гриппа, встроенной в систему обращенных мицелл из натриевой соли диизооктилового эфира сульфоянтарной кислоты (аэрозоль), от ω_0 имеет колоколообразный вид с максимумом активности фермента. Степень гидратации фермента в системе обращенных мицелл зависит от молекулярной массы белковой молекулы фермента и радиуса полости мицеллы. Указанные зависимости известны для молекул фермента, имеющих сферическую форму, однако НА вируса гриппа имеет форму близкую к эллиптической. В таком случае оптимальное значение ω_0 зависит от типа упаковки молекул ПАВ в мицелле. Нами проведены исследования активности НА от ω_0 для трех типов упаковки ПАВ. Наибольшее значение активности наблюдалось для мицеллярной упаковки ПАВ в мицеллах.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОАЛМАЗОВ И НАНО-КОНЬЮГАТОВ С ПРОТЕИНАМИ С КЛЕТКАМИ HELa МЕТОДАМИ СВЕТОВОЙ И ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Г.Н. Руденская, С.А. Гольшев, Д.М. Быстров, Н.М. Иванов *Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Конъюгаты протеолитических ферментов с нано-алмазами – НА-химотрипсин и НА-папаин – были впервые синтезированы карбодиимидным методом. По данным аминокислотного анализа включение белка составляет 7-12% по массе. ζ -потенциал частиц положительный, в то время, как потенциал клеток – отрицательный. Протеолитическая активность конъюгатов – 35-40% по сравнению с чистыми ферментами. Химотрипсин – фермент класса гидролаз, относящийся к клану PA-S1 сериновых протеаз, в активном центре которых находится серин. Фермент расщепляет пептидные связи в белках и пептидах, образованные карбоксильными группами ароматических аминокислот. Папаин – растительный фермент класса гидролаз, относящийся к клану SA-C1 цистеиновых протеаз, содержит в активном центре цистеин и обладает широкой специфичностью. Он расщепляет белки, пептиды, амиды и сложные эфиры основных и гидрофобных аминокислот. Действие исследуемых ферментов на клетки проявляется в изменении формы клеток – плоские, прикрепленные к подложке и плотно контактирующие друг с другом клетки становятся сферическими и при длительном воздействии ферментов отделяются от подложки. Предоставленные для исследования НА представляют собой частицы диаметром около 5 нм, в гидрозоле существующие в виде агрегатов размером порядка 30-50 нм. Конъюгаты НА-протеаза формируют крупные агрегаты, размеры которых могут приближаться к одному микрону. НА способны к флуоресценции, как в свободном состоянии, так и в связи с протеолитическими ферментами. Спектр испускания содержит два максимума в области 490-495 нм и 575-580 нм. В синей части спектра флуоресценция не обнаружена. Конъюгаты НА-протеаза оказывают на клетки такое же действие, как и свободные ферменты. Атаке подвергаются белки, экспонированные во внешнюю среду, в том числе – белки адгезии к подложке и белки межклеточных контактов. НА не токсичны, не подавляют пролиферацию клеток. Проникновение НА в клетки изучали с применением электронного микроскопа. Показано, что при этом задействован клатрин-зависимый путь эндоцитоза. Процесс требует более трех часов, но менее одних суток, а спустя сутки после внесения НА выявляются во вторичных лизосомах. *Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № НК-12-14-00709/14 на приборах, закупленных по программе развития МГУ им. М. В. Ломоносова ПНР5.13.*

ТРАНСПОРТНЫЙ БЕЛОК ГОРДЕИВИРУСА ФОРМИРУЕТ *IN VITRO* ВИРУСО-ПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ

В.В. Макаров, С.С. Макарова, А.В. Махотенко, Н.О. Калинина

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Транспортный белок гордеивирюсов, кодируемый первым геном тройного блока транспортных генов (белок ТБГ1), взаимодействует *in vivo* с вирусными РНК и образует рибонуклеопротеидные (РНП) частицы неизвестной структуры, предполагаемую форму для распространения вирусного генома в инфицированных растениях. Известно, что белок ТБГ1 полупатентного гордеивирюса мятлики состоит из трех доменов: структурированного С-концевого с активностью НТФазы/хеликазы, полностью неупорядоченного N-концевого и частично неупорядоченного внутреннего домена. Показано, что полноразмерный белок ТБГ1 способен *in vitro* к мультимеризации/самосборке в протяженные высокомолекулярные комплексы, а в присутствии РНК формирует нитевидные РНП частицы сходные по морфологии и размерам с вирионами спиральных нитевидных вирусов растений. Продемонстрированы структурные перестройки, возникающие во внутреннем домене белка ТБГ1 при взаимодействии с нуклеиновыми кислотами. Сравнительный анализ физико-химических свойств отдельных доменов белка ТБГ1 выявил, что внутренний домен выполняет основную структурную функцию во взаимодействиях молекул белка между собой и с РНК в процессе сборки вирусно-подобных частиц. Формирование транспортной формы генома гордеивирюсов продемонстрировано впервые. Предложена модель образования невирионной РНП частицы.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-24-00007.

ВРЕМЕННЫЕ КОМПОНЕНТЫ СПЕКТРА СОБСТВЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ КАРБОКСИАНИГДРАЗЫ Б НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ДЕНАТУРАЦИИ

О.О. Лашук¹, М.А. Герасимова¹, Б.С. Мельник², Е.В. Немцева^{1,3} *¹Сибирский федеральный университет, Красноярск; ²Институт белка РАН, Пушкино; ³Институт биофизики СО РАН, Красноярск, Россия*

Среди современных экспериментальных методов изучения фолдинга, денатурации белковых глобул, белок-белковых взаимодействий, и других биологических процессов особый интерес представляют методы флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением, обладающие высокой чувствительностью к изменению структуры молекул под влиянием внешних и внутренних факторов. Данная работа посвящена изучению спектральных компонент собственной люминесценции карбоксинагидразы Б, характеризующихся определенным временем жизни флуоресценции, на разных стадиях равновесного разворачивания белка. Были изучены две формы белка: дикий тип (WT) и одиночный мутант (L139A). Для регистрации флуоресценции белков при стационарном и импульсном возбуждении использовали спектрофлуориметр Fluorolog 3–22 (Horiba Jobin Yvon, США). Спады интенсивности флуоресценции регистрировали методом счета фотонов с временной корреляцией (источник возбуждения – импульсный диод NanoLED, максимум излучения – 296 нм). Измерения проводили в диапазоне 305–419 нм с временным разрешением 7 пс/канал. Стадии денатурации моделировали различными концентрация-

ми мочевины в диапазоне 0 – 7,5 М. Получено, что оба белка характеризуются идентичными спектральными параметрами как в нативном, так и денатурированном состоянии, но для L139A переход начинается раньше, чем для WT (4,1 vs 5,5 М мочевины). Люминесценция белков содержит два основных компонента, с временами жизни $\tau_1 \approx 5$ нс и $\tau_2 \approx 1$ нс и относительными вкладами $\alpha_1 \approx 80\%$ и $\alpha_2 \approx 15\%$, соответственно. Денатурация приводит к незначительному уменьшению τ_1 и заметному увеличению τ_2 для обоих белков, при этом вклады компонент приблизительно выравниваются. Данные изменения сопровождаются bathochромными сдвигами спектральных компонент, соответствующих каждому времени жизни. Изменения характеристик компоненты с τ_2 начинаются раньше, чем регистрируемый сдвиг стационарного спектра флуоресценции L139A (при концентрации мочевины $< 4,1$ М). Таким образом, сопоставление стационарных и время-разрешенных компонент спектра белков показало, что последние более чувствительны к изменению конформационного состояния белков. Исследование выполнено при частичной поддержке Российского научного фонда (проект №16-14-10115).

Исследование выполнено при частичной поддержке Российского научного фонда (проект №16-14-10115).

СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БИЛИВЕРДИНА В СОВРЕМЕННЫХ БЛИЖНЕ-ИНФРАКРАСНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ МАРКЕРАХ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФИТОХРОМОВ

Олеся В. Степаненко¹, Ольга В. Степаненко¹, К.А. Румянцев^{1,2}, И.М. Кузнецова¹, К.К. Туроверов¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия; ²Медицинский Колледж им. Альберта Эйнштейна, Нью-Йорк, США

Ближне-инфракрасные (NIR) флуоресцентные маркеры (FPs) на основе бактериальных фитохромов (BphPs) в комплексе с их природным лигандом, биливердином (BV), востребованы для прижизненной визуализации клеточных процессов в животных. NIR FPs обладают поглощением и флуоресценцией в ближне-инфракрасной области спектра, где ткани животных имеют наибольшую прозрачность из-за низкого фоновое свечения тканей, меньшего светорассеяния и поглощения возбуждающего света. NIR FPs состоят из двух доменов, PAS и GAF, которые необходимы для связывания хромофора, при этом BV ковалентно связан с консервативным для природных BphPs остатком Cys в N-концевом участке PAS домена и встроены в карман GAF домена. Недавно, на примере белка BphP1-FP была показана возможность ковалентного присоединения BV к остатку Cys в консервативном -SPXH- участке GAF домена. Существенные для понимания спектральных свойств BphPs данные были получены при исследовании мутантных форм димерных NIR FPs, iRFP670, iRFP682 и iRFP713, имеющих цистеиновые остатки, способные связывать биливердин, как в PAS так и GAF доменах (Cys 15 и Cys 256, соответственно), имеющих эти цистеиновые остатки только в одном из этих доменов, и не имеющих этих цистеиновых остатков. Мы показали, что при взаимодействии димерных NIR FPs наблюдаются межмономерные и междоменные аллостерические эффекты, препятствующие или способствующие ковалентному связыванию BV. Исследование спектральных свойств мутантных форм мономерного NIR FP, BphP1-FP, с различной локализацией цистеиновых остатков позволило подтвердить данные, полученные для димерных NIR FPs. Интересной особенностью в структуре BphPs является наличие узла с 4-мя пересечениями полипептидной цепи, в формировании которого вовлечены PAS и GAF домены. Исследование процессов разворачивания-сворачивания димерных NIR FPs, с различной локализацией цистеиновых остатков, с которыми ковалентно связан хромофор, и NIR FPs, не способных связывать хромофор ковалентно, показало, что, вне зависимости от локализации остатка Cys, наличие ковалентно связанного хромофора и необходимость его упаковки в белковую глобулу препятствует правильному фолдингу белков данного класса и вызывает их агрегацию, узел не препятствует эффективному сворачиванию NIR FPs. *Работа поддержана грантом РФФИ 16-04-01515 и ФАНО.*

ОТБОР ДНК-АПТАМЕРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГЕКСОГЕНА

Н.В. Комарова, А.Е. Кузнецов НПК «Технологический центр», Москва, Россия

Аптамеры – короткие фрагменты одноцепочечной ДНК, РНК или пептидов, обладающих способностью избирательно связываться с определёнными молекулами-мишенями, всё чаще применяются для количественного и качественного анализа самых разнообразных соединений. Рост популярности аптамеров связан с их универсальностью, относительной стабильностью и лёгкостью синтеза. Для отбора аптамеров чаще всего применяется подход SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment), суть которого заключается в циклическом обогащении библиотеки случайных последовательностей ДНК последовательностями, обладающими афинностью к целевому соединению. В данной работе впервые были получены ДНК-аптамеры, способные образовывать комплекс с молекулами гексогена. Для отбора аптамеров был использован подход capture-SELEX, предполагающий обратимую иммобилизацию библиотеки случайных последовательностей ДНК на твёрдом носителе с помощью гибридизации на коротких комплементарных ДНК-зондах. Зонды, в свою очередь, были иммобилизованы на магнитных наночастицах, покрытых стрептавидином, с помощью биотиновой метки. При инкубировании с раствором гексогена те последовательности, которые способны образовать с ним комплекс, переходили в раствор, а остальные оставались связанными с носителем за счёт гибридизации с комплементарным зондом. В последовательности ДНК-библиотеки была введена флуоресцентная метка, позволявшая проводить количественное определение вышедшей в раствор ДНК. Отобранные после инкубирования с мишенью последовательности амплифицировали, используя флуоресцентно-меченый прямой и удлинённый обратный праймер. Затем смысловую и антисмысловую цепи ДНК разделяли по размеру в денатурирующем ПААГ. Смысловую цепь ДНК выделяли из геля и использовали для проведения нового цикла инкубирования с мишенью и разделения связавшихся и несвязавшихся последовательностей. Сигналом для окончания отбора являлось прекращение роста количества ДНК, элюируемой при инкубации с мишенью. После 8 этапов отбора последовательностей продукт ПЦР-амплификации клонировали и секвенировали. Анализ более 80 клонов позволил отобрать 5 последовательностей, предположительно обладающих способностью связываться в комплекс с гексогеном. Отобранные последовательности были химически синтезированы. Для этих последовательностей флуоресцентным методом и методом изотермической титрующей калориметрии были измерены константы диссоциации комплекса аптамер-мишень. В результате были установлены две последовательности аптамеров к гексогену, константы диссоциации которых лежат в микромолярном диапазоне. Полученные аптамеры могут быть использованы для разработки методов детекции гексогена. *Работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации (соглашение № 14.574.21.0114, уникальный идентификатор проекта № RFMEFI57414X0114).*

СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА МЕТАНОБАКТИНА ИЗ *METHYLOCOCCUS CAPSULATUS* (ШТАММ М)

Л.В. Авдеева, Н.С. Горячев, Р.И. Гвоздев *Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка, Россия*

Метанокисляющие бактерии представляют собой единственные биокаталитические системы, осуществляющие аккумуляцию и трансформацию углерода и энергии метана. Недавно было открыто, что метанотрофы синтезируют низкомолекулярный медь-связывающий полипептид, названный метанобактином. В настоящее время наиболее изучен метанобактин из *Methylosinus trichosporium* OB3b. Целью данной работы было изучение флуоресцентных свойств метанобактина из *Methylococcus capsulatus* (штамм М). Выделение метанобактина осуществляли из культуральной жидкости *M. capsulatus* (М) методом жидкостной хроматографии на колонке с носителем Diaion HP20 (Supelco). В отличие от спектров поглощения, спектры флуоресценции выделенного метанобактина ($\lambda_{ex} = 280, 330$ и 400 нм) показали относительно интенсивность и свидетельствуют о наличии имидазольного и/или оксазольного колец в составе метанобактина. Наличие одного или обоих этих колец требует структурного подтверждения. Спектр флуоресценции метанобактина при $\lambda_{ex} = 280$ нм отличается от спектра флуоресценции тирозинового остатка (отсутствует максимум при 310 нм), который характерен для спектра метанобактина из *M. trichosporium* OB3b. Вероятно, тирозин отсутствует в составе метанобактина из *M. capsulatus* (М). Было изучено влияние ионов $Cu(II)$, $Fe(III)$, $Mg(II)$ и $Zn(II)$ на флуоресцентные спектры метанобактина при титровании метанобактина ($pH = 5,0$) растворами сульфатов перечисленных металлов. Метанобактин интенсивно комплексуется $Cu(II)$, вследствие чего наблюдается тушение флуоресценции при всех длинах волн возбуждения. Незначительное тушение флуоресценции наблюдается и при титровании $Fe(III)$. При этом не наблюдается тушения флуоресценции при титровании $Mg(II)$ и $Zn(II)$. Но при титровании $Zn(II)$ наблюдается незначительное повышение интенсивности флуоресценции при $\lambda_{ex} = 400$ нм. Подобный эффект наблюдался и для метанобактина из *M. trichosporium* OB3b, но при двух $\lambda_{ex} = 280$ и 390 нм. Такая катион индуцированная флуоресценция может наблюдаться при удалении или разделении внутреннего тушителя путем связывания катионов или через связывание катионов с внутренним тушителем. Таким образом, флуоресцентные свойства метанобактина из *M. capsulatus* (М) (класс γ -протеобактерий) отличаются от широко изученного метанобактина из *M. trichosporium* OB3b (класс α -протеобактерий).

ВЛИЯНИЕ СЕРЕБРЯНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА ФОТОЦИКЛ БАКТЕРИОРОДОПСИНА

В.А. Олейников^{1,2}, К.Е. Мочалов^{1,2}, Д.О. Соловьева^{1,2}, А.А. Чистяков^{1,2}, Е.П. Лукашев³, И.Р. Набиев^{2,4}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²Национальный исследовательский ядерный университет "МИФИ" (Московский инженерно-физический институт); ³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; ⁴Реймский Университет, Шампань-Арден, Реймс, Франция

Развитие нанотехнологий ведет к использованию нано- и микроразмерных объектов в различных областях, в частности, в медицинской диагностике и терапии. Взаимодействие нанообъектов с клетками происходит через клеточные мембраны, поэтому изучение взаимодействия наночастиц с мембранами и мембранными белками представляется важным. Несмотря на успехи в этой области, многие вопросы остаются неясными. Настоящая работа посвящена исследованию взаимодействия серебряных наночастиц ($AgNCH$) с пурпурными мембранами (ПМ) из *Halobacterium salinarum*, содержащими светочувствительный белок бактериородопсин (БР) с хромофором ретиналем [1–2].

Исследования влияния $AgNCH$ на фотоцикл БР выполнены методом флеш-фотолиза. Обнаружено, что $AgNCH$ ускоряют фотоцикл БР дикого типа. Сопоставлены данные по влиянию $AgNCH$ на БР дикого типа и на его мутантную форму D96N. Благодаря замене аминокислотного остатка аспарагиновой кислоты в положении 96 на аспарагин, из белка удален донор протона, необходимый для быстрого завершения фотоцикла БР. В результате, протон, необходимый для завершения фотоцикла, должен поставляться с поверхности мембраны. Это позволяет оценить влияние $AgNCH$ на процессы проникновения протонов внутрь ПМ. Длительность процесса транспорта протона с поверхности мембраны до основания Шиффа ретиналя, увеличивает время жизни депротонированной М-формы белка. Обнаружено, что в результате взаимодействия $AgNCH$ с ПМ длительность фотоцикла дикой формы БР уменьшается, а у мутанта D96N, наоборот, увеличивается. Можно полагать, что в обоих случаях NCH модифицируют зарядовое состояние поверхности ПМ таким образом, что электростатическое поле ускоряет движение протонов выходящих из ПМ и замедляет протоны, движущиеся по направлению внутрь ПМ.

Оптимизированы условия получения ГКР спектров как дикой формы БР, так и его мутанта D96N. Показано, что в ГКР-активных областях (так называемых "горячих" точках) $AgNCH$ существенно изменяют свойства БР. Фотоцикл БР в ГКР-активных областях полностью подавлен. При этом, воздействие $AgNCH$ «замораживает» форму БР, фиксируя молекулу в том состоянии, в котором она находилась в момент инкубации в $AgNCH$.

Обнаруженные особенности вносят вклад в понимание процессов взаимодействия NCH с мембранным белком БР и могут иметь существенное значение для создания таких оптоэлектронных гибридных систем с участием БР, в которых параметры его фотоцикла могут контролироваться с помощью NCH . *Исследование выполнено при поддержке грантов РФФИ: проекты 15-04-05922 и 15-29-01193 и Программы Президиума РАН №1 "Наноструктуры"*

1. Олейников В.А. и др., // Оптика и спектр. 2016, 121(2), 227-237.

2. Mochalov K. et al., Materials Today: Proceed. 2016, 3, 502-505.

СОЗДАНИЕ РАЦИОМЕТРИЧЕСКОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИНДИКАТОРА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА ОСНОВЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМОГО СЕНСОРА NEONOXE

А.С. Реваян, Ю.Г. Ермакова, В.В. Белоусов

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

К настоящему времени для детекции пероксида водорода, выступающего в качестве сигнальной молекулы во многих клеточных процессах, были созданы различные генетически кодируемые флуоресцентные индикаторы, одним из которых является NeonOxE, относящийся к линии сенсоров HyPer. NeonOxE – интенсифицируемый сенсор для детекции пероксида водорода, который обладает высоким динамическим диапазоном сигнала и низкой pH-чувствительностью, однако, для него характерен спектр зеленых флуоресцентных белков с единственным пиком возбуждения флуоресценции. Рациометрические сенсоры предоставляют ряд ощутимых преимуществ по сравнению с интенсифицируемыми при микроскопии живых кле-

ток. Таким образом, целью настоящей работы стало получить радиометрическую версию NeonOxE. Производные NeonOxE были получены с помощью случайного мутагенеза. При последующем скрининге библиотек с использованием спектрофлуориметрии была обнаружена радиометрическая версия NeonOxE с выраженным максимумом пика в спектре возбуждения флуоресценции при 408 нм и определена соответствующая мутация. Кроме того, были измерены спектральные характеристики полученного мутанта, включая квантовый выход и pH-чувствительность, которые оказались сопоставимы с аналогичными значениями для исходной формы NeonOxE. Мутант был также проэкспрессирован в эукариотических клетках линии НЕК293NT, где продемонстрировал в 4 раза менее контрастный сигнал по сравнению с исходной формой. В дальнейшем планируется повысить динамический диапазон полученного сенсора. При условии устранения имеющегося недостатка, мутантная версия NeonOxE имеет все шансы стать одним из наиболее популярных индикаторов пероксида водорода из известных на сегодняшний день. *Работа поддержана грантами РФФИ 15-34-20805 и 15-54-74003.*

ТЕРМОГЕНЕТИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ НЕЙРОНОВ С КЛЕТОЧНЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ

Ю.Г. Ермакова¹, А.А. Ланин^{2,3,4}, И.В. Федотов^{2,3,4}, М.В. Рошин⁵, Д. С. Кулик^{2,6}, Ю.А. Богданова¹, И.В. Кельмансон¹, А.Г. Шохина¹, Д.С. Билан¹, Д.Б. Староверов¹, Е.С. Никитин⁵, А.М. Жёлтиков^{2,3,4}, В.В. Белоусов¹

¹Институт биологической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²Физический факультет, МЛЦ, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; ³Кафедра физики и астрономии, Техасский университет A&M, США; ⁴Российский квантовый центр; ⁵Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия; ⁶Запорожская государственная инженерная академия автоматизированных систем управления технологическими процессами, Запорожье, Украина

Оптогенетика представляет собой группу методов, направленных на активацию индивидуальных нейронов с помощью видимого света, и является универсальным методом для изучения высшей нервной деятельности. Но оптогенетический подход имеет некоторые недостатки: высокое поглощение активирующих длин волн биологическими тканями, низкая проводимость каналородопсинов, и, следовательно, необходимость их высоких уровней экспрессии в образцах, а также фототоксичность излучения видимого спектра. Термогенетика представляет собой альтернативный метод, позволяющий решить часть этих проблем: активация клеток достигается за счет термоактивируемых каналов TRP.

В нашей работе мы провели активацию нейронов, экспрессирующих TRPA1 змей ИК-излучением совместно с температурным контролем образца с помощью оптоволоконной термометрии. Мы провели регистрацию электрофизиологической активности методом пэч-кламп мышечных нейронов в культуре, трансфицированных TRPA1-P2A-tdTomato. Подпороговые повышения температуры с помощью низкой мощности ИК-лазера приводило к подпороговой деполяризации; повышение температуры до пороговой ($27,8 \pm 0,6^\circ\text{C}$; $38,5 \pm 0,7$) приводило к возникновению одного потенциала действия на один лазерный импульс. Ионный ток возникал в течение 1–2 мс с момента подачи стимула, ПД формировался в процессе 30–35 мс с начала активации, что сравнимо со скоростью работы оптогенетических каналов ChR. При импульсной стимуляции нейронов с частотой 15 Гц наблюдалась генерация единичного ПД в ответ на каждый стимул, что говорит о способности TRPA1 декодировать различные стимулирующие частоты. Также была проведена активация двухдневных личинок Zebrafish, экспрессирующих TRPA1 в соматосенсорных нейронах. При активации личинки локальным ИК 1440 нм до пороговой температуры в течение 288 ± 8 мс личинка демонстрировала поведение избегания. Скорость и эффективность стимуляции зависела от мощности ИК-излучения: на мощности 12 мВ мы индуцировали мышечные сокращения только у 23% исследуемых эмбрионов, в то время как стимуляция мощностью 30 мВ приводила к стимуляции 93% личинок. Таким образом, TRPA1 змей являются универсальным инструментом, пригодным для модуляции активности различных биологических систем. *Работа поддержана грантом РФФИ № 14-14-00747.*

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ВИРУС ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ СПОСОБЕН СИНТЕЗИРОВАТЬ ЗОЛОТЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ IN VITRO

В.В. Макаров¹, А. Лав², О. Синицына³, И.А. Яминский³, Н.О. Калинина², М.Э. Тальянский³

¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия; ²Институт имени Джеймса Хаттона, Данди, Великобритания; ³Физический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Биобезопасность и экологическая чистота производства металлических наночастиц, применение которых во многих секторах экономики растет значительными темпами, являются актуальной проблемой. Химические и физические методы, применяемые для получения наночастиц, часто дороги и потенциально опасны для окружающей среды. В последнее время для «зеленого» синтеза наночастиц металлов применяются подходы, сочетающие использование экстрактов растений с добавлением биоматриц – пептидов и белков, аминокислотная последовательность и структура которых оптимизированы для эффективной продукции наночастиц. Выступать индуктором синтеза металлических наночастиц способны как короткие пептиды, так и высокомолекулярные биоматрицы, такие, как вирусы и вирусоподобные частицы. В качестве подобной биоматрицы для синтеза металлических наночастиц нами был создан и охарактеризован рекомбинантный вирус табачной мозаики (ВТМ), на поверхности которого экспонирован пептид с метал-связывающей активностью (МВР) и продемонстрировано, что в отличие дикого типа (WT) ВТМ, эта конструкция может привести к образованию дискретных наночастиц золота диаметром (10–40 нм) при смешивании с 3 мм тетрахлорауратом калия. Использование различных аналитических физико-химических подходов показало, что эти наночастицы были стабильными и металлическими по своей природе. Учитывая, что МВР ВТМ может производить металлические наночастицы в отсутствие химических восстановителей, он может активно применяться в зеленом производстве металлических наноматериалов.

КРАСНЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ СЕНСОР СОСТОЯНИЯ ПУЛА ГЛУТАТИОНА

А.Г. Шохина, А.И. Костюк, В.В. Белоусов, Д.С. Билан

Институт биологической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Глутатион – трипептид, имеющий две формы: восстановленную (GSH) и окисленную (GSSG). Глутатион способен обратимо переходить из одной своей формы в другую и выполнять роль редокс-буфера в клетке, поддерживая большую часть цистеинов клеточных белков в восстановленном состоянии. Соотношение концентрации восстановленной формы глутатиона

к концентрации его окисленной формы (GSH/GSSG) является важным показателем, который отражает редокс-статус клетки, влияющий на большинство протекающих в ней процессов. В настоящий момент разработан ряд генетически кодируемых редокс-сенсоров на основе вариантов зеленого флуоресцентного белка. Однако область применения таких индикаторов ограничена, поскольку спектр их эмиссии перекрывается со спектрами множества других биосенсоров различной специфичности. Расширение палитры подобных индикаторов облегчит одновременное изучение нескольких параметров редокс-процессов *in vivo*. В данной работе мы представляем флуоресцентный красный генетически кодируемый индикатор внутриклеточного соотношения GSH/GSSG – roKate. С помощью roKate можно регистрировать колебания соотношения GSH/GSSG в клетке в режиме реального времени. RoKate представляет собой химерный белок, N-конец которого расположен человеческий глутаредоксин-1 (Grx1), посредством гибкого линкера соединенный с красным флуоресцентным белком mKate2. В аминокислотной последовательности mKate2 остатки A141 и R198 заменены на цистеины, которые в данной системе находятся в равновесии с пулом глутатиона. Данный биосенсор развивает быстрый ответ на микромолярные концентрации GSSG в избытке GSH. Так, roKate демонстрирует двухкратное снижение интенсивности флуоресценции при 585 нм в присутствии избытка окисленного глутатиона. Максимум эмиссии roKate расположен в дальнекрасной области при 624 нм, что делает его удобным инструментом для изучения прижизненных редокс-процессов на уровне целого организма. Флуоресценция в красной области спектра также делает roKate пригодным для комбинирования с различными зелеными индикаторами – НуPer, Grx1-roGFP2 и другими. *Работа поддержана грантами Президента РФ МК-6339.2016.4 и РФФИ 15-34-20805.*

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ СЫВОРОТКИ МОЛОКА ЧЕЛОВЕКА

Л.Е. Леонова, Ю.Н. Обухов, С.Е. Фатеева, И.В. Курдюмова

Кафедра биохимии, Биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Молоко человека является уникальным элементом рациона детей первого года жизни. Существуют значительные различия в темпах роста и развития, а также в склонности к заболеваниям между детьми на грудном вскармливании и детьми на искусственном вскармливании. Это объясняется тем, что белковый компонент молока человека выполняет не только питательные функции, но еще обеспечивает защиту ребенка, и контролирует его развитие. Функционально важные белки молока сохраняют свою биологическую активность в агрессивных условиях желудочно-кишечного тракта, в том числе за счет образования высокомолекулярных комплексов. Цель данной работы – изучение состава высокомолекулярных белковых комплексов сыворотки молока человека больше 50 кДа. Использовали образцы сыворотки молока человека и экстракты молока человека, полученные методом ультрафильтрации. На микроколонках для ультрафильтрации Vivaspin 2 (100 кДа) были получены фракции сыворотки молока человека и экстрактов молока человека раствором высокой ионной силы (2M NaCl) и раствором высокой ионной силы с уксусной кислотой (2M NaCl, pH 3). В камерах для ультрафильтрации фирмы «Amicon» на мембранах фирмы «Millipore» (50 кДа) были получены фракции сыворотки молока человека и экстрактов молока человека уксусной и соляной кислотами до pH 3. Все полученные фракции были отмыты на мембранах от свободных низкомолекулярных компонентов и обессолены. Данные препараты были исследованы с помощью методов аналитического электрофореза в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия, изоэлектрофокусирования, 2D-электрофореза, дот-иммуноферментного анализа и обратно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Высокомолекулярные белковые комплексы сыворотки молока человека обладают высокой устойчивостью к низкому pH (pH 3) и растворам высокой ионной силы (2M NaCl), имеют три мажорные фракции белков с молекулярными массами около 14 кДа, 28 кДа, и 77 кДа и минорные фракции с широким спектром молекулярных масс и изоэлектрических точек. Выявленные высокомолекулярные белковые комплексы, содержат лактоферрин, миелопероксидазу, альфа-лактальбумин, лизоцим, HNP1-4, и обладают антимикробной активностью против грамположительных и грамотрицательных тестовых бактерий.

ПРИМЕНЕНИЕ ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ТОКСИНА АКТИНИИ *HETERACTIS CRISPA*, ИНГИБИТОРА ASIC3 КАНАЛОВ

Р.С. Калина¹, И.Н. Гладких¹, С.Г. Кошелев², М.М. Монастырная¹, П.С. Дмитренко¹, Э.П. Козловская¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Владивосток; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Ядовитые морские кишечнорастворимые, активинии, продуцируют десятки высоко гомологичных молекул, обладающих фармакологическим потенциалом, которые образуют комбинаторные библиотеки пептидов. Их активность и специфика взаимодействия с различными биологическими мишенями определяются точечными аминокислотными заменами. Уникальные профили фармакологической активности в отношении ASICs, Kv и Nav каналов имеют пептидные токсины активинии *Anthopleura elegantissima*, APETx1 – APETx3 (4.5 кДа). APETx-подобный токсин, pi-AnmTX Hcr 1b-1, из активинии *Heteractis crispa*, ингибирует ASIC3 каналы, но обладает значительно меньшей активностью в сравнении с APETx2 – высоко эффективным ингибитором токов болевого ASIC3 канала, который находится на стадии предклинических испытаний. Недавно из этанольного экстракта *H. crispa* методами гидрофобной хроматографии и ОФ-ВЭЖХ получен пептид pi-AnmTx Hcr 1b-2 (Mr 4523 Да, 41 а.о.). Автоматическим методом Эдмана определена частичная аминокислотная последовательность (1–39 а.о.) пептида, модифицированного 4-винилпиридином. К сожалению, ледерное секвенирование алкилированного пептида с применением смеси карбоксипептидаз А и В и MALDI-TOF MS не позволило определить природу 40-го а.о. (K/Q) однозначно, т.к. существование изобарных аминокислот является одним из ограничений метода; C-концевой фрагмент имел вид 39VK/QE41. Природа 40 и 41-го а.о. была установлена на основе анализа тандемного масс-спектра положительных ионов (в режиме CAD) C-концевого фрагмента (17–41 а.о.) пептида, полученного расщеплением исходного алкилированного пептида (1–41 а.о.) бромцианом. Таким образом, благодаря масс-спектрометрии высокого разрешения, позволившей определить точные массы соответствующих фрагментарных ионов, была решена проблема идентификации остатка 40K/Q и определена полная аминокислотная последовательность нового пептида: GTPCKCHGYIGVYWFMLAGCPNGYGYNLSCP YFLGIC CVKE. В электрофизиологических экспериментах установлено, что pi-AnmTx Hcr 1b-2, подобно его ближайшему гомологу pi-AnmTX Hcr 1b-1, который отличается двумя C-концевыми остатками, ингибирует токи как ASIC3, так и ASIC1a каналов. *Работа поддержана грантом РФФИ № 14-25-00037.*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВОГО РАЦИОМЕТРИЧЕСКОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА НА ОСНОВЕ BODIPY ДЛЯ ОЦЕНКИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ФОСФОЛИПИДОВ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МЕМБРАН В ЖИВЫХ КЛЕТКАХ

И.И. Галкин¹, Н.Н. Ходыкина², Е.Н. Попова¹ ¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова;

²Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Митохондрии являются одними из источников активных форм кислорода в клетке. Митохондриальные активные формы кислорода (АФК) играют важную роль в регуляции многих жизненно важных внутриклеточных процессов. В клетке существует ряд собственных механизмов, способных влиять на уровень митохондриальных АФК, такие, как SOD2, глутатионпероксидаза, пероксиредоксины и тиоредоксины. При этом относительно роли некоторых из них, в частности, SOD2 (MnSOD), по-прежнему существуют разногласия. Для изучения митохондриальных АФК применяются различные зонды, такие, как Mitotracker-CMXH2, Mitosox, Huper и другие. Эти зонды имеют как свои достоинства, так и ограничения при применении. В данной работе мы использовали зонд, представляющий собой BODIPY, конъюгированный с липофильным катионом с распределённым зарядом. Таким образом, данный зонд (BODIPY581-14-TPP) обладает повышенной афинностью к липидам митохондрий и позволяет оценить степень их окисления в различных условиях. Мы показали, что этот зонд накапливается преимущественно в митохондриях и окисляется под действием пероксида водорода. Классические антиоксиданты N-ацетил-D-цистеин и Trolox предотвращают окисление BODIPY581-14-TPP. Митохондриально-направленный антиоксидант 10-(6'-Plastoquinonyl)decyltriphenylphosphonium (SkQ1) так же понижал степень окисления BODIPY581-14-TPP. Это указывает на способность митохондриально-направленных антиоксидантов подавлять степень перекисного окисления липидов митохондрий. Мы применили BODIPY581-14-TPP для изучения роли MnSOD на степень окисления липидов митохондрий. Для этого мы получили линию эндотелиальных клеток с гиперэкспрессией митохондриальной MnSOD. Базовый уровень окисления BODIPY581-14-TPP в данных клетках был несколько ниже, чем в исходной культуре, и значительно ниже, чем в культуре, инфицированной контрольной плазмидой. Пероксид водорода вызывал окисление BODIPY581-14-TPP, однако степень его окисления также была ниже, чем в исходной культуре и культуре, инфицированной контрольной плазмидой. Таким образом, с помощью нового митохондриально-направленного зонда BODIPY581-14-TPP мы показали, что MnSOD снижает степень перекисного окисления липидов в митохондриях. *Работа поддержана грантом РФФИ 16-04-01074 и грантом РНФ 14-14-00055.*

НАСЛЕДСТВЕННАЯ «АНГЛИЙСКАЯ» МУТАЦИЯ H6R УСИЛИВАЕТ ЦИНК-ЗАВИСИМУЮ ДИМЕРИЗАЦИЮ БЕТА-АМИЛОИДА

А.А. Куликова, С.А. Козин, А.А. Макаров *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*

Цинк-индуцируемая олигомеризация бета-амилоида (Аβ) – одно из ключевых событий в развитии болезни Альцгеймера (БА). В металлсвязывающем домене Аβ1-16 (а.о. 1-16) выявлен целый ряд наследственных мутаций, приводящих к развитию ранних форм заболевания. Наибольший интерес среди них представляет «английская» мутация Аβ – замена остатка His6 на Arg, поскольку она непосредственно затрагивает остаток His6, входящий в состав минимального цинк-связывающего сайта Аβ (а.о. 6-14). Наличие данной мутации выражается в повышении нейротоксичности олигомеров Аβ. В данной работе мы охарактеризовали влияние H6R мутации в Аβ1-16 на его взаимодействие с ионами цинка. С помощью биосенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса было показано, что димеризация и олигомеризация Аβ1-16, включающего H6R мутацию (АβH6R1-16), происходит только в присутствии ионов цинка. С помощью методов изотермической калориметрии титрования и ЯМР установлено, что в присутствии ионов цинка АβH6R1-16 формирует димеры, в то время как в тех же экспериментальных условиях Аβ1-16 образует мономерные комплексы. Обнаружено, что участок, образованный а.о. 11-14, формирует интерфейс димеризации АβH6R1-16, в котором ион цинка координируется остатками Glu11 и His14 двух субъединиц. Таким образом, исключение His6 из координационной среды цинка вследствие мутации усиливает цинк-зависимую димеризацию АβH6R1-16. Полученные данные помогают объяснить механизм патогенного влияния «английской» мутации: усиление димеризации АβH6R может приводить к увеличению скорости накопления нейротоксичных олигомеров Аβ и, соответственно, к ускорению развития БА. Тетрапептид, включающий а.о. 11-14, представляет потенциальную лекарственную мишень, блокирование которой будет препятствовать патогенной димеризации и последующей олигомеризации Аβ. *Работа поддержана грантом Министерства образования и науки Российской Федерации № 14.Z50.31.0014*

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ОРАНЖЕВОГО КАРОТИНОИДНОГО БЕЛКА ПРИ ФОТОКОНВЕРСИИ

К.Е. Клементьев¹, Е.Г. Максимов¹, Г.В. Цораев¹, Е.А. Ширшин², Н.Н. Случанко³, К.С. Миронов⁴, В.З. Пашенко¹, А.Б. Рубин¹

¹Кафедра биофизики, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Отделение радиофизики, кафедра квантовой электроники, Физический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ³Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ⁴Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

Оранжевый каротиноидный белок (Orange Carotenoid Protein, OCP) – фотоактивный белок, защищающий фотосинтетический аппарат цианобактерий от избытка солнечного света с помощью механизма нефотохимического тушения. Для осуществления тушения белок OCP под действием синего света переходит из оранжевой стабильной формы (OCPo) в сигнальную красную (OCPR). В данной работе мы использовали OCP, меченный тетраметилродамин-малеимидом (TMR) для изучения конформационной подвижности фотоактивного белка. Спектрально-временные характеристики комплекса OCP-TMR оказались крайне чувствительны к изменениям состояния белка, а именно к расстоянию между молекулой хромофора и молекулами TMR, пришитым к разным остаткам цистеина. Используя теорию Ферстера, мы описали изменения времен жизни флуоресценции OCP-TMR при фотоконверсии и определили, что расстояние между TMR связанного цистеином в С-доме и хромофором OCP увеличивается на 18 Å при переходе из оранжевого состояния в красное. Регистрация кинетики анизотропии флуоресценции позволила нам определить снижение скорости вращения OCPR, которое связано с увеличением гидродинамического радиуса OCP при диссоциации С и N доменов. Таким образом, полученные нами результаты поддерживают идею о значительных структурных изменениях OCP при фотоконверсии. Полученный комплекс OCP-TMR оказался чувствителен к интенсивности света, температуры и вязкости растворителя. Данные свойства позволяют использовать комплекс OCP-TMR для разработки новых биосенсоров.

БАКТЕРИАЛЬНЫЙ СИНТЕЗ, ОЧИСТКА, РЕФОЛДИНГ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ АДАПТОРНЫХ БЕЛКОВ RIP2CARD И NADE НЕЙРОТРОФИНОВОГО РЕЦЕПТОРА P75

Л.Е. Артемьева^{1,2}, С.А. Гончарук^{1,3}, К.С. Минеев^{1,2}, А.С. Арсеньев¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный; ³Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

p75 играет важнейшую роль в регуляции жизненного цикла нейронов. Он участвует во множестве клеточных процессов, таких как дегенерация и рост аксонов, пролиферация, миелинизация и клеточная гибель. Рецептор p75 является интегральным мембранным белком 1-го типа и состоит из N-концевого внеклеточного домена, ответственного за связывание с нейротрофинами, трансмембранного альфа-спирального участка (ТМД) и внутриклеточного домена (ВКД), который в свою очередь содержит так называемый «домен смерти». Внутриклеточный домен рецептора взаимодействует с большим количеством различных адапторных молекул, запуская каскады реакций, которые могут как поддерживать клеточную жизнедеятельность, например, белок RIP2CARD, так и приводить к апоптозу клеток – белок NADE. Однако механизм функционирования рецептора P75 остается неизвестен. Существует несколько гипотез о механизме передачи сигнала рецептором внутрь клетки в процессе его взаимодействия, однако недостаток данных о трехмерной структуре полноразмерного белка P75 или связки ТМД-ВКД, а также о его конформационных перестройках при взаимодействии с внутриклеточными лигандами, оставляет данный вопрос открытым. Именно этой задаче и посвящено данное исследование. Были созданы генноинженерные конструкции и подобраны условия для высокоэффективной бактериальной экспрессии адапторных белков RIP2CARD и NADE, в том числе и в бесклеточной системе. Подобраны методы очистки для адапторных белков RIP2CARD и NADE и проведен рефолдинг целевых белков. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект No14-50-00131).*

БЕТА-ШПИЛЕЧНЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ: БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Т.В. Овчинникова, С.В. Баландин, И.А. Болосов, П.В. Пантелеев

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Всестороннее исследование свойств антимикробных пептидов (АМП) позволило сформировать стройную концепцию об этих соединениях как о молекулярных факторах системы врожденного иммунитета, обеспечивающих универсальный и эволюционно древний способ защиты человека, животных и высших растений от инфекции. Наряду с прямым эффекторным (антибиотическим) действием была обнаружена присущая многим эндогенным АМП способность выполнять иммуномодулирующую функцию и участвовать в регуляции не только врожденного, но и приобретенного иммунитета. К числу наиболее активных АМП с антибиотическими свойствами относятся молекулы, образующие стабилизированную дисульфидными связями β-шпильчатую структуру. Относительно небольшой размер и широкий спектр биологической активности этих пептидов делает их привлекательной основой для конструирования лекарственных препаратов. Однако сравнительно высокая цитотоксичность этих АМП в отношении нормальных клеток млекопитающих ограничивает их дальнейшее применение в медицине. Нами проведено структурно-функциональное исследование ряда β-шпильчатых АМП животного происхождения с целью поиска подходов, позволяющих снизить цитотоксические эффекты при их применении. С помощью сайт-направленного мутагенеза изучена взаимосвязь структуры и биологических свойств ряда β-шпильчатых АМП. Конструирование нетоксичных аналогов β-шпильчатых АМП, сохраняющих высокую антимикробную активность, а также изучение их физико-химических особенностей открывает путь к созданию новых пептидных антибиотиков. Актуальность данного исследования обусловлена повсеместным распространением микроорганизмов, резистентных к конвенциональным антибиотикам. Благодаря своим структурно-функциональным характеристикам β-шпильчатые АМП могут стать основой для создания не только антибиотиков системного и поверхностного применения, но и иммуномодуляторов, блокаторов экзо- и эндотоксинов, препаратов для лечения метаболических нарушений, противоопухолевых и противовирусных лекарственных средств. *Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).*

МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ И ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ УНИКАЛЬНОГО N-КОНЦЕВОГО СЕГМЕНТА «СУЩЕСТВЕННОЙ» ЛЕГКОЙ ЦЕПИ-1 МИОЗИНА С МОТОРНЫМ ДОМЕНОМ МИОЗИНОВОЙ ГОЛОВКИ В ПРОЦЕССЕ АТРАЗНОГО ЦИКЛА

Д. Логвинова^{1,2}, О. Николаева³, Д.И. Левицкий^{1,3}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²Кафедра биохимии, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В быстрых скелетных мышцах позвоночных экспрессируются две изоформы «существенной» легкой цепи миозина – A1 и A2, которые различаются наличием в A1 уникального N-концевого 41-членного сегмента, содержащего 7 повторов Ala-Pro и 4 остатка Lys на N-конце. В процессе АТРАЗного цикла актомиозина этот сегмент способен обратимо взаимодействовать с актином, создавая дополнительный актин-связывающий сайт в головке миозина. Методом динамического светорассеяния (ДЛС) мы провели сравнительный анализ агрегационных свойств двух изоформ изолированных головок миозина (субфрагмент 1 миозина, S1), содержащих либо A1, либо A2 (S1(A1) и S1(A2), соответственно). Эксперименты проводили при низкой ионной силе и относительно низких температурах, до начала тепловой денатурации S1, сопровождающейся спонтанной аморфной агрегацией белка. Показано, что в этих условиях S1(A1) и S1(A2) резко различаются по характеру тепловой агрегации как в отсутствие нуклеотидов, так и в присутствии ADP. Так, например, при нагреве до 40°C мы наблюдали в случае S1(A1) интенсивный рост гидродинамического радиуса частиц (Rh) – от 16–20 нм вплоть до ~600–700 нм, тогда как для S1(A2) величина Rh оставалась неизменной и равной 16–20 нм. Такая необычная агрегация S1(A1) полностью исчезала при формировании стабильных комплексов S1-ADP-AlF₄⁻ и S1-ADP-BeF₃⁻, имитирующих ключевые интермедиаты АТРАЗной реакции S1 – S1*-ADP-Pi и S1*-ATP; в этих комплексах не наблюдалось никакой разницы в агрегационных свойствах между S1(A1) и S1(A2). Мы можем объяснить это тем, что в процессе АТРАЗного цикла N-концевой сегмент A1 может, по-видимому, взаимодействовать с моторным доменом головки миозина. Напротив, в отсутствие нуклеотидов или в присутствии ADP этот сегмент A1 должен взаимодействовать с актином; однако в отсутствие актина он, видимо, неспособен к внут-

риомолекулярным взаимодействиям с собственной головкой миозина, но может при этом взаимодействовать с моторными доменами других молекул S1. Такими межмолекулярными взаимодействиями N-концевого сегмента A1 можно объяснить необычные агрегационные свойства S1(A1). *Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 15-04-03037).*

РОЛЬ ШАПЕРОНОВ В АМИЛОИДОГЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ БЕЛКОВ ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

В.И. Муронец, Е.В. Шмальгаузен, И.Н. Налетова, Г.Г. Киселев

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Шапероны играют важную роль в амилоидогенной трансформации белков при «конформационных» нейродегенеративных заболеваниях. Однако сведения об участии шаперонов в развитии этих заболеваний противоречивы. Шапероны могут как предотвращать агрегацию амилоидных белков, так и провоцировать переход этих белков в патологическую конформацию. Разрушение шаперонами сформировавшихся амилоидных фибрилл вызывает накопление нейротоксичных олигомеров амилоидных белков. Нами была доказана возможность необратимого блокирования шаперонина GroEL неправильно свернутыми формами белков, которые не могут формировать нативную структуру. Такие формы могут быть получены окислением (Naletova et al., Biochim Biophys Acta, 2006), карбоксиметилированием или введением точечных мутаций в области междоменных взаимодействий (Polyakova et al., Protein Sci., 2005). На бета-амилоидном пептиде 1-42 было показано, что связывание с шапероном одного из двух белков-партнеров препятствует формированию двух-компонентного амилоидного агрегата (Naletova et al., Biochim Biophys Acta, 2008). Ненативные формы белков играют важную роль в регуляции шаперонами амилоидной трансформации полиглутаминовых агрегатов при болезни Гентингтона (Guzhova et al., Hum. Mol. Genet, 2011). Важными являются наши данные об индукции образования амилоидных фибрилл при инкубации прионного белка (PrP) с цитоплазматическим шаперонином TRiC. Амилоидные фибриллы образуются только в отсутствие субстратов шаперонина (MgATP), а функционально активный шаперонин не влияет на амилоидогенную трансформацию PrP. Бактериальный шаперонин GroEL стимулирует формирование небольших агрегатов PrP белка, обладающих амилоидными свойствами, но не вызывает его фибриллизацию. Аналогичное действие оказывает экстракт клеток *E. coli*, содержащий GroEL. При этом сравнение штаммов *E. coli*, отличающихся по экспрессии белка GroEL, показывает, что амилоидогенная трансформация прионного белка увеличивается при повышении содержания GroEL в системе (Kiselev et al., Biochim Biophys Acta, 2011). Мы полагаем, что последнее наблюдение может свидетельствовать о возможной роли бактериальных шаперонов, присутствующих в желудочно-кишечном тракте, в патологической трансформации амилоидных белков и их транспорте в ткани нервной системы. *Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-00331.*

HER2-СПЕЦИФИЧНЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ИММУНОТОКСИН НА ОСНОВЕ ПСЕВДОМОНАДНОГО ЭКЗОТОКСИНА А И АНТИТЕЛА 4D5SCFV – АГЕНТ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

Е.А. Соколова^{1,2}, О.А. Стрёмовский², Т.А. Здобнова¹, И.В. Балалаева¹, С.М. Деев^{1,2}

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Таргетная терапия – современный подход к лечению онкологических новообразований, в основе которого лежит избирательное воздействие на опухоль благодаря нацеленной доставке терапевтического агента к опухолевым клеткам. Перспективными агентами для таргетной противоопухолевой терапии представляются рекомбинантные иммунотоксины – белковые молекулы, состоящие из направляющего и токсического модулей. Одной из хорошо известных мишеней для направленной терапии опухолей является онкомаркер HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2), гиперэкспрессия которого способствует развитию многих типов опухолей. Целью работы являлось получение и исследование свойств рекомбинантного иммунотоксина на основе фрагмента псевдомонадного экзотоксина А (PE40) и HER2-специфичного антитела 4D5scFv. Целевой белок был экспрессирован в *E. coli* штамма BL21(DE3) и очищен методами металл-аффинной хроматографии и гель-фильтрации. Были показаны высокая аффинность полученного белка 4D5scFv-PE40 к очищенному рецептору HER2 и его специфичное связывание с HER2 на поверхности клеток с последующей клатрин-зависимой интернализацией. Через 2 часа инкубации с клетками иммунотоксин локализовался в лизосомах, в то время как через более длительной период инкубации был обнаружен в аппарате Гольджи и ЭПР, что характерно для экзотоксина дикого типа и свидетельствует о продуктивном внутриклеточном транспорте его фрагмента в составе иммунотоксина. Было установлено, что полученный иммунотоксин селективно ингибирует жизнеспособность HER2-положительных клеток в пикомолярном диапазоне концентраций, причем данный эффект коррелирует с уровнем экспрессии рецептора-мишени HER2 в клетках. Показано, что наблюдаемая цитотоксичность обусловлена ингибированием биосинтеза белка в клетках-мишенях и их гибелью по пути апоптоза. В эксперименте *in vivo* было выявлено торможение роста HER2-гиперэкспрессирующей ксенографтной опухоли под действием иммунотоксина на 80% по сравнению с контролем. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности иммунотоксина 4D5scFv-PE40 как агента для таргетной терапии опухолей, характеризующихся гиперэкспрессией HER2. *Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (договор № 14.Z50.31.0022) и РНФ (проект № 14-14-00813).*

БЕЛОК-ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ И АГРЕГАЦИИ ФЕРМЕНТА

П.И. Семенюк, В.А. Изумрудов, В.И. Муронец

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

С ростом количества фармацевтических препаратов белковой природы возникает необходимость стабилизации функционально-активного состояния белков. Кроме того, одной из важнейших проблем современной биохимии и даже медицины является поиск путей подавления агрегации ферментов. Это связано с повсеместным использованием прокариотических систем для получения рекомбинантных белков, а также с тем, что амилоидная агрегация сопровождается развитием нейродегенеративных заболеваний – таких, как болезни Альцгеймера и Паркинсона. Перспективным способом защиты ферментов от

различных видов стресса являются полиэлектролиты. Показано, что использование полианионов позволяет полностью контролировать агрегацию белков. Возможно как полное подавление аморфной агрегации, так и растворение уже сформированных агрегатов (в частности, телец включения), сопровождающееся частичным восстановлением ферментативной активности. С помощью синтетических полисульфоанионов удалось также подавить образование амилоидных фибрилл овечьего прионного белка. Более того, обработка уже образовавшихся фибрилл высокомолекулярными фракциями полисульфоанионов приводит к их разрушению и снижению содержания в них амилоидных структур. Показана также возможность защиты функционально-активного состояния белка путем включения его в состав белок-полиэлектролитных комплексов как от теплоиндуцированной агрегации, так и от других видов стресса – обработки протеазами и низкомолекулярными агентами, вызывающими инактивацию фермента. Исследовано влияние различных полиэлектролитов на структуру и ферментативную активность связанного фермента. Важно отметить, что при использовании ряда полиэлектролитов (например, декстран-сульфата) образование таких комплексов обратимо, что позволяет при необходимости обратимо подавлять активность фермента. *Работа поддержана грантами РФФИ № 15-04-06406 и 16-34-60089.*

МОДУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА α -СТРУКТУРНЫМИ АНТИМИКРОБНЫМИ ПЕПТИДАМИ

М.Н. Берлов^{1,2}, Е.С. Умнякова¹, Т.С. Леонова², Т.В. Овчинникова³, В.Н. Кокряков^{1,2}

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; ²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург; ³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Антимикробные пептиды (АМП) являются важным молекулярным фактором врожденного иммунитета животных. Помимо антимикробной активности некоторые АМП могут модулировать активацию системы комплемента, взаимодействуя, в частности, с белком C1q. Способность АМП к формированию комплекса с C1q была показана для дефенсинов человека, а также для тахиплезина мечехвоста *Tachypleus tridentatus*. Мы подтвердили литературные данные о взаимодействии с C1q α - и β -дефенсинов человека и впервые показали формирование комплексов C1q с протегрином-1 свиньи и с аценицином-1 пескожила *Arenicola marina*. Для всех этих пептидов характерно преобладание в молекуле β -структуры, стабилизированной дисульфидными связями. АМП с другим типом пространственной организации (α -спиральный LL-37 и РРП-спиральный профенин) не проявили способности взаимодействовать с C1q. Данные о характере влияния АМП на активацию комплемента противоречивы и зависят от используемой модели. В нашей работе также получены неоднозначные результаты. И дефенсины (10–100 мкг/мл), и аценицин (7–20 мкг/мл) ингибируют комплемент-зависимый лизис сенсibilизированных антителами эритроцитов. Характер влияния данных АМП на лизис клеток *E. coli* зависит от условий эксперимента (ионная сила, концентрация пептида). Действие протегрина на комплемент в этих моделях не удалось оценить из-за его высокой мембранолитической активности. Мы предложили гипотезу, объясняющую механизм действия АМП на активацию системы комплемента. β -Структурные АМП могут конкурировать с CUB доменами протеиназ C1r и C1s, имеющими конформацию β -бочонка, за взаимодействие с C1q. Разнонаправленный характер действия АМП можно объяснить тем, что возможно как полное вытеснение протеиназ пептидами, приводящее к ингибированию комплемента, так и частичное, вызывающее независимую от антител активацию. Мы исследовали действие АМП на спонтанную активацию частично очищенного комплекса C1, оцениваемую по эстеразной активности C1s. Вопреки ожиданиям, мы не выявили влияния дефенсинов и аценицинов на скорость активации. Возможно, это объясняется различиями в механизмах спонтанной и индуцированной взаимодействием C1q с иммунными комплексами активации протеиназ C1r и C1s. *Работа поддержана грантом ФЦП. Соглашение с Минобрнауки России №14.604.21.0104 от 05.08.2014 г. RFMEFI60414X0104.*

НОВЫЕ БИС-МЕТИЛИРОВАННЫЕ АНАЛОГИ СПЕРМИНА И МЕТИЛИРОВАННЫЕ АНАЛОГИ N¹-АЦЕТИЛСПЕРМИДИНА: СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

М.А. Хомутов¹, М.Т. Хивонен², Т.А. Кейнанен², Й. Вепсалайнен², Л. Алхонен², А.Р. Хомутов¹

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия; ²Факультет медицины, Университет Восточной Финляндии, Биоцентр Куопио, Куопио, Финляндия

Биогенные полиамины Spm и Spd представляют собой природные поликатионы, которые присутствуют в миллимолярных концентрациях во всех эукариотических клетках и участвуют в регуляции пролиферации и дифференцировки. Изучение взаимодействия направленно синтезированных аналогов Spm и Spd с ферментами их метаболизма, равно как и исследование клеточных эффектов аналогов, представляет собой одно из традиционных направлений биохимии полиаминов. В настоящей работе синтезированы новые C,C'-диметилированные аналоги Spm (2,11- и 3,10-Me₂Spm), а также неизвестные ранее C-метилированные аналоги N¹-AcSpd, полученные из 2-, 3- и 8-MeSpd. Показано, что взаимодействие синтезированных аналогов N¹-AcSpd с ключевыми ферментами катаболизма полиаминов, также как и клеточные эффекты 1,12-, 2,11- и 3,10-Me₂Spm, зависят от положения метильной группы. Установлено, что все три производные Me₂Spm восстанавливали рост клеток с острым дефицитом полиаминов. Из всех аналогов Spm только 3,10-Me₂Spm эффективно катаболизировал в клетках DU145 до соответствующего 3-MeSpd. Кроме того, только 3,10-Me₂Spm незначительно снижал уровень ODC в DU145 клетках и оказался слабым индуктором антизизма. Поскольку антизизм-опосредованная деградация ODC и регуляция транспорта полиаминов важны для поддержания гомеостаза полиаминов эти наблюдения представляют большой интерес для биохимии полиаминов, а предлагаемый набор производных Spm является удобным инструментом исследования. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта 14-14-01099 Российского научного фонда и гранта 266196 Академии Финляндии.*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИИ БЕЛКОВ КРОВИ С УЧЕТОМ ИХ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Д.М. Никулина Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России

Белки крови представлены основными и минорными по количественным и качественным характеристикам: основные имеют постоянную функцию и присутствуют в заметном количестве; в норме синтез минорных белков репрессирован, но при особых физиологических или патологических состояниях их продукция резко возрастает в разы или на порядки. Широко известен термин «белки острой фазы». Среди БОФ классический альфа2-макроглобулин (МГ/МГ) и связанный (ассоцииро-

ванный) с беременностью альфа2-гликопротеин (СБАГ/ α 2-PAG) или pregnancy zone protein (PZP – в базе данных). Белки семейства макроглобулинов привлекают внимание жизненно важными функциями и диагностической ценностью. МГ – ингибитор протеаз ингибирует фибринолиз (через плазмин и калликреин) и коагуляцию (через тромбин). Главная функция СБАГ – иммуносупрессия. Его синтез активируется для поддержания иммуногемеостаза беременных женщин, больных воспалительными, аутоиммунными и опухолевыми заболеваниями.

Ранее мы обнаружили несоответствие молекулярной массе некоторых физико-химических параметров СБАГ в эксперименте: электрофоретическая подвижность и объем элюции в гель-хроматографии совпадали с таковыми у МГ, имеющего вдвое большую массу. Это позволило предположить межмолекулярные взаимодействия СБАГ с МГ и объяснить этим изменение параметров СБАГ (1989-1993). На данном этапе для подтверждения белок-белковых взаимодействий проведен многоплановый анализ МГ и PZP с использованием различных веб-серверов и современных биоинформационных программ. Сформирована модель комплекса двух белков на сервере HexDock и изучена его стабильность с помощью сервера PDBePISA. Проведенное *in silico* исследование позволило доказать и визуализировать взаимодействие идентичных гидрофобных радикалов аминокислот на поверхности структур МГ и PZP, косвенно подтвердить генетически детерминированное и, следовательно, функционально обоснованное формирование надмолекулярного комплекса. Не исключено, что подобное взаимодействие белков крови обеспечивает стабильность их конформации и центров связывания, поэтому повышение уровня каждого из них может быть обусловлено не только специфическим, но и опосредованным участием в реализации функции (напр., иммуномодуляторной у МГ или протеолитической активности у СБАГ, на которые указывают некоторые исследования). *Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-01075.*

ОБРАТИМАЯ АГРЕГАЦИЯ УФ-ОБЛУЧЕННОЙ ГЛИКОГЕНФОСФОРИЛАЗЫ В УСЛОВИЯХ КРАУДИНГА

В.В. Михайлова, Т.Б. Еронина, Н.А. Чеботарева, В.Ф. Макеева, Б.И. Курганов

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва Россия

Денатурация белков, индуцируемая воздействием различных физических и химических факторов, приводит к образованию развернутых форм белковых молекул, которые обнаруживают высокую склонность к агрегации. Исследование процесса агрегации белков имеет большое значение как для биотехнологов, занимающихся получением и хранением белковых препаратов, так и для биохимиков, изучающих механизмы развития заболеваний, связанных с накоплением белковых агрегатов. Принято считать, что на начальных этапах агрегация белков является обратимой, в то время как длительное воздействие факторов, вызывающих денатурацию белков (например, повышение температуры), приводит к формированию необратимых агрегатов. УФ-облученная гликогенфосфорилаза b (УФ-ФБ) является удобной мишенью для исследования процесса агрегации белков, так как в подобной тест-системе отсутствует стадия разворачивания нативного белка и возможно изучение прямого действия различных агентов на стадию агрегации развернутых белковых молекул. В настоящей работе агрегация УФ-ФБ изучалась при температурах 10, 25 и 37°C с использованием методов динамического светорассеяния и аналитического ультрацентрифугирования. Для стимуляции процессов ассоциации и агрегации развернутых молекул белка были использованы краудинг-агенты (полиэтиленгликоль, Фиколл-70), позволяющие имитировать условия взаимодействия белков в живой клетке. Показано, что при температуре 10°C на ранних стадиях процесса агрегации краудинг-агент стимулирует формирование обратимых агрегатов, которые могут быть разрушены путем разбавления исследуемого раствора. Это указывает на обратимый характер агрегации. Важно отметить, что при 37°C подобная обратимость отсутствует. Также показано, что химические шапероны (аргинин, пролин) вызывают распад белковых агрегатов, сформированных при 10°C в условиях краудинга. В аналогичных экспериментах, выполненных при 37°C, добавление аргинина приводит к распаду белковых агрегатов только на ранних стадиях процесса агрегации. На основании полученных данных предложена схема агрегации белка, включающая в себя формирование обратимых, полностью и частично диссоциирующих, а также необратимых агрегатов. Следует отметить, что стабильность белковых агрегатов возрастает по мере увеличения их размера. *Работа поддержана грантом РНФ (16-14-10055).*

ГЛИКИРОВАНИЕ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ПРИСУТСТВИИ ГЛЮКОЗЫ ИЛИ 3-ФОСФОГЛИЦЕРИНОВОГО АЛЬДЕГИДА

В.И. Муронец, Е.В. Шмальгаузен

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Изучению гликирования белков посвящено много работ, прежде всего потому, что интенсификация этого процесса наблюдается при повышении концентрации глюкозы в крови больных диабетом. Однако исследования по гликированию одного из важнейших гликолитических ферментов – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) практически отсутствуют. Нами было изучено влияние гликирования на каталитические свойства ГАФД, а также на ее стабильность. Модификацию фермента проводили в присутствии глюкозы или 3-фосфоглицеринового альдегида (3-ФГА), определяя эффективность гликирования по скорости образования фруктозаминов (продуктов Амадори). Эффективность гликирования при модификации 3-ФГА была существенно выше, чем при модификации глюкозой. При этом фермент практически полностью терял активность после 20 часов инкубации с 3-ФГА, а максимальное снижение активности при модификации глюкозой достигало 60%. Добавление низкомолекулярных тиолов (меркаптоэтанола или глутатиона) частично защищало фермент от инактивации 3-ФГА. Термостабильность гликированной ГАФД уменьшалась, а склонность к термоагрегации – увеличивалась. Таким образом было показано, что субстрат глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназной реакции – 3-ФГА – обладает способностью инактивировать фермент, а также стимулировать его денатурацию и агрегацию. Мы полагаем, что гликирование ГАФД, прежде всего 3-фосфоглицериновым альдегидом, может быть важным регуляторным механизмом, контролирующим скорость АТФ-синтезирующих стадий гликолиза. Кроме того, учитывая вовлеченность ГАФД в индукцию и развитие нейродегенеративных заболеваний, модификация этого белка сахарами и альдегидами может влиять на его способность формировать амилоидные структуры с различными амилоидогенными белками, прежде всего, с бета-амилоидным пептидом и альфа-синуклеином. *Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 16-14-10027).*

СТРУКТУРНЫЕ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ САМОАССОЦИИ ПРИРОДНОЙ И МУТАНТНЫХ ФОРМ БЕТА-КАЗЕИНА

Т.А. Коннова¹, Д.А. Файзуллин¹, Т. Эртле², Ю.Ф. Зуев¹ ¹Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань, Россия;

²l'Institut National de la Recherche Agronomique de Nantes, Нант, Франция

В отличие от жестко структурированных глобулярных белков, бета-казеин относится к неструктурированным белкам с большой долей неупорядоченной структуры, содержащей многочисленные участки гидратированной спирали типа полипролин II. Высокая лабильность неупорядоченной структуры в ответ на изменение температуры, концентрации, первичной последовательности белка, свойств растворителя, может обуславливать образование элементов упорядоченных вторичных структур, влияющих, в свою очередь на полярность, гидрофобность, жесткость, удельный объем и форму молекулы белка, играя важную роль в модуляции ассоциативных свойств. Целью настоящей работы было выявление влияния конформационных переходов на уровне вторичной структуры на температурно-индуцированную ассоциацию природной и мутантных форм бета-казеина. Выявление закономерностей позволит варьировать аффинные свойства мицелл бета-казеина и их сольбилизирующую емкость по отношению к гидрофобным лигандам, что будет способствовать поиску эффективных «носителей» при создании биоактивных добавок и лекарственных препаратов. В докладе представлены результаты сравнительного исследования структуры и ассоциативных свойств бета-казеина, выполненного комплексом биофизических методов. Методами КД- и ИК-спектроскопии охарактеризована вторичная структура природной и рекомбинантных форм бета-казеина. Методом динамического светорассеяния получена информация о физико-химических свойствах, размерах, форме самоассоциатов, определены температуры переходов мономер-мицелла различных форм бета-казеина. Методом триптофановой флуоресценции получены данные о внутренней подвижности белковой молекулы, степени ассоциации, а также о доступности триптофановых остатков растворителю. Дополнительная информация о реологических свойствах растворов нативного и рекомбинантных форм бета-казеина получена методом поверхностного натяжения. Установлена корреляция между структурным состоянием бета-казеина и физико-химическими свойствами его ассоциатов. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант 16-34-00637 (Роль структурного состояния бета-казеина в его связывающих и сольбилизирующих свойствах по отношению к низкомолекулярным гидрофобным лигандам).

Fur и SpxA – ОСНОВНЫЕ ФАКТОРЫ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У MYCOPLASMA GALLISEPTICUM

Д.В. Евсютина, Г.Ю. Фисунов, Д.С. Матюшкина, О.В. Побегуц, И.А. Гаранина, В.А. Манувер, В.М. Говорун

ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Патогенные бактерии должны иметь жесткую регуляцию процессов, обеспечивающих успешное заражение хозяина. После прикиновения бактерии одним из факторов, которому должен противостоять патоген – это активные формы кислорода. Бактерии класса *Mollicutes*, одним из представителей которого является *Mycoplasma gallisepticum*, в большинстве своем патогены, утратившие клеточную стенку и имеющие редуцированный геном. В этой работе мы рассматриваем факторы регуляции транскрипции (ТФ), которые, возможно, участвуют в защите клетки *Mycoplasma gallisepticum* от окислительного стресса. На сегодняшний день для микоплазм есть скудные данные о белковых регуляторах транскрипции. Так, мишени и сайты связывания экспериментально подтверждены только для двух ТФ – HrcA и MraZ. Мы составили список потенциальных регуляторов для *Mycoplasma gallisepticum* на основе наличия ДНК-связывающего домена и гомологии первичных структур с известными последовательностями регуляторов других бактерий. Используя ранее полученные данные транскриптомного профилирования микоплазмы при воздействии перекисью – модель окислительного стресса – мы идентифицировали два регулятора, чья экспрессия статистически значимо изменялась в этих условиях. Это гомологи белка Fur и белка WhiA. Ещё одним фактором, рассматриваемым в нашей работе, стал белок SpxA. Этот регулятор не связывается напрямую с ДНК, а модулирует аффинность РНК-полимеразы к разным промоторам. С помощью метода торможения ДНК в полиакриламидном геле был идентифицирован сайт связывания белка Fur, состоящий из двух инвертированных повторов. Этот сайт располагается в промоторе оперона, содержащего гены, кодирующие эндонуклеазу IV, Fur и неизвестный белок. Необходимым условием для образования ДНК-белкового комплекса является наличие восстанавливающего агента. Для функциональной характеристики регулятора SpxA мы получили трансформанты *M. gallisepticum* со сверхэкспрессией гена spxA. Белковые профили двух линий микоплазмы сравнили методом двумерного дифференциального гель-электрофореза. Классифицировав все отличающиеся по представленности белки, мы показали, что большая часть – это белки, участвующие в защите клетки от окислительного стресса. Однако есть группы белков, выполняющие и другие функции. Работа поддержана грантом РФФИ (№ 14-24-00159).

ИЗУЧЕНИЕ ЦЕНТРАЛЬНОГО ДОМЕНА (CR) БЕЛКА A1 ВИРУСА ЖЕЛТУХИ СВЕКЛЫ (BYV)

А.В. Махотенко, В.А. Гушин, А.А. Аграновский

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Клостеровирусы распространены по всему миру и некоторые из них вызывают экономически важные заболевания растений. Пожелтение, некроз жилок и сворачивание листьев являются основными симптомами вызываемыми серьезные потери урожая. Естественно, круг растений-хозяев для индивидуальных клостеровирусов, как правило, довольно узок, хотя вирус желтухи свеклы, например, при искусственной инокуляции способен инфицировать около 100 видов растений в 15 семействах. Целью данной работы являлось изучение центрального домена (CR) белка A1 вируса желтухи свеклы (BYV). В процессе работы была изучена организация CR, представляющего из себя слабоконсервативную последовательность, находящуюся между доменами метилтрансферазы и хеликазы в составе белка предшественника, подвергающегося процессингу в процессе трансляции. В составе CR были обнаружены короткие участки консервативные для семейства клостеровирусов. Так как ранее фрагменты CR не были обнаружены *in vivo*, для изучения функций домена его фрагменты были экспрессированы в виде фьюжен белков с зеленым флуоресцирующим белком. Было показано, что С-концевая половина CR (CR-2) участвует в образовании везикул размером 1 мкм, напоминающих мембранные структуры, образуемые в процессе репликации BYV (мембранные репликативные комплексы). Таким образом, предположительная роль центрального домена – участие в формирова-

нии мембранных структур нужных для репликации ВУВ. Используя делеционный мутагенез в составе CR-2 были обнаружены последовательности ответственные за образование везикул и их агрегацию вокруг ядра. Данные делеционного и точечного мутагенеза подтверждают роль гидрофобного кластера в составе короткого консервативного фрагмента CR-2. Для изучения процессинга и роли лидерной протеиназы (PCP) процессинг CR был изучен в составе *in vitro* транслированных белков предшественников. Вероятно, что данный новый мембрано-моделирующий домен полипротеина 1a ВЖС может быть вовлечен в процесс биогенеза мультивезикулярного комплекса *in vivo*, который является сайтом репликации клостеровируса в зараженных клетках. Также, нами были обнаружены фрагменты CR в клетках зараженных растений, образуемые в результате процессинга. Было установлено, что папаин-подобная протеиназа (PCP) принимает непосредственное участие в этом процессе.

ПОЛИМОРФИЗМ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ НА ОСНОВЕ ЛИЗОЦИМА И БЕТА-2-МИКРОГЛОБУЛИНА

Н.П. Родина^{1,2}, А.И. Сулацкая¹, И.М. Кузнецова¹, К.К. Туроверов^{1,2}

¹Институт цитологии РАН; ²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Накопление в организме амилоидных фибрилл на основе различных белков сопутствует таким тяжелым заболеваниям, как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, и другие. Целью настоящей работы стало исследование структурных различий амилоидных фибрилл на основе лизоцима, полученных при различных условиях, и амилоидных фибрилл на основе бета-2-микроглобулина (B2M) и его укороченных форм. Методом электронной микроскопии показано, что исследуемые амилоидные фибриллы на основе B2M различаются по длине и толщине и не склонны к взаимодействию друг с другом, в то время как фибриллы лизоцима, способны образовывать кластеры различных размеров. Измерение спектров КД показать, что при образовании амилоидных фибрилл на основе B2M и лизоцима происходит изменение вторичной структуры белков. Было изучено взаимодействие амилоидных фибрилл со специфическим флуоресцентным зондом тиюфлавином Т (ThT). Показано, что встраивание ThT в исследуемые амилоидные фибриллы сопровождается длинноволновым сдвигом спектра поглощения, изменением коэффициента молярной экстинкции и возрастанием квантового выхода флуоресценции красителя, что обусловлено изменением его микроокружения и ограничением торсионной подвижности фрагментов молекулы ThT в возбужденном состоянии. С использованием абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии растворов, подготовленных методом равновесного микродиализа, определены параметры связывания ThT с фибриллами. Амилоидные фибриллы на основе B2M имеют одну моду связывания ThT, взаимодействие с которой обусловлено встраиванием молекулы красителя в бороздки, расположенные вдоль длинной оси волокна фибриллы перпендикулярно бета-листам. Амилоидные фибриллы на основе лизоцима имеют еще одну моду, существование которой обусловлено локализацией мест связывания в областях кластеризации этих фибрилл. Таким образом, были показаны различия фотофизических характеристик и морфологии амилоидных фибрилл на основе лизоцима, полученных при различных условиях фибрилlogenеза, и амилоидных фибрилл на основе B2M и его укороченных форм, а также параметров их связывания с ThT и характеристик связанного красителя, что свидетельствует о полиморфизме этих фибрилл. Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 16-04-01614_а, 16-54-00230 Бел_а, Программы "МКБ" РАН и стипендии Президента РФ СП-1982.2.2015.4.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ТАБАМОВИРУСА С ОБОЛОЧКОЙ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ БЕЛКА ОБОЛОЧКИ ГОРДЕЕВИРУСОВ

В.В. Макаров, А.В. Хромов

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Вирусный транспорт по флоэме происходит с участием большого числа вирусных и клеточных факторов. Дальний транспорт некоторых вирусов невозможен без белка оболочки. В тех случаях, когда для транспорта необходим белок оболочки, транспортной формой является вирион. Однако, данные последних исследований показывают, что роль белка оболочки в транспорте сквозь флоэмы не ограничена формированием транспортной формы вирусного генома. Химерный вирус просветления жилок турнепса или ВПЖТ (для дальнего транспорта необходим БО) был получен для определения роли БО оболочки в вирусной инфекции. БО ВПЖТ был заменён на БО вируса штриховатой мозаики ячменя – ВШМЯ (для дальнего транспорта необходимости в БО нет). В результате эксперимента было показано, что такой химерный вирус обладает инфекционностью, способен к формированию вирионов, аналогичных по строению ВШМЯ и к транспорту через флоэму. Необходимо иметь в виду, что инфекционные свойства химерного вируса слабее, чем у дикого типа ВПЖТ. Делеционные мутанты БО ВШМЯ были получены для изучения способности БО ВШМЯ заменить БО ВПЖТ в ходе системного транспорта. Поверхностно локализованные области БО ВШМЯ были удалены: 30 аминокислотных остатков с N-концевой части, из центральной петли и с C-концевой части. Химерный вирус с делецией в области N-конца вёл к развитию гиперчувствительного ответа и не был способен к системному транспорту. Делеция части центральной петли не влияло на инфекционные свойства химерного вируса, однако, такой мутант не был способен к образованию вирионов. Делеция C-концевого участка БО значительно увеличивало эффективность вирусной инфекции, делая её сравнимой инфекцией диким типом ВПЖТ.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ $\alpha\beta$ -ГЕТЕРОДИМЕРОВ ТРОПОМИОЗИНА

К. Попруга^{1,2}, Д. Щепкин³, Г. Копылова³, А. Матюшенко^{1,2}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; ²Кафедра биохимии, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ³Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Тропомиозин (ТМ) – это актин-связывающий белок, играющий ключевую роль в регуляции сокращения скелетных и сердечных мышц. Молекула ТМ представляет собой димер α -спиралей. В быстрых скелетных мышцах экспрессируются две изоформы ТМ – α и β ; соответственно, молекулы ТМ обычно представлены $\alpha\alpha$ -гомомодимерами и $\alpha\beta$ -гетеродимерами ($\beta\beta$ -гомомодимеры нестабильны и потому встречаются очень редко). Свойства $\alpha\alpha$ -гомомодимеров ТМ изучены достаточно подробно, тогда как свойства $\alpha\beta$ -гетеродимеров почти не исследовались из-за чрезвычайной сложности их получения. Лишь относительно недавно был описан метод, позволяющий получать рекомбинантные $\alpha\beta$ -гетеродимеры ТМ Kalyva et al. (2012) Biochemistry 51, 6388–6399), который мы и применили в наших исследованиях, главная задача которых состояла в том, что-

бы выяснить, как влияют различные мутации в α - или β -цепи ТМ на свойства $\alpha\beta$ -гетеродимеров. В частности, мы исследовали влияние стабилизирующих замен D137L и G126R в центральной части α -цепи на структуру и свойства $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ. Методом кругового дихроизма (КД) показано, что термостабильность $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ существенно выше, чем у $\beta\beta$ -гомомеров, но все-таки несколько ниже, чем у $\alpha\alpha$ -гомомеров. Особенно ярко этот эффект проявлялся в случае одновременной замены остатков D137L и G126R в α -цепи мутацией D137L/G126R. Мы также исследовали стабильность комплексов, образуемых гетеродимерами ТМ с F-актином; эти эксперименты проводили, измеряя температурные зависимости диссоциации таких комплексов, регистрируемой по снижению светорассеяния. Показано, что гетеродимеры ТМ с заменами D137L/G126R в α -цепи диссоциируют с поверхности актиновых филаментов при значительно более высокой температуре, чем $\beta\beta$ -гомомеры, но все-таки при более низкой температуре, чем $\alpha\alpha$ -гомомеры ТМ с такими заменами. В экспериментах, проведенных в искусственной системе подвижности (*in vitro* motility assay), было показано, что замена D137L/G126R в α -цепи, повышающая скорость скольжения регулируемых актиновых филаментов в случае $\alpha\alpha$ -гомомеров, заметно снижает ее в случае $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ. Таким образом, мутации в α -или β -цепях ТМ могут по-разному влиять на свойства гомодимеров и гетеродимеров ТМ. *Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 16-34-00654).*

РОЛЬ ЕСТЕСТВЕННЫХ ИНТЕРМЕДИАТОРОВ В МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ БЕЛКОВЫХ СТРУКТУР

Ф.Н. Гильмиярова, В.М. Радомская, Е.А. Рыскина, Н.А. Колотьева, Г.М. Баишева, Ю.В. Первова

Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия

Многообразные функции белков обеспечивают работу основных биологических систем организма. Ключевую роль в этом играют белок–белковые взаимодействия: репликация ДНК, передача сигнала, иммунный ответ регулируются комплексом белков. Успехи геномики и протеомики составили достаточное представление о количестве синтезированных белков. Оцениваются возможные типы их взаимодействия, интерфейсы, шаблоны интерактивного взаимодействия. Вопрос о роли, характере и избирательности взаимодействия метаболитов с белками требует изучения. Цель исследования – прогнозирование биологических эффектов метаболитов, оценка характера белок-белковых взаимодействий гликопротеинов А и В АВ0 системы в ответ на действие пирувата, этанола, лактата. В качестве молекулярной модели белок-белкового взаимодействия нами использована антиген-антителная АВ0 система групповой принадлежности крови, индивидуальный, генетически детерминированный признак. Биологическое зондирование осуществлялось такими метаболитами, как пируват, лактат, этанол. Потенциальные свойства этих естественных интермедиатов изучены *in silico* с использованием программы PASS версии 1.917, Pharma expert, раскрывающих полифункциональность этих соединений. Установлено, что пируват обладает 257 активностями, лактат – 318. На молекулярных моделях было установлено, что пируват оказывает разнообразное действие на антигены А и В, меняя количество образующихся иммунных комплексов, их параметры в образцах А(II) группы, В(III) и АВ(IV) группах крови. Лактат, пируват, этанол меняют узнавание естественных антител антигенными деривантами В-антигена, ускоряют время образования комплексов анти-А и анти-В моноклональных антител с антигенами, что подтверждено данными проточной цитофлуориметрии и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Формируется база знаний об особенностях молекулярного ответа белок-белкового взаимодействия антигенов 0(I) – АВ(IV) групп крови в ответ на эти эндогенные стимулы. Установлена регуляторная роль интермедиатов, определяющих индивидуальную реакцию каждого из антигенов АВ0 системы в реализации их функций. Полученные сведения раскрывают причины индивидуальной реакции на действия факторов экзогенной и эндогенной природы у носителей различных групп крови, что имеет важное значение для превентивной медицины и способствует более глубокому пониманию процессов рецепции, межмолекулярного узнавания в норме и патологии.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУКТОВ МОДИФИКАЦИИ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ВОССТАНОВЛЕННЫМ ГЛУТАТИОНОМ

Е.В. Шмальгаузен, М.В. Серебрякова, В.И. Муронец

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В последнее время возрос интерес к S-глутатионилированию белков в связи с возможной регуляторной ролью этой модификации. Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) также обнаружена среди белков, подвергающихся глутатионилированию, однако физиологический смысл этой модификации остается непонятным. В данной работе исследовали продукты модификации ГАФД восстановленным глутатионом (GSH), а также обратимость глутатионилирования. Показано, что в присутствии 200 мкМ H_2O_2 и 200 мкМ GSH ГАФД полностью инактивируется. В отличие от окисления H_2O_2 в отсутствие GSH, эта инактивация частично обратима. Следовательно, при окислении H_2O_2 в отсутствие и в присутствии GSH образуются разные продукты окисления. MALDI-масс-спектрометрический анализ ГАФД, окисленной H_2O_2 в присутствии GSH, обнаружил дополнительное плечо в спектре ГАФД, соответствующее по молекулярной массе смешанному дисульфиду ГАФД-S-SG, которое исчезало после обработки дитиотреитолом. Анализ масс-спектров трипсинового гидролизата модифицированной ГАФД выявил наличие дисульфидного мостика в пептиде активного центра ГАФД. Таким образом, в препарате ГАФД, окисленной H_2O_2 в присутствии GSH, часть цистеинов активного центра (Cys150) образует смешанный дисульфид ГАФД-SSG, а другая их часть образует дисульфидный мостик с близлежащим Cys154. Анализ обратимости данной модификации ГАФД показал, что 15% активности восстанавливаются в присутствии 5 мМ GSH, что соответствует восстановлению смешанного дисульфида; 70% активности восстанавливается 5 мМ дитиотреитолом, что соответствует восстановлению как смешанного дисульфида, так и дисульфидных мостиков. Следовательно, на долю внутримолекулярного дисульфида приходится около 55% модифицированной ГАФД. Вероятно, глутатионилированная ГАФД является промежуточным продуктом окисления ГАФД в присутствии GSH. Образование смешанного дисульфида облегчает образование внутримолекулярного дисульфида между Cys150 и Cys154. Физиологический смысл этой реакции состоит в том, что в отличие от продуктов окисления цистеинов перекисью водорода, образующихся в отсутствие GSH (сульфиновой и сульфоновой кислот), внутримолекулярный мостик легко восстанавливается ДТТ. В клетке эту функцию выполняет тиоредоксин. *Работа выполнена при поддержке РФФИ № 16-04-00492.*

АКТИВНОСТЬ ИНОЗИН-5'-МОНОФOSFAT ДЕГИДРОГЕНАЗЫ (ИМФДГ) И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ НУКЛЕОТИДОВ *ESCHERICHIA COLI* С ДЕЛЕЦИЕЙ СУБДОМЕНА И ТОЧЕЧНЫМИ МУТАЦИЯМИ ГЕНА ФЕРМЕНТА

А.С. Соловьёв, М.А. Пимкин

Смоленский государственный медицинский университет, Смоленск, Россия; Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA

На основании штамма дикого типа *E. coli* BW25113 был сконструирован штамм *E. coli* MP101(guaBΔcbs), содержащий делецию субдомена ИМФДГ с сохранением рамки считывания каталитического домена. Несмотря на делецию субдомена каталитическая функция ИМФДГ сохранялась, поскольку полученный мутантный штамм *E. coli* характеризовался идентичной дикому типу скоростью роста как на насыщенных, так и минимальных средах. Однако *in vivo* было обнаружено снижение активности фермента в экстрактах штаммов MP101 по сравнению с активностью ИМФДГ в экстрактах дикого типа. Проведенный иммуноблоттинг белковых клеточных экстрактов штаммов BW25113 и MP101 показал, что снижение ферментативной активности ИМФДГ *in vivo* сопровождается снижением количества фермента и накоплением низкомолекулярных продуктов. Измерение внутриклеточных концентраций (пулов) нуклеотидов в клеточных экстрактах штаммов BW25113 и MP101 показало, что отличающимся между мутантным и диким типом является пул АТР, который в 1,8 раза выше у *E. coli* MP101. Концентрация других нуклеотидов, включая гуанилаты, претерпели изменения в меньшей степени. Для изучения влияния точечных мутаций в последовательности гена ИМФДГ, кодирующей субдомен и, ассоциированных с пигментным ретинитом, на нуклеотидный обмен были созданы коллекции штаммов *E. coli*, несущие соответствующую мутацию на хромосоме. Предварительное выравнивание аминокислотных последовательностей ИМФДГ *E. coli* и человека показало, что все аминокислотные остатки ИМФДГ-1 человека, замены которых приводят к пигментному ретиниту, консервативны в ИМФДГ *E. coli*. Измерение нуклеотидных пулов рекомбинантов показало, что в противоположность полному удалению субдомена некоторые точечные мутации, ассоциированные с пигментным ретинитом, вызывали снижение пулов АТР штаммов-мутантов. Таким образом, несмотря на то, что ИМФДГ является ферментом биосинтеза гуаниловых нуклеотидов и не участвует непосредственно в синтезе аденилового пула, удаление субдомена приводит к значительному повышению внутриклеточной концентрации АТР. Точечные мутации в гене ИМФДГ, ассоциированные с пигментным ретинитом, имеют эффект противоположный полному удалению субдомена. Это может свидетельствовать о двустороннем эффекте субдомена ИМФДГ на синтез адениловых нуклеотидов у *E. coli*.

РОЛЬ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ В ЛАККАЗЕ БАЗИДИОМИЦЕТА *TRAMETES HIRSUTA*

О.А. Глазунова Н.А. Трушкин Е.А. Михантьева

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Лакказы (п-дифенол: кислород оксидоредуктазы К.Ф. 1.10.3.2.) являются одними из наиболее перспективных ферментов в различных отраслях промышленности. Лакказа является внеклеточным гликопротеином и относится к группе медьсодержащих голубых оксидаз, которые катализируют одноэлектронное окисление субстратов с сопутствующим четырехэлектронным восстановлением молекулы кислорода до двух молекул воды. Гликозилирование оказывает значительное влияние на активность и стабильность лакказ, однако роль углеводной части лакказ до конца остается неясной. В настоящей работе была исследована лакказа базидиального гриба *T.hirsuta*, структура которой была ранее получена и депонирована в банк данных PDB с кодом 3FPX. По данным рентгенструктурного анализа лакказы *T.hirsuta* содержит четыре сайта гликозилирования – гликозилированы остатки Asn54, Asn217, Asn333 и Asn436, причем один из них, Asn333, расположен в петле, формирующей субстрат-связывающий карман. В работе было получены две дегликозилированные формы лакказы *T.hirsuta*. Первая форма содержала только по одному остатку N-ацетилглюкозамина (НАГ) в каждом сайте гликозилирования, маннозные цепи были удалены (ThN). Вторая форма – полностью дегликозилированная, с удаленными маннозными цепями и остатками НАГ (ThF). Для всех трех препаратов лакказы – нативной, ThN и ThF лакказ – была изучена термостабильность и определены каталитические константы для реакций окисления модельного субстрата АБТС и фенольного субстрата 2,6-диметоксифенола. Дегликозилирование не влияло на термостабильность. Время полуинактивации при 60°C составило 20, 17 и 15 минут для нативной, ThN и ThF лакказ соответственно. Константы Михаэлиса для окисления АБТС не изменились при дегликозилировании, каталитическая константа для ThN увеличилась в полтора раза, а для ThF осталась на уровне нативного фермента. В случае окисления 2,6-диметоксифенола дегликозилирование приводило к увеличению константы Михаэлиса в два раза для обеих форм, при этом каталитическая константа для ThN оставалась неизменной, а для ThF уменьшалась в 1,3 раза. Таким образом, было показано, что дегликозилирование лакказы *T.hirsuta* не влияет на ее термостабильность, однако оказывает эффект на каталитические свойства фермента, который зависит от природы окисляемого субстрата.

ИНГИБИРОВАНИЕ ДИПЕПТИДИЛПЕПТИДАЗЫ 4 РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ЦИКЛИЧЕСКИМИ АМИДАМИ – СТРУКТУРНЫМИ АНАЛОГАМИ ПРОЛИНА

И.Ю. Филиппова¹, Н.И. Соколенко², Т.Л. Воюшина², В.Ф. Терещенкова¹, Е.Н. Элпидина³

¹Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ²ГосНИИ Генетика; ³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Дипептидилпептидаза 4 (ДПП 4), принадлежащая к семейству S9 сериновых пептидаз, играет ключевую роль в различных регуляторных процессах у человека и животных. Нами недавно была найдена секретируемая ДПП 4 насекомых семейства *Tenebrionidae*, кардинально отличающаяся по своей биологической функции от хорошо изученных регуляторных пептидаз млекопитающих. Эта пептидаза является доминирующим и наиболее активным пищеварительным ферментом в спектре ПСП у этих организмов, принимая участие не в регуляции, а в эффективной деградации пролинсодержащих белков и пептидов, являющихся основным пищевым субстратом данного вида насекомых. Для дифференциальной оценки ферментативной активности ДПП 4, входящей в состав сложного ферментного комплекса ПСП различных типов, актуальным является дизайн, разработка методов синтеза и изучение ингибиторов этого фермента. С использованием метода молекулярного докинга был проведен дизайн новых ингибиторов ДПП 4 на основе пептидомиметиков, содержащих С-концевые остатки циклических аминов, являющихся структурными аналогами пролина. Строение предложенных соединений может быть выражено общей формулой X-A-Y, где X=H, Ile, Ala, D-Ala; A=Pro, Ile; Y=Pyg (пирролидин), Pygaz (пиразол), NMP (N-

метилпиперазин), Pip (пиперидин), Mf (морфолин). Синтез целевых соединений проводили методом активированных эфиров с использованием N-оксисукцинимиды и пентафторфенола. Пептидомиметики были получены с выходами 67–88% и охарактеризованы методами ТСХ, ЯМР, масс-спектрометрии. Действие синтезированных соединений проверяли на препаратах ДПП 4 человека, очищенной ДПП 4 *Tenebrio molitor*, а также сложном мультимерном комплексе личинок *T. molitor*. Для Pro-Pip, Pro-Mf, Ile-Pip, Ile-Mf определены IC_{50} , значения которых сопоставимы, а в ряде случаев превосходят соответствующий показатель для известных пептидных ингибиторов ДПП 4 дипротина А (Ile-Pro-Ile) и дипротина В (Val-Pro-Leu). Было показано, что синтезированные ингибиторы совсем не ингибируют цистеиновые пептидазы, практически не влияют на химолирипсин, а, как мы и предполагали, более специфично действуют на ПСП, причем наилучший ингибирующий эффект достигается для ДПП 4. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 15-03-06675-а, 15-04-08689-а, 16-34-01012-мол_а.

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ ДЕЗОКСИ-, ОКСИ- И КАРБОКСИГЕМОГЛОБИНА В ДИАПАЗОНЕ ДЛИН ВОЛН 190–240 НМ

И.А. Лавриненко, В.В. Волкова, Г.А. Вашанов, В.Г. Артюхов Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Спектры поглощения лигандных форм гемоглобина в видимом и ближнем УФ-диапазонах длин волн изучены достаточно подробно. Однако интенсивное светопоглощение пептидных групп белка в области 190–240 нм создает ряд методических трудностей при анализе спектральных девиаций его гемпроизводных, обусловленных как вариативностью микроокружения хромофоров боковых групп аминокислот, так и параметрами электронной конфигурации гема в зависимости от наличия и типа связываемого макромолекулой лиганда. Оптимизацией режимов работы спектрофотометра, подбором концентрации и длины оптического пути, а также алгоритмов фильтрации регистрируемых данных достигнуты условия, позволяющие выявить различия в спектрах поглощения дезокси-, окси- и карбоксигемоглобина в диапазоне длин волн от 190 до 240 нм. Выявлено, что на разностном спектре HbCO–HbO₂ обнаруживается экстремум в районе 210 нм, Hb–HbCO — 225 нм, для Hb–HbO₂ — перегиб в области 220 нм. Регистрируемые изменения в спектрах светопоглощения исследуемых производных гемопротеида обусловлены, на наш взгляд, преимущественно за счет разности в спектрах поглощения их гемовой компоненты. Однако следует принимать во внимание тот факт, что связывание лиганда гембелком инициирует формирование водородной связи между Y42α и D99β, а Y140α и Y145β делают свободными от ван-дер-ваальсовых и водородных связей, жестко фиксирующих эти остатки в полостях F и H макромолекулы биополимера. Это обстоятельство может приводить к изменению спектральных свойств тирозиновых остатков, так как близость места протонирования гидроксильной группы к π-электронной системе бензольного кольца этой аминокислоты вызывает весьма значительные девиации волнового сдвига и интенсивности ее поглощения. Не исключен также факт изменения спектральных свойств гембелка и за счет остатков гистидина, принимающих непосредственное участие при связывании лигандов железом простетических групп.

НОВЫЙ КАЛЬЦИЕВЫЙ ИНДИКАТОР НА ОСНОВЕ ТРОПОНИНА С ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ НЕЙРОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

Н.В. Барыкина, О.М. Субач, А.Ю. Малышев, Д.А. Доронин, В.П. Сотсков, М.А. Рощина, Т.А. Куницына, Ф.В. Субач

Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

Генетически кодируемые кальциевые индикаторы наряду с современными методами флуоресцентной микроскопии позволяют использовать неинвазивные чувствительные подходы для визуализации определенных популяций нейронов в течение длительного времени *in vivo*. Сенсорная часть большинства индикаторов состоит из калмодулина или тропонина С (ТнС) — белков, содержащих EF-мотивы, отвечающие за связывание ионов Ca^{2+} . Созданные на настоящий момент генетически кодируемые кальциевые индикаторы имеют в своем составе четыре или два EF-мотива, которые связывают, соответственно, четыре или два иона Ca^{2+} на молекулу сенсора. Сенсоры, состоящие из уменьшенного числа кальций-связывающих доменов, предпочтительнее, так как они потенциально могут минимизировать цитотоксичность в течение длительных экспериментов по визуализации нейрональной активности. Целью данного проекта была разработка небольшого кальциевого индикатора на основе одного флуоресцентного белка, связывающего два иона Ca^{2+} . Для этой цели мы выбрали минимальный кальций-связывающий домен ТнС из сенсоров семейства «Twist» в качестве сенсорной части (Thestrup et al., 2014) и GFP-подобный белок в качестве флуоресцентной части. Далее мы создали и скринировали библиотеку с рандомизированными линкерами между кальций-связывающим доменом и флуоресцентной частью. Лучшие мутанты из исходной библиотеки подвергали нескольким раундам случайного мутагенеза и скринировали на бактериальных колониях, бактериальных суспензиях и чистых белках. Варианты с наибольшей яркостью и контрастом скринировали на первичной культуре мышиных нейронов с помощью метода локальной фиксации потенциала. Был выбран один из вариантов сенсора на основе ТнС, демонстрирующий кинетику схожую с сенсором GCaMP6s. Кроме того, мы использовали разработанный сенсор для визуализации нейрональной активности *in vivo* в зрительной коре свободноподвижной мыши с помощью двухфотонного микроскопа и миниатюрного микроскопа NVista. Таким образом, нам удалось разработать новый тип чувствительного кальциевого сенсора небольшого размера на основе одного флуоресцентного белка и минимального кальций-связывающего домена из тропонина С. Работа была поддержана грантом РФФИ № 15-04-03383 и грантом РНФ № 16-15-10323.

ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ РОЛЬ NUDIX ПИРОФОСФАТАЗЫ NUDT13 В РЕГУЛЯЦИИ УРОВНЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО NAD В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

В.А. Куликова^{1,2}, В.Д. Харченко¹, М. Ван Линден³, М.А. Ходорковский¹, М. Циглер³, А.А. Никифоров^{1,2}

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург; ²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия; ³Университет Бергена, Департамент молекулярной биологии, Берген, Норвегия

Никотинамид аденин динуклеотид (NAD) — ключевой фактор регуляции митохондриального метаболизма. NAD является переносчиком электронов в окислительно-восстановительных реакциях центральных метаболических путей, а также субстратом нескольких семейств регуляторных белков, которые контролируют активность различных митохондриальных ферментов, путем их NAD-зависимого деацетилирования или моно-АДФ-рибозилирования. Для эффективного осуществления

данных метаболических и сигнальных функций необходимо поддержание определенного уровня NAD в митохондриях. В клетках человека предшественником митохондриального NAD является моноклеотид NMN, который импортируется из цитозоля в митохондриальный матрикс и аденилируется там до NAD белком NMNAT3. В данной работе мы проверяем гипотезу о том, что Nudix пирофосфатаза NUDT13 может регулировать уровень митохондриального NAD путем его расщепления. Функция белка NUDT13 на данный момент не описана, но известно, что он содержит домен Zn²⁺ NADH PPase и N-концевой сигнал митохондриальной локализации. Нами был сконструирован вектор, кодирующий белок NUDT13, слитый с пептидом FLAG, для сверхэкспрессии в клетках человека. Для оценки изменения уровня митохондриального NAD мы использовали клеточную систему, которая представляет собой сверхэкспрессию каталитического домена поли-АДФ-рибозил полимеразы PARP1 в митохондриальном матриксе (Mito-PARP). В присутствии NAD Mito-PARP авто-поли-АДФ-рибозилируется, при этом, чем выше концентрация NAD в митохондриях, тем больше полимеров АДФ-рибозы (PAR) образуется. Количество PAR оценивали методом иммуноблоттинга. Мы показали, что белок NUDT13 локализуется исключительно в митохондриях. Также мы установили, что его ко-экспрессия с белком Mito-PARP приводит к значительному снижению уровня PAR в митохондриальном матриксе. Полученные результаты свидетельствуют о том, что NUDT13 может расщеплять митохондриальный NAD и таким образом регулировать уровень динуклеотида в органелле, однако, нельзя исключить возможность прямого расщепления белком PAR. Дальнейшее изучение белка NUDT13 необходимо для описания его субстратной специфичности и выявления роли в регуляции митохондриального метаболизма. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 16-34-00518 мол_а и № 14-04-01765 А.*

ВЛИЯНИЕ ТРОЛОКСА И ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА НА ЛИПОПЕРОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСА ЦИТОХРОМА С С КАРДИОЛИПИНОМ

Л.А. Ромодин^{1,2}, Е.Н. Зарудная¹, Г.К. Владимиров², Ю.А. Владимиров² ¹Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина; ²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Комплекс цитохрома С с кардиолипином играет ключевую роль при запуске апоптоза за счет своей липопероксидазной активности, блокированием которой антиоксидантами можно остановить апоптоз при многих патологиях. Изучение влияния антиоксидантов тролокса и дигидрохверцетина (ДГК) на липопероксидазную активность комплекса цитохрома С с кардиолипином проводилось методом активированной кумарином С-334 хемилюминесценции (ХЛ). Тролокс задерживает развитие вспышки ХЛ, зависимость времени этой задержки от концентрации тролокса, что свидетельствует о высокой антиоксидантной активности [1]. Было обнаружено наличие двух стадий действия тролокса, которое может быть следствием наличия в молекуле двух гидроксильных групп: на первой стадии радикалы перехватывает одна группа, а на второй – вторая. При действии ДГК развивается ХЛ, характерная для антиоксидантов средней силы [1]: латентного периода нет, время наступления максимумов вспышек ХЛ практически не зависят от концентрации ДГК, при том, что амплитуда ХЛ снижается с увеличением концентрации ДГК. При концентрации ДГК, равной 0,51 мкМ, при соотношении кардиолипин : цитохром С =60:1. наблюдается 50% угнетение пероксидазной активности комплекса. Таким образом, антиоксиданты подавляют не только липоксигеназную [2], но и липопероксидазную активность комплекса цитохрома с с кардиолипином.

1. Владимиров Г.К., Сергунова Е.В., Измайлов Д.Ю., Владимиров Ю.А. Хемилюминесцентная методика определения общей антиоксидантной активности в лекарственном растительном сырье // Вестник РГМУ /, 2, 2015. 65-71.
2. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В., Демин Е.М., Матвеева Н.С., Любимский О.Б., Новиков А.А., Измайлов Д.Ю., Осипов А.Н., Тихонов В.П., Каган В.Е. Дигидрохверцетин (таксифолин) и другие флавоноиды как ингибиторы образования свободных радикалов на ключевых стадиях апоптоза // Биохимия / 74, 3, 2009. 372-9.

ЛИПОПЕРОКСИДАЗНАЯ И ЛИПОКСИГЕНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСА ЦИТОХРОМА С С КАРДИОЛИПИНОМ

Л.А. Ромодин^{1,2}, Е.Н. Зарудная¹, Г.К. Владимиров², Ю.А. Владимиров² ¹Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина; ²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

На ранних этапах запуска апоптоза ключевую роль играет комплекс цитохрома С с кардиолипином, обусловленную его липоксигеназной при отсутствии перекиси водорода и липопероксидазной при достаточных ее концентрациях активностью. Однако до нашего исследования оставалось не ясным, имеют ли место эти эффекты комплекса в живых системах, а также, какова роль примесного железа в результатах, получаемых *in vitro*. Были созданы модели: комплекс цитохрома С с кардиолипином из сердца быка (БКЛ) в соотношении 1:60 и интактные митохондрии из печени *Rattus norvegicus* линии Wistar. Для определения возможной роли негемового железа проведено сравнение активированной кумарином С-334 хемилюминесценции (ХЛ) системы цитохром С–кардиолипин с ХЛ систем Fe²⁺-соевый лецитин и пероксидаза хрена-соевый лецитин в присутствии комплексонов на железо, о-фенантролина и ЭДТА, которые дозозависимо подавляли образование липидных радикалов в пробе с ионами Fe²⁺, и не влияли на этот процесс в модельных системах, что указывает на обусловленность ХЛ системы цитохром С–БКЛ именно этим комплексом, а не свободным Fe²⁺. Сходные кинетические кривые с системой цитохром С–БКЛ были получены для суспензии митохондрий в присутствии перекиси водорода, что говорит о наличии в митохондриях компонента с липопероксидазной активностью. Этим компонентом, по-видимому, является комплекс цитохрома С с кардиолипином. Таким образом, процесс апоптоза по митохондриальному пути, имеющий место при многих патологиях, можно блокировать, воздействуя на комплекс цитохрома с с кардиолипином, например, антиоксидантами.

ФИБРИЛЛЯРНАЯ АГРЕГАЦИЯ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА КАК ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИАГРЕГАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ШАПЕРОНО-ПОДОБНЫХ БЕЛКОВ 14-3-3

Н.Н. Случанко¹, Е.Г. Максимов² ¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, ²Кафедра биофизики, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Антиагрегационная активность описана для целого ряда белков шаперонной природы и является их профильным свойством, обеспечивающим защиту клетки в условиях стресса. Многие белки-шапероны могут проявлять антиагрегационную активность по отношению к белкам, способным образовывать фибриллярные агрегаты, которые зачастую обнаруживаются морфологически у больных нейродегенеративными заболеваниями, в т. ч. болезнью Паркинсона, которая, как и другие синуклеинопатии, характеризуется отложениями (тельцами Леви), богатыми белком альфа-синуклеином (αSN). По данным

литературы, кроме aSN, тельца Леви содержат значительное количество белков-шаперонов, а также универсальных адаптерных белков 14-3-3. Поскольку данные белки распространены в нервной ткани и выполняют в клетке различные функции, разумно предположить их участие в процессах патогенеза синуклеинопатий. Белки 14-3-3, обнаруживаемые в агрегатах у больных нейродегенеративными заболеваниями, по всей видимости, влияют на ход агрегации амилоидоподобных белков, таких как aSN, при этом выяснение данного механизма имеет важный медицинский аспект, однако неизвестно, с какими олигомерными формами белки 14-3-3 способны взаимодействовать напрямую, а также непонятно, как 14-3-3 влияют на процесс амилоидной агрегации. В данной работе был налажен способ получения больших количеств aSN в бактериальной системе экспрессии, при этом получаемый по нашей методике белок соответствовал характеристикам из литературы. Для детекции образования амилоидных структур aSN использовали теофлавин Т, при этом момент их формирования сопровождался увеличением светорассеяния, интенсивности флуоресценции теофлавина Т, а также времени жизни флуоресценции и релаксации анизотропии флуоресценции, характеризуя различные аспекты фибриллярной агрегации aSN. Добавление различных краудинг агентов ускоряло момент наступления агрегации aSN, что согласуется с данными литературы. По предварительным данным, белки 14-3-3 не способны взаимодействовать с мономерами aSN, но оказывают двойственное действие на его агрегацию: димерные формы 14-3-3 ускоряли агрегацию, но не соосаждались с aSN, в то время как мономерные формы немного замедляли агрегацию aSN, но обнаруживались в его осадке. *Работа поддержана грантом РФФИ 14-04-00146а и стипендией Президента РФ (СП-367.2016.4).*

ДЕЙСТВИЕ МЕЛАТОНИНА НА ПРОЦЕСС МОДИФИКАЦИИ АЛЬБУМИНА ФРУКТОЗОЙ И МЕТИЛГЛИОКСАЛЕМ

А.Е. Донцов, П.П. Зак *Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия*

Известно, что гормон мелатонин как химическое вещество является довольно сильным антиоксидантом. Общепринято, что в результате свободно радикальных процессов происходит избыточное накопление активных карбонильных соединений и, как следствие, развитие карбонильного стресса. Предполагается, что мелатонин способен оказывать тормозящее действие на развитие диабетических осложнений, вызванных карбонильным стрессом. В настоящей работе исследовано влияние мелатонина на процесс модификации бычьего сывороточного альбумина редуцирующими сахарами и метилглиоксалем, одним из наиболее активных представителей карбонильных соединений. Методом ингибирования хемилюминесценции люминола, индуцированной пероксидом водорода, была оценена антиоксидантная активность мелатонина. Константа тушения хемилюминесценции люминола мелатонином была равна $(6 \pm 3) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Исследовано влияние мелатонина, как антиоксиданта, на процесс модификации сывороточного альбумина в реакции Майяра в присутствии высоких концентраций фруктозы при 37°C. Показано, что в начальный период реакции (до трех суток), мелатонин в миллимолярных концентрациях замедляет скорость накопления флуоресцирующих Шиффовых аддуктов на 50%. Однако, в дальнейшем происходит значительное ослабление ингибирующего действия мелатонина. Это, возможно, связано с параллельным процессом фруктозилирования самого мелатонина с образованием неизвестного низкомолекулярного флуоресцирующего продукта (с максимумом эмиссии 472 нм при длине волны возбуждающего света 365 нм). Природа этого флуоресцирующего продукта исследуется. Показано также, что мелатонин, практически не влияет на процесс модификации альбумина метилглиоксалем. Предполагается, что мелатонин, благодаря своим антиоксидантным свойствам, способен ингибировать развитие реакции Майяра, но не влияет на процесс модификации белка реактивными карбонилами. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-29-03865).*

К БИОХИМИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКЕ СПОНТАННОГО И ЗАПУСКАЕМОГО ФАКТОРОМ КОНТАКТА ЛИЗИСА ФИБРИНОВОГО ГЕЛЯ ЭУГЛОБУЛИНОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ

А.В. Тимофеев *НИИ гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург, Россия*

Важной составляющей поддержания крови в жидком состоянии у позвоночных служит система пептидаз фибринолиза (ФЛ). Для оценки ФЛ-потенциала крови наиболее часто используют коагулологические тесты самопроизвольного и индуцированного растворения фибрина эуглобулиновой фракции (ЭЛС и ЭЛИ). Интересным представляется значение кофакторной функции фибриновой матрицы в этих тестах, связанное с «операционным усилителем» (+/-) в петле обратной связи генерации плазмином антиФЛ в виде различных форм основных карбоксипептидаз плазмы крови (ОКП), активируемых в т.ч. и по внутреннему пути. Материалом работы послужила свежая бестромбоцитная плазма, приготовленная на цитрате (n=6). Для оценки ОКП (по степени гидролиза эндогенного субстрата – фибрина) в ЭЛС и ЭЛИ использовалась простая и модифицированная Chinard нингидриновая реакция в кислой среде. Анализ в реакционной среде определялся в каждом образце параллельно и в 4-х точках: интактная плазма; супернатант после инкубации с каолином (без); после свертывания плазмы (надоса-док от геля); по окончании полного растворения сгустка. Перед определением (СФ56) продуктов реакции все пробы депротенинизировались кислотой. Содержание лизина в интактных образцах оказалось близким к известным референтным интервалам (14–26 мкг/мл). В обоих случаях наблюдалось увеличение свободного лизина, что указывает на возможный ферментативный характер процесса, связанный с фибрином (значительнее при коагуляции-лизисе плазмы). На этапе осаждения и после образования геля, уровень свободных α-аминокислот в супернатанте показал незначительный прирост, причём выше в случае с каолином. Существенно отличалась разница в приращении аналита после ЭЛС и ЭЛИ: 20–47%. Результат в случае с опосредуемым ф. Хагемана ФЛ можно объяснить высокой степенью активации плазмينا и форм КП (в частности CPN). Такой лабораторный подход при усовершенствовании можно использовать для изучения регуляции различными формами ОКП-активности баланса гипофибринолиз-гиперфибринолиз в индивидуальном образце плазмы, как дополнительный показатель в клинике нарушений гемостаза.

ИЗМЕНЕНИЕ ИМПЕДАНСА КРОВИ В ДИНАМИКЕ ИНТОКСИКАЦИИ НИТРИТАМИ И ВТОРИЧНЫМИ АМИНАМИ

М.В. Каневский, И.К. Миронова, С.А. Коннова, О.В. Семячкина-Глушковская

Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

Импедансометрия является структурно-функциональным методом исследования патофизиологических нарушений. Метод позволяет охарактеризовать динамику изменения электрофизических свойств ткани в связи с различными экзо- и эндо-

генными воздействиями, в частности при индуцировании предраковых состояний у крыс при воздействии канцерогенами. Цель данной работы: установить зависимость характера изменения импеданса крови от возраста животного и периода развития интоксикации. Интоксикация у крыс вызывалась смешанным воздействием: кормлением *per os* пищей, содержащей толуидин (25 мг/1 кг живого веса) в сочетании с 0,2% нитрита натрия в воде. Экспериментальные животные были разделены на контрольные и опытные группы по возрастному признаку (гр. 1 – 18 месяцев, гр. 2–3 месяца) по девять особей в каждой. Импеданс цельной крови определяли с интервалом в 1 месяц. Дисперсионные кривые зависимости импеданса от частоты тока контрольных животных первой и второй групп достоверных различий не имели, коэффициенты поляризации были выше 1, что свидетельствует о высоком уровне обмена веществ и структурной целостности форменных элементов крови. После первого месяца эксперимента величины сопротивления крови были достоверно выше контрольных значений в обеих возрастных группах, однако, величины коэффициента поляризации оставались на прежнем уровне. Возможно, на первом месяце интоксикации высокие значения сопротивления связаны с перемещением жидкости из плазмы в форменные элементы без нарушения их целостности. Это предположение подтвердилось в эксперименте с отмытыми эритроцитами. Характер их дисперсионных кривых был идентичен характеру цельной крови. Второй и третий месяцы эксперимента привели к достоверно резкому падению величин импеданса в опытных группах по сравнению с контрольной группой, коэффициент поляризации опустился до значений 0,2. При этом динамика изменения импеданса обеих групп животных была аналогична: на первом месяце наблюдали резкое возрастание, а на втором и третьем снижении значений ниже контрольного уровня. Таким образом, изменение импеданса позволяет наблюдать в динамике уровень ответа соединительной ткани на токсическое воздействие. Работа выполнена при финансовой поддержке гос. задания Минобрнауки России (проектная часть № 17.488.2014/К).

BROAD NEUTRALIZATION OF INFLUENZA VIRUSES AND IMPLICATIONS FOR A UNIVERSAL VACCINE AND THERAPY

Ian A. Wilson *Department of Integrative Structural and Computational Biology and the Skaggs Institute for Chemical Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037, USA.*

Until relatively recently, most antibodies to influenza virus were thought to be strain-specific and protect only against highly related strains within the same subtype. Since 2008, a number of human antibodies have been isolated that are much broader and neutralize across different subtypes and types of influenza viruses through binding to functionally conserved sites. The major surface antigen, the hemagglutinin (HA), of influenza virus is the main target of these neutralizing antibodies. We have determined crystal structures of many broadly neutralizing human antibodies in complex with variety of different HAs and show they bind to the highly conserved functional sites on the HA fusion domain (stem) in influenza A (1-3) as well as influenza B (4) viruses, as well as to the receptor binding site (e.g. 5-7). The characterization of these broadly neutralizing antibodies along with their mode of binding and neutralization (8) has provided exciting new opportunities for structure-assisted vaccine design and for design of therapeutics that afford greater protection against influenza viruses (e.g. 9, 10). Indeed, a mini-HA immunogen that was designed to mimic the highly conserved HA stem elicited a protective response against different influenza subtypes, such as H1N1 and H5N1, in mice and monkeys (11) and is a promising proof of concept for development of a more universal flu vaccine. This work has been supported by NIH grants AI117675, AI117905, HHSN2722014, GM094586 and Janssen/Crucell.

1. Ekiert et al. (2009) Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science* 324:246-251.
2. Ekiert et al. (2011) A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science* 333:843-850.
3. Friesen et al. (2014) A common solution to group 2 influenza virus neutralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111:445-450.
4. Dreyfus et al. (2012) Highly conserved protective epitopes on Influenza B viruses. *Science* 337:1343-1348.
5. Ekiert et al. (2012) Cross-neutralization of influenza A viruses mediated by a single antibody loop. *Nature* 489:526-532
6. Xu et al. (2013) A recurring motif for antibody recognition of the receptor-binding site of influenza hemagglutinin. *Nature Struct. Mol. Biol.* 20:363-370
7. Lee et al. (2014) Receptor mimicry by antibody F045-092 facilitates universal binding to the H3 subtype of influenza virus. *Nature Commun.* 5: 3614.
8. Lee PS, Wilson IA (2015) Structural characterization of viral epitopes recognized by broadly cross-reactive antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol.* 386:323-41.
9. Fleishman SJ et al. (2011) Computational design of proteins targeting the conserved stem region of influenza hemagglutinin. *Science* 332:816–821.
10. OKodoy et al. (2016) A computationally designed hemagglutinin stem-binding protein provides in vivo protection from influenza independent of a host immune response. *PLoS Pathog.* 12: e1005409.
11. Impagliazzo et al. (2015). A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen. *Science* 349:1301-1306.

ОМИКСНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

ГЕНОМНАЯ МЕДИЦИНА: ПУТИ ПОИСКА «ПОТЕРЯННОЙ» НАСЛЕДУЕМОСТИ ПРИ ПОЛИГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

О.О. Фаворова, О.Г. Кулакова, Н.А. Матвеева, А.Н. Бойко, М.Я. Руда, А.В. Фаворов *Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ; Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ; Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия; Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, Maryland, США*

Для полигенных заболеваний (ПЗ), составляющих большинство заболеваний человека, характерен не-Менделевский тип наследования. Данные о полиморфных вариантах генов, ассоциированных с развитием ПЗ, остаются неполными и противоречивыми; 50–80% наследуемости не нашла пока своего объяснения и остается «потерянной». Для решения проблемы «потерянной» наследуемости необходимо минимизировать влияние этнической гетерогенности исследуемых индивидов и клинической гетерогенности больных, в связи с чем необходима репликация результатов генетических исследований в независимых популяциях. Мы провели мета-анализ всех опубликованных к 2015 г. данных полногеномных исследований ассоциации генов (genome-wide association studies, GWAS) с рассеянным склерозом (РС) и реплицировали у этнических русских данные об ассоциации с РС ряда генов иммунного ответа. Удалось также валидировать на независимой выборке этнических русских найденную нами ассоциацию генов систем воспаления и коагуляции с другим ПЗ – инфарктом миокарда (ИМ). Для обоих ПЗ проведено исследование роли полиморфизма генов регуляторных микроРНК; выявлены значимые полиморфизмы. Проведен успешный поиск эпистатически (нелинейно) взаимодействующих полиморфных вариантов генов, вовлеченных в развитие ПЗ, но не выявляемых при GWAS, для чего разработан оригинальный двухкомпонентный метод анализа эпистатических взаимодействий между генами в биаллельных сочетаниях. Предложена композитная модель для предсказания индивидуального риска ИМ, включающая единичные варианты генов и эпистатическое сочетание. Помимо генетических факто-

ров важную роль в развитии и течении ПЗ могут играть эпигенетические механизмы. Впервые проведен полногеномный анализ профиля метилирования ДНК, влияющего на экспрессию генов, в мононуклеарных клетках периферической крови больных РС в сравнении с контролями, показано участие метилирования ДНК в развитии РС. Одной из причин «потерянной» наследуемости может быть влияние экспрессии регуляторных белок-некодирующих РНК, оказываемое на развитие ПЗ посредством сиквенс-специфической посттранскрипционной регуляции мРНК-мишеней. При полногеномном анализе экспрессии микроРНК при РС и ИМ в сравнении со здоровыми выявлены дифференциально экспрессирующиеся микроРНК. *Поддержано грантами РФФ №14-14-00605 и №16-14-10251.*

ГЕНОМНАЯ ГЕОГРАФИЯ НАРОДОНАСЕЛЕНИЯ РОССИИ И МИРА

О.П. Балановский^{1,2,3} ¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН; ²Медико-генетический научный центр; ³Московский физико-технический институт, Москва, Россия

Изменчивость нашего генома в географическом пространстве описывает структуру генофонда и отражает его историю. Одним из китов, на которых стоят геногеографические исследования, являются биобанки. Биобанк коренного населения Северной Евразии, созданный нашим коллективом благодаря личному энтузиазму и благодаря международному проекту «Генографик», включает более 25 тысяч образцов из почти трехсот популяций России и сопредельных стран. В докладе будут представлены исследования, проведенные в масштабе России (на основе этого биобанка) и в масштабе мира (в рамках международного сотрудничества). Например, исследование генофонда славян показало степень взаимного сходства разных славянских популяций и историю их формирования: наложение славянской "глазури" на многослойный пирог генофонда, сформировавшийся в предшествующие эпохи. Это и многие другие исследования, проведенные параллельно по полногеномным SNP-панелям и по маркерам Y-хромосомы, показали высокую информативность Y-хромосомы, в особенности ее полного секвенирования. Знание структуры генофонда приобретает все большее значение и для медицинских исследований: многие патогенные мутации оказываются расо- или этноспецифичны, многие аллели, влияющие на мультифакториальные заболевания, по-разному проявляются в разных генофондах, а карты генетических барьеров между генофондами могут стать одним из инструментов фармакогенетики. Бурный рост на стыке генетики, биохимии, географии и истории породил много плодотворных научных направлений и, к сожалению, одну лженаучную химеру: «ДНК–генеалогия», паразитирующая на авторитете биохимии и общественном интересе к генетике, завладевает умами многих любителей и профессионалов, интересующихся происхождением своей семьи или своего народа. Впрочем, этот же интерес нередко приводит любителей и к настоящей науке в лице геногеографии или генетической генеалогии, реконструирующих, соответственно, историю народонаселения или историю отдельных семей. В докладе найдется место для таких историй, выявленных для народов мира (статьи в Nature), Кавказа, Европейской части России, а также для семей (родов) Чингизидов и Рюриковичей. *Исследование поддержано Российским научным фондом (грант № 14-14-00827) и программами Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" и "Динамика генофондов".*

ПОИСК НОВЫХ ГЕНОВ НАСЛЕДСТВЕННОГО РАКА ПРИ ПОМОЩИ ПОЛНОЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Е.Н. Имянитов НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург

В 1990-е и 2000-е гг. применение т.н. «кандидатного» подхода позволило идентифицировать несколько десятков генов наследственного рака. Суть «кандидатного» поиска заключается в том, что у онкологических пациентов, характеризующихся клиническими признаками семейного ракового синдрома (наследственный анамнез, молодой возраст, наличие множественных опухолей), выполняется секвенирование отдельных генов; выбор генов-кандидатов осуществляется на усмотрение исследователя, при этом в качестве решающего аргумента учитывается их функциональная причастность к процессу злокачественной трансформации. Именно «кандидатный» подход выявил участие генов p53, CHEK2, MUTYH, PALB2, NBS1, BLM и т.д. в формировании наследственной онкологической предрасположенности. С появлением технологии полноэкзомного секвенирования связаны огромные ожидания: предполагается, что анализ полной последовательности генома с лёгкостью позволит идентифицировать «оставшиеся» генетические детерминанты онкологического риска. Подобный подход может оказаться особенно эффективным в отношении популяций, отличающихся высоким уровнем генетической гомогенности и, следовательно, высокой частотой повторяющихся мутаций.

Мы предприняли полноэкзомное секвенирование в отношении 42 пациенток с раком молочной железы (РМЖ), характеризующихся выраженными клиническими признаками наследственного заболевания. В рамках данного исследования нами учитывались как доминантная, так и рецессивная модели наследования. Применялись различные подходы, направленные на фильтрацию и приоритизацию обнаруженных вариантов. Наиболее интересные аллели подвергались молекулярно-эпидемиологическому анализу в больших группах пациенток РМЖ и здоровых женщин. Несмотря на то, что нами использовались различные алгоритмы отбора потенциально-значимых аллелей, а количество мутаций, протестированных на обширных выборках, исчисляется многими десятками, нам пока не удалось выявить нового гена наследственного рака молочной железы. Примечательно, что применявшийся нами ранее, заведомо маломощный «кандидатный» подход оказался значительно более успешным в подобных поисках. Более того, сходные по сути результаты были получены другими исследовательскими группами, работающими по близкой тематике. В целом, можно заключить, что полноэкзомное секвенирование позволяет достаточно эффективно выявлять гены исключительно редких наследственных заболеваний, включая «экзотические» опухолевые синдромы, но, в современном формате, пока не приводит к быстрой идентификации новых детерминант относительно частых разновидностей наследственных опухолей. В докладе планируется обсудить причины подобного противоречия.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТОВ

Е.Н. Суспицын Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Россия

Первичные иммунодефициты (ПИД) составляют отдельную группу патологий иммунной системы. Они проявляются тяжело протекающими и/или необычно частыми инфекциями, при этом у подобных пациентов зачастую даже слабопатогенные микроорганизмы вызывают угрожающие для жизни состояния. Значительная часть ПИД обусловлена генетическими

причинами. Молекулярная диагностика ПИД осложняется исключительной генетической гетерогенностью данной разновидности заболеваний: сейчас известно более 300 локусов, мутации в которых вызывают моногенные формы ПИД. Успешному выбору отдельных генов для тестирования препятствует тот факт, что клинические и иммунологические показатели зачастую недостаточно специфичны в отношении конкретных нозологических форм.

Нами разработана мультигенная панель для ДНК-диагностики первичных иммунодефицитов, включающая 302 гена и предусматривающая использование высокопроизводительного секвенирования. С помощью данного подхода к настоящему моменту проанализировано 150 пациентов, проходивших лечение по поводу рекуррентных инфекций и имеющих клинические признаки ПИД. Генетические причины заболевания были успешно установлены в 10% (15/150) случаев, при этом ряд находок заслуживают отдельного внимания. Например, использование NGS-панели у ребенка с низкорослостью и гипогаммаглобулинемией привело к постановке диагноза «синдром Блума»; примечательно, что этот пациент многократно консультировался различными генетиками, однако подозрений на столь тяжелое и, в теории, хорошо известное заболевание никогда не возникало. Существенно, что выявленный пациент оказался гомозиготен по аллелю Q548X гена BLM; частота этого аллеля в российской популяции составляет 0.2-0.6%, следовательно, что у нас в стране проживает от нескольких десятков до нескольких сотен пациентов с синдромом Блума. Вероятно, отсутствие у врачей-генетиков осведомленности в отношении данного синдрома приводит к тому, что большинство детей с этим заболеванием остаются без правильного диагноза.

В целом, применение мультигенного секвенирования для диагностики ПИД представляется целесообразным мероприятием. Во-первых, оно позволяет выявлять причину заболевания у конкретных пациентов; во-вторых, подобный анализ зачастую приводит к идентификации повторяющихся мутаций, и, следовательно, предоставляет возможность использования упрощенных ДНК-тестов в отдельных клинических ситуациях. *Работа поддержана грантом РНФ 15-15-00079.*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ БИОМАРКЕРОВ СИСТЕМ ТОКСИН-АНТИТОКСИН II ТИПА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ШТАММОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ В МЕТАГЕНОМАХ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА

К.М. Климина, К.В. Емельянов, Н.В. Захаревич, Е.У. Полуэктова, А.С. Касьянов, В.Н. Даниленко

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

Микробиота кишечника трактуется в настоящее время как сателлитный орган, играющий ключевую роль в становлении и поддержании иммунитета и общего гомеостаза человека. Видовое и штаммовое разнообразие бактерий в микробиоте носит индивидуальный (возраст, образ жизни, состояние здоровья), этно-социальный (традиции питания) и региональный (популяции) характер. Важнейшей проблемой при изучении микробиоты человека является отсутствие эффективных генов-биомаркеров видовой и штаммовой идентификации бактериальных компонентов. Разработка таких маркеров и технологий для диагностики состава микробиоты человека является актуальным вопросом как научных, так и прикладных исследований общей и персонализированной медицины. Мы предлагаем использовать для видовой и штаммовой идентификации лактобацилл и бифидобактерий новый генетический маркер – гены систем токсин-антитоксин (ТАС) II типа. Подавляющее большинство генов ТАС видоспецифичны. ТАС – это генетические элементы, состоящие из 2-х, реже 3-х генов. Продукты генов токсинов (Т) всех известных ТАС – это белки, в то время как антитоксины (А) – это либо белки, либо некодирующие РНК. ТАС и их компоненты являются удобным инструментом для решения различных задач в области теоретических исследований и биотехнологии. Ранее мы обнаружили, что исследованным штаммам *L. rhamnosus* [Klimina K.M. et al.2013] и *Bifidobacterium* sp. [Averina et al.2013] свойственен различный набор ТАС RelBE и MazEF типа. Нами была проведена расширенная аннотация ТАС у бактерий рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* из GenBank, имеющих полногеномный сиквенс на стадии «complete» и сконструирована база генов Т и А. На основе проведенной аннотации по генам Т и А в геномах лактобацилл и бифидобактерий мы показали, что данные гены можно использовать для идентификации видов и штаммов бактерий рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. Наиболее отдаленные виды не имеют пересекающихся генов Т и А. Штаммы, относящиеся к одному виду бактерий, имеют сходный, но не всегда идентичный набор генов. Была разработана программа по анализу метагеномов по ТАС и проведена ее валидация. Предложенный нами метод видовой и штаммовой идентификации может быть использован как для характеристики отдельных штаммов, так и для характеристики сообщества микроорганизмов, например, в микробиоте человека.

Полногеномный анализ метилирования ДНК при раке предстательной железы с использованием технологии INFINIUM HUMAN METHYLATION 450 BEADCHIP

Э.В. Генерозов¹, К.А.Бабалян^{1,2}, Р.И. Султанов², Г.П. Арапиди², Н.Б. Захаржевская¹, Е.И. Шарова¹, С.А. Даниленко¹,

Е.А. Бабикова¹, А.К. Ларин¹ ¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва; ²Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Россия

Количественный статус метилирования ДНК в 24 парных архивных образцах аденокарциномы предстательной железы и морфологически не измененной ткани был проанализирован с использованием технологии ДНК чипов Infinium HumanMethylation450 BeadChips (Illumina, Inc). Анализ дифференциально метилированных регионов генома показал ассоциацию с патологическим статусом для 22109 гиперметилированных и 4822 гипометилированных CpG сайтов. Доминирование в раковом геноме гиперметилированных сайтов и их преимущественная локализация в регуляторных областях генов свидетельствуют об их вероятной роли в реализации механизмов генной супрессии в патогенезе рака предстательной железы (РПЖ). Максимальные показатели гиперметилирования в промоторной области (>50% CpG сайтов) в сочетании с высокими различиями в уровне метилирования между клиническими группами (>40%) были получены для 14 генов. Роль гиперметилирования в некоторых из них: AOX1, KLF8, ZNF154, TMEM106A в патогенезе РПЖ уже была показана ранее. Гиперметилирование в генах ACSS3, TAC1, TUBA4B, ZSCAN12 ранее не было показано для РПЖ, но охарактеризовано в ассоциации с другими онкологическими заболеваниями. В свою очередь, различия в уровнях метилирования в генах GPRASP1, NKX2-6, ARX, CYBA, EPSTI1, RHCG было задокументировано по результатам ряда полногеномных исследований онкологической направленности, но пока детально не изучено.

Непредвзятая селекция отдельных, наиболее достоверно дискриминирующих опухолевые образцы от группы не опухолевых, CpG сайтов была проведена для оценки диагностического потенциала эпигенетических маркеров РПЖ. В отобранную

диагностическую модель, основанную на логистической регрессии вошло 9 CpG сайтов. Валидация модели была осуществлена на независимом массиве данных по метилированию 40 парных и 293 непарных образцов РПЖ из проекта Атлас Ракового Генома (TCGA), проанализированных на такой же версии ДНК чипа. Полученные после валидации суммарные показатели диагностической информативности модели (специфичность 95%, чувствительность 97%, площадь под характеристической кривой диагностического теста (ROC) – 0,96) позволяют рассматривать эти CpG сайты в качестве потенциальных маркеров для молекулярной диагностики РПЖ.

АНАЛИЗ ГЕНОМНЫХ МУТАЦИЙ УНИКАЛЬНЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА

В. Степанова Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Существует всего 96 человек-специфичных аминокислотных замен в 87 белках, которые отличают современных людей от известных древних людей: неандертальцев и денисовцев [Prufer, 2013]. Одна из замен (A429V) происходит в белке аденилосукцинат лиазы (ADSL), который катализирует две реакции *de-novo* синтеза пуринов [Van Keuren, 1987]. ADSL также относят к онтологической категории «агрессивность/гиперактивность», обогащенной несинонимичными заменами, возникающими при расхождении современных и древних людей [Castellano, 2014].

В данной работе исследовалось влияние человек-специфичного полиморфизма в белке ADSL на метаболические процессы в различных тканях. Анализ метаболома был проведен для модельных групп молодых и зрелых мышей. Сравнивались группы мышей дикого типа и группы гуманизированных по ADSL-белку мышей. Биохимический анализ активности ферментов установил, что человек-специфичная форма менее активна по сравнению с формой дикого типа, самое большое снижение наблюдается в тканях мозга. Кроме того, концентрация метаболитов у гуманизированных мышей значительно отличается в тканях мозга: коре и мозжечке. 7 из 45 детектированных метаболитов относятся к синтезу пуринов и концентрация большинства из них падает в мозжечке и коре гуманизированных мышей. Таким образом, результаты, полученные в ходе биохимических опытов, подтверждаются на уровне анализа метаболитов.

1. Prufer *et al.* The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains (2013) *Nature*, 505
2. Van Keuren *et al.* A somatic cell hybrid with a single human chromosome 22 corrects the defect in the CHO mutant (Ade-I) lacking adenylosuccinase activity (1987) *Cytogenet. Cell Genet.*, 44
3. Castellano *et al.* Patterns of coding variation in the complete exomes of three Neandertals (2014) *PNAS*, 18

ГЕНОМИКА АУТИЗМА

Е. Храмева, В. Степанова, П. Шичкова, Ф. Хайтович Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Результаты недавних исследований указывают на то, что заболевания аутистического спектра могут представлять собой нарушения эволюционно новых, человек-специфичных процессов развития. Поэтому изучение нарушений развития при аутизме представляется особенно важным. В данной работе мы выполнили поиск молекулярных маркеров аутизма, которые необходимы для ранней диагностики заболевания, а также изучили возрастные изменения этих маркеров, связанные с эволюцией характеристик, уникальных для человека. В частности, мы определили генотипы 24 пациентов, страдающих аутизмом, с помощью полногеномного секвенирования с 30-кратным покрытием, а также измерили экспрессию генов в тех же образцах. Чтобы определить генотипы, ассоциированные с аутизмом, было выполнено полногеномное ассоциативное исследование (GWAS) с помощью пакета программ PLINK. Чтобы установить связь между генотипами и экспрессией генов в здоровых и больных аутизмом образцах, был выполнен анализ eQTL. Из-за небольшого количества образцов, анализ GWAS позволяет выявить сайты, связанные с аутизмом, с ограниченной достоверностью. Поэтому мы также применили методы машинного обучения, такие как логистическая регрессия или SVM, и идентифицировали наборы сайтов, отличающих здоровые образцы от больных. Поскольку аутизм, предположительно, связан с нарушением эволюционно новых, специфичных для человека процессов развития, мы проверили, несут ли сайты, ассоциированные с аутизмом, предковые (неандертальские) генотипы. В частности, мы проверили обогащение интрогрессированных регионов вокруг этих сайтов, а также вокруг сайтов, ассоциированных с аутизмом согласно публичным базам данных.

КИШЕЧНЫЙ МЕТАГЕНОМ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА

А.В. Тяхт ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия

Воспалительные заболевания кишечника, в том числе болезнь Крона и неспецифический язвенный колит, сопровождаются существенным нарушением баланса кишечной микрофлоры. Развитие молекулярно-генетических методов анализа микробных сообществ, в первую очередь – метагеномики – позволило детально оценить картину дисбактериоза при данных заболеваниях на уровне повышения или понижения относительной представленности микробиотных маркеров. В данном исследовании с помощью метагеномики в формате “shotgun” было проведено многоцентровое исследование микробиоты кишечника у пациентов с воспалительными заболеваниями. Многофакторный анализ данных позволил выявить ассоциации отдельных бактериальных видов с клиническими факторами. *Данная работа была финансово поддержана Министерством образования и науки РФ (номер соглашения RFMEFI57514X0075).*

ПОЛНОЭКЗОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ В ИЗУЧЕНИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ РИСКА БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

М.В. Шульская¹, М.И. Шадрин¹, Е.Ю. Федотова², Н.Ю. Абрамичева², С.А. Лимборская¹, С.Н. Иллариошкин², П.А. Сломинский¹

¹Институт молекулярной генетики РАН; ²Научный центр неврологии, Москва, Россия

Болезнь Паркинсона (БП) – многофакторное нейродегенеративное заболевание с выраженным генетическим компонентом, для которого характерно существование как семейных, так и спорадических форм. Анализ семейных форм БП выявил целый ряд генов, мутации в которых приводят к развитию заболевания. При этом только для 7 генов (SNCA, PARK2, LRRK2, PINK1, DJ1, ATRP13A2, VPS35) был определен характер наследования, выявлены и подтверждены мутации, приводящие к развитию моногенных форм БП. Однако известные гены и описанные в них мутации не могут объяснить все наблюдаемые случаи БП. В связи с этим целью работы является идентификация новых генетических факторов, вовлеченных в патогенез БП с использованием технологии полноэкзомного NGS секвенирования. На платформе Illumina HiSeq 2500 было

проведено полноэкзомное NGS секвенирование ДНК 48 отобранных пациентов с предполагаемой аутосомно-доминантной формой БП. Оценку полученных данных проводили с использованием баз данных dbSNP версии 137, проекта «1000 геномов» и проекта по секвенированию экзона (ESP), а также пакетов программ SIFT, Polyphen-2, FATHMM, MutationAssessor и MutationTaster. В ходе обработки данных выявлялось большое количество ложноположительных гетерозигот. Для их отсева был разработан специальный алгоритм, учитывающий глубину прочтения и соотношение частот аллелей. В настоящее время отобрано более 200 полиморфных вариантов в различных генах, проводится оценка их возможной патогенетической значимости и вовлеченности в патогенез БП. Работа была выполнена при поддержке РФФИ грант № 15-04-05606.

ПОИСК ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ БАКТЕРИЙ ВИДА *ESCHERICHIA COLI*, АССОЦИИРОВАННЫХ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА

А.И. Манолов¹, Д.В. Ракитина¹, А.В. Каныгина⁷, С.К. Гарушнянц², Ю.П. Байкова¹, Д.Г. Алексеев⁷, В.Г. Ладыгина¹, Е.С. Кострюкова¹, А.К. Ларин¹, Т.А. Семашко¹, И.Ю. Карпова¹, В.В. Бабенко¹, Р.К. Исмагилова⁶, С.Ю. Маланин⁶, М.С. Гельфанд², Е.Н. Ильина¹, Р.Б. Городничев¹, Е.С. Лисицина¹, П.Л. Щербаков³, И.Л. Халиф⁴, М.В. Шапина⁴, И.В. Маев⁵, Д.Н. Андреев⁵, В.М. Говорун^{1,7}

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА; ²Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН; ³ЦНИИ гастроэнтерологии; ⁴ГНЦ колопроктологии; ⁵Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва; ⁶Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань; ⁷Московский физико-технический институт (государственный университет), Москва, Россия

Этиология болезни Крона (БК) окончательно не установлена. Повышенное содержание бактерий вида *Escherichia coli* у пациентов с БК позволяет предположить их участие в развитии данного заболевания. Для изучения этого предположения мы провели сравнительный генетический анализ бактерий вида *E. Coli*, изолированных из биопсийного материала и образцов кала 10 пациентов с БК (в среднем 3 образца на пациента). Для всех кроме одного пациента мы наблюдали высокое сходство геномов изолированных *E. coli* (менее 200 SNP на геном), что позволяет предположить наличие в микрофлоре преимущественно одного количественно доминирующего штамма.

Для проведения сравнения с другими известными штаммами мы использовали публично доступные геномы *E. Coli*, изолированные из пациентов с БК, непатогенных штаммов и геномы патогенных штаммов изолированных из людей с заболеваниями, не связанными с воспалением кишечника. Филогенетический анализ не выявил кластеризации геномов штаммов, ассоциированных с БК. На основе построенных групп гомологий было проведено сравнение представленности генов в различных группах штаммов. Было выявлено наличие 167 генов, перепредставленных в группе штаммов, ассоциированных с БК, относительно непатогенных штаммов (тест Фишера, p -value < 0.05). 104 из этих генов не являются перепредставленными при сравнении патогенных штаммов с непатогенными. Среди перепредставленных генов: система утилизации пропандиола (продукт распада фукозы, составной части гликопротеинов слизи оболочки кишечника), транскрипционные факторы, гены, связанные с горизонтальным переносом генетического материала.

АССОЦИАТИВНЫХ АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ОБЩЕГО МЕТАБОЛИЗМА И ЦИРКАДНОЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ВИДАМИ ДЕПРЕССИИ

Е.А. Бондаренко¹, М.И. Шадрин¹, М.Н. Гришкина², А.Б. Гехт², П.А. Сломинский¹

¹Институт молекулярной генетики РАН; ²Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева, Москва, Россия

По данным ВОЗ за 2012 год, депрессия становится одним из наиболее распространенных психических расстройств. По данным близнецовых и семейных исследований генетические факторы играют важную роль в развитии депрессии. Однако до сих пор нет ясных представлений о механизмах, лежащих в основе патогенеза данного заболевания. Многочисленные генетические исследования выявили ряд локусов, ассоциированных с развитием депрессии. В данном исследовании проведен анализ полиморфных вариантов генов, показавших достоверные ассоциации в мета-анализе с развитием большого депрессивного расстройства: APOE (rs429358 и rs7412), GNB3 (rs5443), MTHFR (rs1801133), а также гена нейротрофического фактора мозга BDNF (rs6264), и генов циркадной системы PER2 (rs934945, rs2304672) и PER3 (rs10462021, rs2640909). Исследование проводится в 3 выборках больных с депрессией славянского происхождения: пациенты с невротической и эндогенной депрессией, пациенты с рекуррентной депрессией, пациенты с суицидальной попыткой в анамнезе. Выборки были сформированы в Научно-практическом психоневрологическом центре имени З.П. Соловьева Департамента здравоохранения города Москвы. В качестве контрольной выборки используется выборка славянского населения из г. Москвы и областей Центральной России, соответствующая по половозрастной структуре выборкам пациентов. Получены данные о распределении частот аллелей и генотипов у больных с различными клиническими вариантами депрессии и контрольной группе. Полученные данные сопоставлены с данными крупного мета-анализа (López-León S et al., 2008). Данное исследование проведено при поддержке Российского научного фонда (грант 16-15-10199).

ПСЕВДОЛИЗОГЕНИЯ И ЕЕ РОЛЬ В МЕХАНИЗМАХ ПАТОГЕННОСТИ КОАГУЛАЗО-ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ СТАФИЛОКОККОВ

М.А. Корниенко¹, А.И. Манолов¹, А.В. Каныгина¹, Е.С. Кострюкова¹, Е.Л. Жиленков², Л.А. Любасовская, Т.В. Припутневич³, Е.Н. Ильина¹

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА; ²НПК «Микромир»; ³НИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии, Москва, Россия

Коагулазоотрицательные стафилококки (КОС) – основной компонент нормальной флоры человека, в частности *Staphylococcus epidermidis* (SE) вызывает инфекционные процессы у пациентов с ослабленным иммунитетом, в том числе у новорожденных. Для исследования механизмов патогенности КОС были отобраны три госпитальных изолята SE. SE36-1 был выделен из крови умершего новорожденного с диагнозом сепсис, SE41 и SE528 получены из зева новорожденных. С помощью технологии IonTorrent (Life Technologies) определены полногеномные последовательности этих изолятов, аннотация выполнена сервисом "Prokaryotic Genome Annotation Pipeline" (APHT00000000, APNU00000000, APHS00000000). Геномы изолятов обладали высокой степенью гомологии и характеризовались одним набором факторов патогенности. В составе геномов обнаружена последовательность профага SPβ референсного изолята SE RP62. В геномах изолятов SE41 и SE528 данная последовательность

довательность представлена как профаг, а в геноме изолята SE36-1 – как внехромосомный элемент. При индукции митомицином C из бактериальной культуры SE36-1 получены фаговые частицы двух фагов (фага StB20 и SP β like). Таким образом, в случае изолята SE36-1 обнаружено явление псевдолизогении для фага SP β like. Псевдолизогения – «промежуточная» стадия между лизогенной и литической стадиями развития бактериофага в клетке-хозяина, которая характеризуется тем, что количество копий генома фага в клетке-хозяина не увеличивается (как при литическом пути развития фаговой инфекции), и репликация фагового генома не синхронизирована с клеточным циклом (как при лизогении), при этом деградации генома бактериофага не происходит. Такая ситуация возможна в случае, когда геном фага не интегрирован в бактериальную хромосому, а сохраняется в цитоплазме бактерии в виде эписомы. Наличие SP β как препрофага в клетках SE36-1 может обуславливать дополнительный патогенный потенциал этого изолята.

ГЦ-ОБОГАЩЕННЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ТРАНСКРИБИРУЕМОЙ ОБЛАСТИ РИБОСОМНОГО ПОВТОРА В СОСТАВЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК ИГРАЮТ РОЛЬ МЕДИАТОРОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В МСК И HUVEC

Е.М. Малиновская, Н.Н. Вейко, Е.С. Ершова, В.А. Сергеева, Л.В. Каменева, М.С. Конькова, В.Л. Ижевская, С.В. Костюк
Медико-генетический научный центр, Москва, Россия

Внеклеточная ДНК (вкДНК) – фрагменты ДНК, циркулирующие в межклеточной среде организма или в среде культивирования клеток и образующиеся, в основном, в результате гибели клеток. Мы показали, что при хронической патологии (при ишемической болезни сердца (ИБС), ревматоидном артрите, артериальной гипертензии), при беременности и при опасных для генома внешних повреждающих воздействиях на организм человека (радиация, действие химических препаратов) в составе вкДНК накапливается ГЦ-обогащенная транскрибируемая область рибосомного повтора человека (ТОрДНК). Данная последовательность устойчива к образованию двуниевых разрывов, поскольку содержит 60–85% ГЦ-пар, обеспечивающих высокую температуру плавления. Компьютерный анализ нуклеотидного состава выявил в составе рДНК наличие неметилированных CpG-последовательностей – участков связывания с рецептором семейства TLR – TLR9. Мы показали, что ТОрДНК в составе модельных фрагментов и вкДНК больных ревматоидным артритом и ИБС активирует в мезенхимных стволовых клетках (МСК) и клетках эндотелия (HUVEC) сигнальные пути, направленные на выживание клеток, что сопровождается повышенной транскрипционной активностью генома клеток. При добавлении к среде культивирования МСК и HUVEC фрагментов ТОрДНК в концентрации 50–100 нг/мл активируется экспрессия генов TLR9- и NF- κ B-сигнальных путей – возрастает уровень экспрессии генов TLR9, MyD88, NFKB1, TIRAP, HSPD1, MAP2K3, TICAM, SARM1, TOLLIP, HRAS, HSPA1, MAPK8, EIF2AK2, PPARA, TRAF6, UBE2, FADD, IRAK1, MAP3K7, IRAK2, IRAK1, PELI1, RIPK2, MAP3K1, MAP4K4, MAP4K3, REL, IKKBK, RELA (p65), NFRKB, NFKB2 в 2–7 раз. Активация NF- κ B фрагментами ТОрДНК сопровождается его транслокацией в ядро клеток с последующей активацией экспрессии генов-мишеней: про- и противовоспалительных цитокинов: TNF α , IL1B, IL8, IL6 и IL-10, молекул адгезии (ICAM1, SELE и VCAM1). В МСК и HUVEC при действии ТОрДНК снижается уровень апоптоза: возрастает уровень экспрессии генов BCL2, BCL2A1(Bfl-1/A1), BCL2L1 (BCL-X), BIRC2(c-IAP1) и BIRC3 (c-IAP2) 2-6 раз, снижается уровень экспрессии гена BAX. Таким образом, ГЦ-обогащенные последовательности ТОрДНК в составе вкДНК могут играть роль медиаторов, регулирующих уровень экспрессии генов в МСК и HUVEC. Работа поддержана грантом РФФИ №16-04-01099А.

PRINCIPLES OF SPATIAL GENOME ORGANIZATION: FROM CHICKEN ERYTHROCYTES TO MOUSE SPERM CELLS

Veniamin Fishman^{1,2}, Nariman Battulin^{1,2}, Antonina Maslova³, Alla Krasikova³, Oleg Serov^{1,2}

¹Institute of Cytology and Genetics SB RAS, ²Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia, ³Saint-Petersburg State University, St-Petersburg, Russia

The spatial organization of eukaryotic genomes in the cell nucleus is linked to their transcriptional regulation. The topological domains (TADs) are basic units of spatial genome organization. Interestingly, TADs are stable across different cell types, and robustly conserved in syntenic regions of mammalian chromosomes.

To understand degree of TADs similarity in mammalian cells, we compared nuclear architecture of mouse sperm cells and fibroblasts using Hi-C technology. Our findings suggest that genomic spatial contacts are largely consistent across the sperm cells and fibroblasts with >90% of interactions being seen in both cell types. However, spermatozoa have more long-range contacts than fibroblasts, which makes sense considering their nuclei are more compact. Approximately 30% of the differences in interaction probabilities between the two cell types can be explained by differences in the density of their genome packaging.

To study evolutionary aspect of TADs conservation, we created a spatial map of first avian genome, *Gallus gallus*. We examined spatial contacts of DNA in chicken embryonic fibroblasts and adult red blood cells. Genome-wide contact maps show a typical plaid-pattern described earlier in mammals and insects. We identified TADs and other compartments both in fibroblasts and in red blood cells genomes. Again, we showed a similar localization of domain borders in these cell types. Distribution of TAD borders reflects chromatin organization and genes expression. We also found several specific features of chicken genome that were not observed in mammals, such as increased number of interchromosomal contacts of microchromosomes comparing to interchromosomal contacts of macrochromosomes.

GENOME-WIDE DNA METHYLATION PROFILING REVEALS EPIGENETIC ADAPTATION OF STICKLEBACK TO SEA AND FRESHWATER CONDITIONS

E. Prokhortchouk, A. Artemov, Yu. Medvedeva, A. Mazur, K. Skryabin

Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» RAS, Moscow, Russia

Three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) represents a convenient model to study microevolution - adaptation to freshwater environment. While genetic adaptations to freshwater are well-studied, epigenetic adaptations attracted little attention. In this work, we investigated the role of DNA methylation in the adaptation of marine stickleback population to freshwater conditions. DNA methylation profiling was performed in marine and freshwater populations of sticklebacks, as well as in marine sticklebacks placed into freshwater environment and freshwater sticklebacks placed into seawater. For the first time, we demonstrated that genes encoding

ion channels *kcnd3*, *cacna1fb*, *gja3* are differentially methylated between marine and freshwater populations. We also showed that after placing marine stickleback into fresh water, its DNA methylation profile partially converges to the one of a freshwater stickleback. This suggests that immediate epigenetic response to freshwater conditions can be maintained in freshwater population. Interestingly, we observed increased epigenetic variance among freshwater sticklebacks that may serve as a compensatory regulatory mechanism for the lack of genetic variation in the freshwater population. Some of the regions that were reported previously to be under selection in freshwater populations also show differential methylation. Thus, epigenetic changes might represent a parallel mechanism of adaptation along with genetic selection in freshwater environment.

ПОЛИМОРФИЗМЫ И СОМАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ В РЕГУЛЯТОРНЫХ СЕКМЕНТАХ ДНК И ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ

И.В. Кулаковский^{1,2}, И.Е. Воронцов¹, А.С. Ландо³, В.Ю.Макеев^{1,2,3}

¹Институт общей генетики РАН им. Н.И. Вавилова, РАН, ²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва,

³Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

Современные высокопроизводительные методы позволяют идентифицировать однонуклеотидные полиморфизмы и соматические мутации в масштабе полных геномов. Недавние исследования показали, что от 60 до 90% нуклеотидных замен, ассоциированных с заболеваниями, встречаются в некодирующей ДНК, преимущественно в регуляторных районах. Одним из предполагаемых механизмов возникновения таких ассоциаций является модификация участков ДНК, специфически связывающиеся факторы транскрипции, что в свою очередь может привести к изменениям в экспрессии регулируемых генов. Эти изменения экспрессии сильно зависят от конкретной ткани, поскольку мутация или аллельный вариант в конкретной ткани может оказать в открытом или закрытом хроматина, а также в присутствии или в отсутствие тканеспецифически связанных кофакторов. Важный вопрос заключается в том, насколько в настоящее время возможна идентификация ткани, которых конкретный вариант генома или соматическая мутация повлияет на экспрессию генов и клеточный фенотип. Мы показываем, что существующие методы в значительной степени могут обеспечить достаточно надежное предсказание таких событий, при условии доступности данных по статусу хроматина и картины тканеспецифической экспрессии генов. Кроме того, во многих случаях такие данные могут быть перенесены из соответствующих тканей с использованием методов машинного обучения.

ANDSYSTEM: A TOOL FOR LITERATURE MINING AND KNOWLEDGE INTEGRATION ON THE OMICS SCALE

V.A. Ivanisenko, O.V. Saik, N.V. Ivanisenko, T.V. Ivanisenko, P.S. Demenkov, N.A. Kolchanov

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia PBSoft LLC, Novosibirsk, Russia

The number of publications in the areas of biology, medicine, and biotechnology increases dramatically, which makes imperative computer-based analysis. To date, over 25 million abstracts highly relevant to biology and medicine are stored in the PubMed database and this number keeps growing. To address the confounding problem of extraction of information on molecular-genetic objects from texts, approaches based on algorithms such as search for co-occurrence of the biological object names in texts, linguistic-semantic analysis of texts, and machine learning have been suggested. Previously we have developed the ANDSystem package that incorporates utilities for automated extraction of knowledge from Pubmed published scientific texts and databases (Ivanisenko et al, 2015). The goal of this work was a development of a new version of ANDSystem supplied with extended utilities for automated extraction of knowledge and associative gene networks reconstruction related to the studied phenotypic trait or biological process.

ANDSystem was developed for the purpose of scanning literature for extracting relationships between diseases, pathways, proteins, genes, microRNAs and metabolites and integration of extracted knowledge on the omics scale. The ANDSystem tool consists of ANDCell database, ANDVisio tool and utilities for automated extraction of knowledge from Pubmed published scientific texts and analysis of factographic databases. The ANDCell database contains information on more than 15 million of molecular-genetic events retrieved from texts and external databases. ANDVisio is a user's interface to the ANDCell, it provides graphic visualization, editing and search features. Associative networks describe semantic relationships between molecular-genetic objects (proteins, genes, metabolites, drugs, microRNAs and others), biological processes, side effects of drugs, phenotypic traits and diseases. ANDVisio is provided with various tools supporting automated reconstruction of associative networks with taking into account the specific relation of objects in the network to the studied phenotypic trait or biological process limiting uncontrolled network expansion. The ANDSystem can assist in the interpretation of complex multifactorial experimental omics data.

1. Ivanisenko V.A. et al, (2015) ANDSystem: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology. BMC Syst Biol. 9 Suppl 2:S2.

GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDIES OF OMICS DATA

Y.A. Tsepilov *Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

During the last decade, genome-wide association studies (GWAS) have transformed our understanding of genetic control of complex human traits. While in the beginning of 2000s only a handful of polymorphisms were known to be robustly associated with complex human traits, nowadays we know thousands of such loci. To mention just a few examples, the number of loci identified for type 2 diabetes is now more than 60, for breast cancer – almost 80, and for height – close to 700. The progress in GWAS continues and increasing availability of large cohorts allows for identification of alleles with progressively smaller effects.

However, the large amount of results obtained in GWAS did not yet fully translate into new biological knowledge, in large part because the output of GWAS (a 'locus') does not allow directly and unequivocally implicate the biological function and mechanism through which genetic variation leads to phenotypic variation. Developments in high-throughput omics technologies together with initiatives, which establish collections of functional genomics resources, open an opportunity to generate targeted hypotheses concerning biological mechanisms underlying genetic associations detected by GWAS. These hypotheses could further be addressed by functional studies, ultimately leading to better understanding of processes underlying biological control of human complex traits. In this talk, methodological issues and latest trends of omics data analysis in the context of genetics of complex traits will be discussed.

MOBILE GENETIC ELEMENTS AND COMPARATIVE GENOMICS OF EUKARYOTES

Irina R. Arkhipova^{1,2}, Brandon M. Lê^{1,2}, Fernando Rodriguez¹, Irina A. Yushenova¹ *¹Josephine Bay Paul Center for Comparative Molecular Biology and Evolution, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, USA; ²Brown University, Providence, RI 02912, USA*

Mobile genetic elements (MGEs) are present in most genomes and have a profound impact on their structure, function and evolution. In humans, MGEs comprise about one-half of the genome assembly, while in other eukaryotes it can vary significantly from only a few per cent to nearly 90% of the genome. While MGEs in mammalian genomes have been extensively characterized and their annotation has been streamlined, analysis of MGEs in non-mammalian taxa indicates that de novo repeat identification and annotation methods are strongly preferred over the use of pre-existing libraries. Furthermore, a combination of available methods typically yields superior results. The ultimate goal is to develop a unified fully automated approach which would minimize false positives as well as false negatives, and reduce the need for manual curation. We have applied a combination of the available computational tools towards analysis and annotation of MGEs in a series of invertebrate genomes, and performed comparative analysis of MGE divergence landscapes in subsets of species from selected taxonomic groups. These landscapes can be influenced by the contribution of different factors, some of which may be technical, but most of which can reveal the underlying biological explanations.

BETWEEN CAUCASUS AND URAL: GENOMIC HISTORY OF EUROPE'S GATEWAY

Tatiana V. Tatarinova *University of Southern California, Computational Biology Lab, Children's Hospital Los Angeles, USA*

Lowlands between mountain ridges separating Europe from Asia have seen an eventful history. This region was a point of entry into Europe during numerous migrations of Turkic and Uralic people from Asian steppes into Europe. Unfortunately, written records of history of this region are sparse and usually mediated by Chinese, Arabic or European historians. In order to enlighten population history of this region, we have genotyped and analyzed 26 populations with geographical coverage spanning from Eastern Europe to the Northeast Siberia. We performed detailed analysis of population structure, admixture and distribution of shared genomic segments and affinity of studied populations to the ancient samples. In addition, we examined signals of positive selection and tested them for term enrichment in gene ontology. We observed extensive sharing of long genomic segments between Uralic speakers and patterns compatible with language and cultural replacement in Bashkirs and Chuvashes as well as amalgamation of diverse ethnic groups in Tatars and Russian Starovers. In contrast, populations in Caucasus share most of their recent genomic ancestry between themselves and genetic links to populations north of Caucasus are tenuous. Signals of positive selection reflected populations structure. Have yielded highly significant p-values for enrichment in anion:cation symporter activity pathway in Osetin and Chechen (corrected $p=3.5 \times 10^{-5}$ and 5.9×10^{-4} respectively) and retinoid metabolic process in Ket (corrected $p=1.9 \times 10^{-4}$).

ЭВОЛЮЦИЯ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Павел Мазин¹, Генрих Кесманн²

¹Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия; ²Университет Гейдельберга, Германия

У эукариот процесс созревания мРНК включает в себя сплайсинг: вырезание интронов (частей пре-мРНК не участвующих в кодировании белка) и соединение остающихся частей — экзонов. В случае когда сплайсинг одной и той же пре-мРНК может идти несколькими различными путями говорят об альтернативном сплайсинге (АС). АС позволяет одному гену кодировать несколько мРНК и, следовательно, несколько белков. Удержание интронов — разновидность АС при котором интрон не вырезается, часто приводит к деградации мРНК например за счёт появления преждевременного стоп-кодона (ПСК) и запуска ПСК-зависимой деградации. АС распространён у многоклеточных животных, по современным данным до 95% многоэкзонных генов человека сплайсируются альтернативно. Известно что АС регулируется ткане-специфично, при этом наиболее своеобразный сплайсинг наблюдается в мозгу и семенниках. Исследования последних лет показали, что АС играет важную роль в нормальном развитии организма, и, особенно, мозга, а нарушения АС связаны со многими заболеваниями такие как рак, болезнь Альцгеймера, аутизм, миотоническая дистрофия. Ранее мы показали, что АС сильно меняется в ходе постнатального развития человека, и эти изменения консервативны у приматов. В данной работе мы распространили наш анализ на пренатальное развитие, большее число органов (префронтальная кора головного мозга, мозжечок, семенники, почки, яичники, печень и сердце) и видов (человек, макака, кролик, мышь, крыса, опоссум и курица). Несмотря на то, что межвидовые отличия в АС доминируют над межтканевыми, возрастная и ткане-специфичная регуляция АС удивительно консервативна во всех изучаемых видах. Наши результаты показывают, что на ранних стадиях развития все изучаемые ткани имеют сходные профили АС, но в ходе пренатального развития появляются ткане-специфичные паттерны. В большинстве случаев экзон либо используется только в одном органе, либо наоборот, используется во всех, кроме одного. Больше всего ткане-специфичного АС наблюдается в семенниках половозрелых особей и мозге, немного меньше в сердце, а печень и, особенно почки с яичниками и семенниками неполовозрелых особей имеют крайне схожие профили АС.

ИНТЕГРАЦИЯ СИСТЕМ ГЕНОМНОЙ РЕГУЛЯЦИИ

А.В. Лиознова¹, А.М. Камиз², И.В. Кулаковский^{3,4}, И.Е. Воронцов³, В.Ю. Макеев³, В.Б. Байич², Ю.А. Медведева^{1,3}

¹Институт биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия; ²Университет науки и технологий короля Абдуллы, Джидда, Саудовская Аравия; ³Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН; ⁴Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Регуляция транскрипции генов осуществляется как эпигенетически, так и с помощью факторов инициации транскрипции (ТФ). Взаимодействие этих систем не вызывает сомнений, однако для успешной интеграции различных механизмов регуляции транскрипции в масштабах полного генома необходимо решать следующие задачи: 1) учет ошибок экспериментальных методов; 2) уточнение локализации регуляторного элемента и выделение действующих элементов из всех потенциальных; 3) выявление направления причинных связей и др. Методы, основанные на секвенировании, позволяют достаточно точно выявлять участки связывания ТФ (ChIP-Seq и др.), однако зачастую в результате получаются участки, которые значительно шире районов потенциального связывания отдельного ТФ, что, возможно отражает склонность ТФ образовывать кластеры для более тонкой регуляции транскрипции. Модели сайтов связывания ТФ являются полезным дополнением к экспериментальным полно-геномным методам, позволяя более точно локализовать сайт связывания ТФ. Нами была создана коллекция

моделей сайтов связывания HOCOMOCO (<http://hocomoco.autosome.ru>), включающая в себя модели для 601 ТФ человека и 396 ТФ мыши. Модели сайтов были получены при помощи интеграции данных ChIP-Seq и HT-SELEX данных, что позволило компенсировать систематически ошибки обоих методов.

Метилирование цитозина (CpG) в промоторах генов часто скоррелировано с подавлением транскрипции. До сих пор не понятно до конца, является ли это причиной или следствием подавления инициации транскрипции. Одними из механизмов подавления транскрипции с помощью метилирования может являться изменение аффинности ТФ к ДНК в зависимости от статуса метилирования CpG. Хотя мы обнаружили значительную фракцию CpG, которые демонстрируют значимую корреляцию с экспрессией близлежащего гена (CpG светочеры), такие позиции сравнительно редко встречаются внутри сайтов связывания ТФ, указывая на то, что метилирование CpG не является основным способом регулировать связывание ТФ. При этом CpG светочеры часто встречаются в энхансерах и областях активного хроматина (H3K4me), что подтверждает их регуляторную роль. *Результаты получены при частичной поддержке грантами РФФИ 14-04-00180 и РФФИ 15-14-30002.*

САХАРНОЕ ЛЕГО: СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНОМИКА + МАССОВЫЕ ДАННЫЕ => НОВЫЕ ГЕНЫ И ИХ РЕГУЛЯЦИЯ

М.Н. Тутукина¹, А.Д. Казнадзей², И.А. Суворова², Е. Белоусова³, Д. Быкова³, В. Емельяненко³, А. Еремина⁴, А. Коростелева³, А. Потапенко⁵, М. Селифанова⁵, М.С. Гельфанд^{2,6,7,8}

¹ИБК РАН; ²ИППИ РАН; ³ШМТБ-2015; ⁴ШМТБ-2014; ⁵ШМТБ-2016; ⁶СколТех; ⁷ФКН НИУ ВШЭ; ⁸ФББ МГУ

Сравнительно-геномный анализ позволяет предсказывать функции генов; данные ChIP-Seq и биоинформатические методы дают возможность идентифицировать сайты связывания факторов транскрипции; данные RNA-Seq позволяют определить условия, в которых экспрессируются исследованные гены. Таким образом, интеграция сравнительно-геномных подходов и результатов массовых экспериментов существенно продвигает конкретное биологическое знание о работе бактериальных генов; сделанные выводы валидируются затем в конкретных точечных экспериментах. В докладе будут рассказаны три истории: про регулятор транскрипции YjjM, про новый (emerging) глобальный регулятор EhuR, и про новую систему метаболизма лактозы. Существенная часть работы была сделана на летних Школах по молекулярной и теоретической биологии.

ПОИСК КОРРЕЛЯЦИЙ ЭПИГЕНОМНЫХ РАЗМЕТОК

А.А. Миронов^{1,2}, Е.Д. Ставровская^{1,2}, А.В. Фаворов^{3,4,5} ¹Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова;

²Институт проблем передачи информации РАН, Москва, Россия; ³Department of Oncology, Division of Biostatistics and Bioinformatics, Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center, The Johns Hopkins University, Baltimore, USA; ⁴Лаборатория системной биологии и компьютерной генетики, Институт общей генетики РАН; ⁵Лаборатория биоинформатики, ГосНИИГенетика, Москва, Россия

Высокопроизводительные экспериментальные методы производят большое количество данных, которые так или иначе привязаны к позициям в геноме. Наиболее общим этапом анализа этих данных является их сравнение с геномной аннотацией и сравнение их между собой. Большой интерес в вычислительной геномике представляет полногеномный поиск пространственных корреляций этих данных. В частности, поиск корреляций позиций связывания транскрипционных факторов и модификаций хроматина как с геномной аннотацией, так и с другими данными, привязанными к позициям в геноме. Ключевой гипотезой здесь является предположение о том, что позиционно скоррелированные свойства могут быть функционально связанными. Здесь мы будем называть треком – массив, привязанный к позициям в геноме. В частности, такими треками могут быть данные секвенирования РНК, данные, полученные с помощью иммунопреципитации хроматина, разметка генома не гены или экзоны.

Нами разработан эффективный метод поиска корреляций разметок генома, основанный на Фурье преобразовании. Этот метод был применен к широкомастному анализу данных из Human Epigenome Atlas и FANTOM CAGE. В частности, мы обнаружили изменение корреляций в процессе созревания тканей. Нами также были обнаружены неожиданные корреляции CAGE кластеров (связанных с сайтами эспирования РНК) и донорными сайтами сплайсинга и сайтами полиаденилирования.

ПОСТРОЕНИЕ СЕТИ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ РЕГУЛЯЦИИ МОЛЛИКУТ

И.А. Гаранина, Г.Ю. Фисунов, Д.В. Евсютина, Т.А. Семашко, В.М. Говорун

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия

Молликуты это специализированные грам-положительные бактерии, у которых отсутствует клеточная стенка, а их геном значительно редуцирован. Большинство молликут являются паразитами и только небольшая часть из них сапрофиты. Молликуты способны паразитировать в множестве различных организмов: растениях, членистоногих и позвоночных, в том числе и человеке. Попытки расшифровать транскрипционную регуляцию у молликут ранее не привели к значительным успехам. Таким образом, нашей целью было разобраться в транскрипционной регуляции молликут на примере их трех представителей – *Acholeplasma laidlawii*, *Spiroplasma melliferum* и *Mycoplasma gallisepticum*. С помощью методов сравнительной геномики мы исследовали геномный репертуар транскрипционных факторов молликут, сравнив между собой 50 полностью секвенированных геномов разных видов. Большинство молликут имеют только 4 общих консервативных транскрипционных фактора в геноме: HncA - репрессор шаперонов и MgaZ - регулятор клеточного цикла и два плохо изученных фактора WhiA и YebC. Затем мы провели полногеномное картирование сайтов начала транскрипции *A. laidlawii* и *S. melliferum*, для сравнительного анализа использовались опубликованные ранее данные по регуляции транскрипции у *M. gallisepticum*. Для идентификации стартов транскрипции были получены и проанализированы данные РНК-секвенирования 5'-обогащенных библиотек. Исходя из координат стартов транскрипции были идентифицированы промоторы генов и определена оперонная структура изучаемых геномов. Была выявлена эволюция в сторону упрощения архитектуры промоторов, которая коррелирует со сложностью транскрипционной регуляции. Были предсказаны последовательности транскрипционных факторов и их возможные мишени у *A. laidlawii* и *S. melliferum*. Изученные нами транскрипционные факторы контролируют, главным образом, транскрипцию мембранных белков (8 факторов) и метаболических ферментов (13 факторов). Среди этих метаболических ферментов большую часть составляют белки, вовлеченные в метаболизм мембран, клеточной стенки и углеводов. Аналогичный анализ был проделан для *S. melliferum*. При увеличении размера генома возрастает доля транскрипционных факторов в геноме – эта тенденция подтвердилась и для молликут. Таким образом, удалось впервые описать транскрипционную сеть регуляции молликут.

МЕТАБОЛОМНОЕ И ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ВЕЗИКУЛ *BACTEROIDES FRAGILIS*

А.А. Ванюшкина, Н.Б. Захаржевская, И.И. Бутенко, И.А. Алтухов

ФНЦЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия

Бактероиды являются представителями нормальной микрофлоры кишечника человека, однако некоторые виды бактериоидов могут быть патогенны. Так, штамм *Bacteroides fragilis* BOB25 способен вызывать анаэробные инфекции и кровавую диарею у человека. Однако механизм влияния токсигенного штамма *Bacteroides fragilis* на клетки эпителия кишечника исследован не полностью. Интересной особенностью *Bacteroides fragilis* является интенсивное выделение везикул, являющихся единственным описанным механизмом экспорта веществ из клеток. Везикулы могут с легкостью поглощаться эпителием толстой кишки. Мы предположили, что везикулы могут служить механизмом доставки к клеткам эпителия множества биохимических соединений, влияющих на физиологию человека. Для выяснения состава везикул токсигенного и нетоксигенного штаммов *Bacteroides fragilis* их выделяли методом ультрацентрифугирования. Анализ протеомного состава везикул был произведен методом IDA с использованием масс-спектрометра TripleTOF 5600 (ABSciex), совмещенного с ВЭЖХ системой. Анализ метаболомного состава везикул был проведен методом гидрофильной хроматографии с использованием тройной квадрупольной хромато-масс-спектрометрической системы QQQ 8030 (Shimadzu) в режиме анализа MRM. В ходе анализа протеома везикул было выявлено более 200 различных белков, входящих в состав преимущественно внешней мембраны бактерии, периплазмы, а также ряд цитозольных белков. Важно, что среди выявленных белков встречались протеазы, гидролазы, а также ряд оксидоредуктаз и пататин. В ходе количественного анализа метаболома везикул *Bacteroides fragilis* были выявлены различия в содержании метаболитов токсигенного и нетоксигенного штаммов. Анализ протеома и метаболома везикул открывает новые возможности оценки межклеточных взаимодействий и способствует более глубокому пониманию различных функциональных состояний организма человека при контакте с производными бактериальных клеток. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (14-24-00159).*

ПОЛИМОРФИЗМЫ И СОМАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ В РЕГУЛЯТОРНЫХ СЕКМЕНТАХ ДНК И ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ

И.В. Кулаковский^{1,2}, И.Е. Воронцов¹, А.С. Ландо³, В.Ю. Макеев^{1,2,3}

¹Институт общей генетики РАН им. Н.И. Вавилова; ²Институт молекулярной биологии РАН им. В.А. Энгельгардта, Москва;

³Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

Современные высокопроизводительные методы позволяют идентифицировать однонуклеотидные полиморфизмы и соматические мутации в масштабе полных геномов. Недавние исследования показали, что от 60 до 90% нуклеотидных замен, ассоциированных с заболеваниями, встречаются в некодирующей ДНК, преимущественно в регуляторных районах. Одним из предполагаемых механизмов возникновения таких ассоциаций является модификация участков ДНК, специфически связывающиеся факторы транскрипции, что в свою очередь может привести к изменениям в экспрессии регулируемых генов. Эти изменения экспрессии сильно зависят от конкретной ткани, поскольку мутация или аллельный вариант в конкретной ткани может оказать в открытом или закрытом хроматине, а также в присутствии или в отсутствие тканеспецифически связанных кофакторов. Важный вопрос заключается в том, насколько в настоящее время возможна идентификация ткани, которых конкретный вариант генома или соматическая мутация повлияет на экспрессию генов и клеточный фенотип. Мы показываем, что существующие методы в значительной степени могут обеспечить достаточно надежное предсказание таких событий, при условии доступности данных по статусу хроматина и картины тканеспецифической экспрессии генов. Кроме того, во многих случаях такие данные могут быть перенесены из соответствующих тканей с использованием методов машинного обучения.

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ПРОЕКТ «ПРОТЕОМ ЧЕЛОВЕКА» И УЧАСТИЕ В НЕМ РОССИЙСКИХ УЧЕНЫХ

А.И. Арчаков *НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия*

Развитием проекта «Геном человека» стало начало международного проекта «Протеом человека», старт которого объявлен 23 сентября 2010 года в Сиднее. Россия не участвовала в выполнении проекта «Геном человека», однако, была одной из шести стран-инициаторов международного протеомного проекта, цель которого более амбициозна – измерить содержание продуктов экспрессии генов (белков) в организме человека. Предполагается, что эти знания откроют новые горизонты в диагностике и лечении заболеваний.

Среди принятых международным сообществом подходов к исследованию протеома, одним из наиболее успешно развивающихся стал хромосомо- или геноцентричный подход, при котором результаты анализа белков картируются на соответствующие им белок-кодирующие гены определенной хромосомы. На сегодняшний день в выполнении проекта участвует более 20 стран (США, Канада, Корея, Китай и др.), усилия которых направлены на измерение белков, кодируемых 25 хромосомами человека (22 соматических, 2 половые хромосомы – X и Y, и митохондриальная хромосома). Российская часть проекта заключается в определении содержания белков, кодируемых генами хромосомы 18 человека, выбранной по оптимальному соотношению количества белок-кодирующих генов (их около 300) и их медицинской значимости.

Согласно утвержденной международным Консорциумом дорожной карте проекта, конечной целью российской части является определение размеров протеома хромосомы № 18 в трех типах биологического материала – клетках печени человека, клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 и плазмы крови. Размер протеома зависит от количества видов белков (ширины протеома) и числа копий каждого вида белка в биологическом образце (глубины протеома). Ширина протеома может быть рассчитана только при учете возможных модификаций белков, т.е. одно-аминокислотных полиморфизмов, вариантов альтернативного сплайсинга и пост-трансляционных модификаций. Для определения глубины протеома дорожной картой установлена граница чувствительности используемого аналитического метода – 10^{-18} М, что соответствует 1 копии белка на 10^7 клеток печени или клеточной линии HepG2 или 1 μ Л плазмы.

В первые пять лет реализации проекта «Протеом человека» за счет использования современных масс-спектрометрических методов российские ученые достигли наилучшей степени охвата белков, кодируемых одной хромосомой.

ИНТЕРАКТОМИКА БЕЛКОВ, КОДИРУЕМЫХ ГЕНАМИ 18-Й ХРОМОСОМЫ ЧЕЛОВЕКА

А.С. Иванов, А.Е. Медведев *Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия*

Ранее нами был разработан метод прямого молекулярного фишинга потенциальных партнеров белок-белковых взаимодействий (ББВ), основанный на совмещении технологий поверхностного плазмонного резонанса (SPR), хроматографии и масс-спектрометрии белков (LC-MS/MS). Его применимость была проверена экспериментально с оценкой эффективности и специфичности фишинга белка-партнера на целевой белок-наживку (Proteomics, 2012, 12, 3295; Биомед. химия, 2013, 59(2), 171; Биомед. химия, 2015, 61(2), 231), а также в исследованиях белков, кодируемых генами 18-й хромосомы человека (J. Proteome Res. 2013, 12, 123; FEBS J., 2013, 280 (Suppl. 1), 633; Proteomics. 2014, 14, 2261).

Для повышения эффективности метода мы перешли от фишинга из общего тканевого лизата к фишингу из его отдельных фракций, полученных индивидуально для каждого белка-наживки с помощью комбинации гель-хроматографии и SPR анализа фракций на присутствие потенциальных белков-добычи (Биоорг. химия, 2016, 42(1), 18). В результате были идентифицированы возможные белки-партнеры 7 белков человека, кодируемых генами 18-й хромосомы. Однако данный метод охватывает лишь локальные участки интерактома и не обеспечивает его системный (омикс) анализ. В рамках проекта РФФИ 16-04-00057, мы разработали подход, основанный на хроматографическом профилировании нативных белковых комплексов. Согласно нашей гипотезе, при гель-хроматографическом разделении тканевого лизата в его фракциях должны присутствовать белки, молекулярная масса которых не соответствует калибровке колонки, оказавшиеся в более тяжелых фракциях в составе молекулярных комплексов. Реализуемость подхода была подтверждена в пилотном эксперименте, который показал возможность получения информации о размерах стабильных белковых комплексов и об участии (или неучастии) индивидуальных белков в формировании простых димерных или более сложных комплексов с числом субъединиц 3 и более. *Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы и гранта РФФИ 16-04-00057.*

**ПРОТЕОМИКА БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ. НОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ
К АНТИБИОТИКАМ**

Е.Н. Ильина, И.Н. Бодоев, М.В. Малахова, О.В. Побегуц, И.О. Бутенко, Э.Ю. Хлебус, А.И. Манолов, И. Алтухов, В.Г. Згода, В.М. Говорун *ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия*

Клеточная оболочка – важнейший и обязательный структурный элемент любой бактериальной клетки. Для грамотрицательных бактерий клеточная оболочка состоит из внутренней и внешней мембраны, разделенных периплазматическим пространством. До 90% жизненно-важных метаболических процессов клетки протекают с участием мембранных белков и образуемых ими комплексов. Кроме того, мембранные белки вовлечены в реализацию природной и приобретенной устойчивости бактерий к антимикробным препаратам.

В ходе анализа мультимодальных данных, получаемых количественной протеомикой мембранных белков и сравнительной геномикой, нам удалось расшифровать новый механизм формирования устойчивости гонококка к ампициллину, реализуемый посредством мутаций в периплазматическом шапероне SurA. Объектом исследования служил клинический изолят гонококка i19.05 со сниженной чувствительностью к пенициллину (MIC=0.5 mg/L), тетрациклину (MIC=0.5 mg/L) и азитромицину (MIC=1.0 mg/L). Стоит отметить, что данный изолят не содержал известных детерминант устойчивости, кроме мутантного белка PenA (Asp345a), который не обеспечивает наблюдаемый уровень резистентности.

Первоначальный анализ белковых карт этого изолята (2D-электрофорез) показал колоссальное накопление основного белка внешней мембраны, порина, что повлекло за собой всесторонний анализ белков, ответственных за биогенез клеточной оболочки. Был идентифицирован уникальный набор аминокислотных замен в периплазматическом шапероне SurA и белке Omp85 (BamA). Стоит отметить, что данный набор мутаций уникален и находится непосредственно в доменной структуре белков, что может влиять на корректность их работы, приводя к изменению белкового состава и свойств клеточной оболочки. Путем трансформации штамма-реципиента фрагментами мутантной ДНК исследуемого изолята i19.05, нами получен штамм, демонстрирующий уровень устойчивости к ампициллину и проницаемость клеточной оболочки идентичные донору. Сравнительный LC-MS/MS анализ белков клеточных оболочек штамма-реципиента, изолята i19.05 и трансформанта показал многократное увеличение в исследуемом изоляте i19.05 и полученном трансформанте периплазматического шаперона Skp, субстратная специфичность которого во множестве бактерий отличается от SurA. Таким образом, мутантные белки SurA и Omp85 (BamA) приводят к активации альтернативных путей прохождения биогенеза мембранных белков, вызывая изменения свойств клеточной оболочки, в частности снижая проницаемость для антибиотиков.

ФАЗОВЫЙ ПЕРЕХОД БАКТЕРИИ MYCOPLASMA GALLISEPTICUM ПРИ ИНВАЗИИ В КЛЕТКУ ХОЗЯИНА

Д.С. Матюшкина, О.В. Побегуц, И.О. Бутенко, А.А. Ванюшкина, Н.А. Аниканов, О.Н. Букато, Д.В. Евсютина, Т.А. Семашко, И.А. Гаранина, Г.Ю. Фисунов, В.М. Говорун

Лаборатория протеомного анализа, ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия

Mycoplasma gallisepticum относится к бактериям с очень маленьким геномом и может рассматриваться как удобный модельный объект для изучения системной биологии. *M. gallisepticum* является патогенным птиц, инфицирующим респираторный тракт. В данной работе была показана способность *M. gallisepticum* S6 проникать в клетки человеческой линии HeLa, линии куриных эритроцитов HD3 и в мышечные эмбриональные стволовые mES клетки с помощью конфокальной микроскопии и гентамицинового теста. Было исследовано две модели инфекции: острая (24 часа) и хроническая (19 дней и 7 недель). С помощью двумерного дифференциального электрофореза с последующим MALDI-MS анализом и сравнительного протеомного анализа методом множественных реакций (MRM) с помощью tandemного масс-спектрометра с линейной ионной ловушкой ABSciex QTrap 4500 было выявлено, что при внутриклеточной локализации *M. gallisepticum* претерпевает фазовую реорганизацию, о чем свидетельствуют изменения на протеомном, метаболомном и геномном уровнях. Изменение протеомного профиля включает в себя белки, обладающие оксидоредуктазной активностью, белки гликолиза, трансляции и метаболизма. Подобные изменения сохраняются на протяжении нескольких пассажей при изолировании внутриклеточной микоплазмы и культивировании *in vitro*. Во всех случаях инфекции наблюдалось увеличение регуляторного белка SpxA.

Сравнение сконструированного нами штамма микоплазмы, гиперэкспрессирующего *SpxA*, с лабораторным штаммом показало схожие изменения, что и при внутриклеточной инфекции. Мы считаем, что *SpxA* является глобальным регулятором адаптации к выживанию внутри клетки. Были обнаружены изменения поверхностных Vlh-антигенов. Показано, что их репертуар строго зависит от того, является ли инфекция острой или хронической, а также, является ли инвазия в эукариотическую клетку для микоплазмы первичной или бактерия претерпевает повторное попадание в клетку хозяина. Кроме этого, микоплазма активизирует пути метаболизма, связанные с утилизацией глицерина и глицерин-содержащих молекул до дигидроксияцетонфосфата, а также реакции образования ацетата из пирувата с участием НАДН-оксидазы, в результате которых образуется пероксид водорода. Предполагается, что он необходим *M. gallisepticum* для активации *SpxA*, внутриклеточной инвазии и персистенции в клетке хозяина.

ПРОТЕОГЕНОМИКА: ПОИСК МУТАЦИЙ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ КЛЕТОК НА УРОВНЕ ПРОТЕОМА

А.А. Лобас^{1,2,3}, К.Г. Кузнецова¹, М.В. Иванов^{2,3}, Е.М. Соловьева^{2,3}, А.А. Ключникова¹, И.Ю. Ильина¹, М.А. Пятницкий^{1,4}, В.Г. Згода¹, М.В. Горшков^{2,3}, С.А. Мошковский^{1,4} ¹НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; ²Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН; ³Московский физико-технический институт (государственный университет); ⁴Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия

Протеомика, как высокопроизводительный анализ протеома, в варианте использования масс-спектрометрии, остается перспективной технологией. Это означает, что определение последовательности белков *de novo* пока значительно уступает по эффективности их идентификации с использованием геномных баз данных. До недавнего времени такой поиск в протеомах человека проводили исключительно с помощью консенсусной, усредненной базы данных генома. Секвенирование геномов злокачественных опухолей в последние годы указало на масштаб изменений генома во многих опухолях. Возникла потребность использовать для протеомного анализа собственные геномы опухолей способом, который обозначается как протеогеномика опухолей. Принцип такого анализа мы продемонстрировали на 60 стандартных клеточных линиях коллекции NCI-60. Получив из разных источников готовые данные геномов и протеомов, мы совместили их и идентифицировали пептиды, содержащие последствия миссенс-мутаций. Среди этих пептидов обнаружили кодирующие мутации в связанных с развитием рака белках, например, p53. Также исследована клеточная линия НЕК-293, протеом которой изучен настолько глубоко, что эта человеческая линия является одним из наиболее охарактеризованным с этой точки зрения объектом с идентифицированными продуктами около 10 тысяч генов. При анализе кодирующих вариантов генома этой линии обнаружено, что участки с вариантами экзона имеют в 2,5 раза меньше шансов быть идентифицированными на уровне протеома, чем участки «дикого типа». Это интересное наблюдение связано с мутаторным фенотипом опухоли, который характеризуется наличием мутаций-пассажиров в тех генах, которые не экспрессируются. Протеогеномный подход, включающий выявление кодирующих аминокислотных замен вариантов в ДНК или РНК путем высокопроизводительного секвенирования, и их поиск в протеоме, полученном на масс-спектрометре высокого разрешения, подходит не только для поиска раковых мутаций, но и для вариантов альтернативного сплайсинга и редактирования РНК в различных тканях и объектах.

ПРОБЛЕМЫ ПОИСКА И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВАРИАНТНЫХ ПЕПТИДОВ МУТАНТНЫХ БЕЛКОВ В ЗАДАЧАХ ПРОТЕОГЕНОМИКИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЧЕЛОВЕКА

К.Г. Кузнецова¹, А.А. Лобас^{2,3}, М.В. Иванов^{2,3}, Д.С. Карпов¹, И.Ю. Ильина¹, А.Т. Копылов¹, Е.М. Соловьева^{2,3}, С.А. Мошковский¹, М.В. Горшков^{2,3}

¹НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва; ²Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН, Москва; ³Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Россия

Результатом высокопроизводительного протеомного анализа методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (МС/МС) является идентификация протеолитических пептидов в референтной базе данных белков. При этом, пептиды, относящиеся к участкам белков с измененной на уровне нуклеиновой кислоты аминокислотной последовательностью, остаются за бортом такого поиска. Использование специализированных баз данных белков, основанных на данных геномного и/или транскриптомного секвенирования анализируемой пробы, позволяет идентифицировать мутантные последовательности, являющиеся результатом однонуклеотидного полиморфизма или альтернативного сплайсинга. Такой подход, в основе которого лежит использование персонализированной геномной информации для поиска кодирующих последовательностей белков, экспрессированных на протеомном уровне, получил название протеогеномики. Наиболее перспективным и быстро развивающимся направлением протеогеномных исследований в последние несколько лет является протеогеномика злокачественных опухолей, в задачи которой входит определение набора вариантных пептидов, относящихся к спонтанным мутациям в раковом геноме. Однако, существует ряд нерешенных фундаментальных и технологических проблем идентификации вариантных пептидов на основе протеогеномного подхода. В первую очередь, это недостаточная чувствительность и специфичность протеомного анализа методами ВЭЖХ-МС/МС, появление артефактов в процессе пробоподготовки проб, высокий уровень ложных идентификаций, и др. Еще одной серьезной проблемой является выбор оптимальных стратегий биоинформатической обработки протеомных данных и поиска с использованием референтных и персонализированных баз данных белков. В докладе мы рассмотрим эти проблемы на примере результатов собственных исследований клеточных линий человека и крупномасштабных работ последних лет в области глубокого протеомного анализа, а также возможные пути их решения.

НАНОПРОВОДНЫЙ АПТАБИОСЕНСОР ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВЫХ БИОМАРКЕРОВ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А.И. Арчаков, Ю.Д. Иванов, Т.О. Плешакова, И.Д. Шумов, К.А. Мальсагова

НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Нанопроводный детектор позволяет регистрировать серологические маркеры белковой природы: (1) в биоматериале с высокой чувствительностью – $DL < 10^{-12}$ М; (2) с высокой стабильностью; (3) в режиме реального времени без использования меток; (4) с возможностью одновременного измерения нескольких типов маркеров, что делает его наиболее перспективным для диагностики социально-значимых заболеваний. Принцип действия нанопроводного биосенсора основан на регистрации модуляции тока, протекающего через сенсорную зону нанопроволочной структуры, при биоспецифическом выявлении

на ее поверхность молекул аналита (серологических маркеров). Теоретический предел детекции нанопроводного биосенсора может достигать уровня единичных молекул на сенсорную зону.

В последние два десятилетия появился новый класс синтетических молекул аптамеров, которые успешно используются в качестве биоспецифических молекулярных зондов к белкам дв нанопроводных биосенсорах. Такие биосенсоры получили название аптабиосенсоры. Аптамеры обладают рядом преимуществ по сравнению с антителами; они отличаются – (1) высокими константами аффинности; (2) высокой стабильностью; (3) недорогой разработкой.

В нашей работе были созданы нанопроводные аптасенсоры для выявления белковых маркеров, ассоциированных с онкологическими и инфекционными заболеваниями. Чувствительность детекции этих маркеров составляла $DL = 10^{-14}$ и 0^{-13} М, соответственно. Работа поддержана грантом РФФИ 15-04-08368

ПРОТЕОГЕНОМНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ КЛАСТЕРА BEIJING B0/W148

Е.А. Шитиков¹, Ю.А. Беспятых¹, И.А. Алтухов¹, И.О. Бутенко¹, Н. Мельникова², В.Ю. Журавлев², Е.Н. Ильина¹, В.М. Говорун¹

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва; ²Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия

На сегодняшний день среди микобактерий туберкулеза (МБТ) генетическое семейство Beijing является наиболее распространенным и характеризуется повышенной трансмиссивностью и лекарственной устойчивостью. Четверть всех штаммов семейства Beijing, циркулирующих на территории России, относится к кластеру Beijing B0/W148, определяемому с использованием IS6110-RFLP типирования. Целью настоящего исследования было описать особенности эндемичных штаммов данного кластера на геномном и протеомном уровнях.

В исследование были включены 7 штаммов МБТ кластера Beijing B0/W148 и 1 референтный штамм H37Rv. Полногеномное секвенирование проводили с использованием секвенатора Roche GS FLX+. Сборку геномов и определение однонуклеотидных полиморфизмов осуществляли с использованием GS *de novo* assembler v 2.5 и GS Reference Mapper, соответственно. Безметочное протеомное профилирование проводили с использованием ABSciex TripleTOF 5600. Идентификацию и квантификацию осуществляли программными пакетами AB SCIEX ProteinPilot v 4.5, Mascot v 2.2.07 и Progenesis v 4.1. В ходе филогенетического анализа было установлено сходство между изучаемыми штаммами Beijing B0/W148 и опубликованным полным геномом W-148 (CP012090.1). Полногеномное выравнивание W-148 и H37Rv показало наличие двух крупных хромосомных перестроек в геноме W-148. Первый инвертированный участок затрагивал 559 т.п.о. и располагался между генами Rv0609a и Rv1135c (приведено в соответствии с геномом H37Rv). Второй инвертированный участок распространялся на 339 т.п.о. и затрагивал участок геномной ДНК между генами Rv3019c и Rv3327. Дополнительно было описано 59 кластер-специфических SNPs, которые могут отчасти объяснить “успешность” представителей кластера, а также быть использованы для мониторинга. Согласно данным протеомного анализа было идентифицировано 1868 белков Beijing B0/W148 и 1560 для H37Rv. Сравнительный количественный анализ показал статистически значимое различие между штаммами кластера и H37Rv в представленности 192 белков. Функциональный анализ показал различия в представленности белков липидного обмена и белках, участвующих в ответе на гипоксию. Найденные особенности позволяют сделать предложение о лучшей адаптации штаммов кластера к выживанию в макрофагах. *Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 14-15-00689.*

МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ 100 РАЗРЕШЕННЫХ К КЛИНИЧЕСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ БИОМАРКЕРОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ

О.И. Киселева, Ю.А. Ромашова, А.В. Лисица НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Плазма крови – одна из наиболее информативных и часто используемых биологических жидкостей как при проведении научных исследований, так и в рутинной клинической диагностике. Концентрация белков в плазме крови отражает состояние здоровья, а изменения уровня содержания отдельных маркерных молекул плазмы могут быть ассоциированы с развитием патологического процесса и ответом на получаемую терапию. Масс-спектрометрический метод мониторинга множественных реакций (англ. Selected Reaction Monitoring, SRM) позволяет сконфигурировать протокол многопараметрического скринингового теста. Мы использовали метод SRM для анализа 100 клинически значимых белков в 19 образцах плазмы крови. Панель мишеней формировалась из четырех белковых групп, в одну из которых вошли перспективные маркеры заболеваний, а остальные служили для контроля условий эксперимента.

Из 100 целевых белков 44 были достоверно детектированы, оставшиеся 56 были обнаружены в единичных технических повторениях. Коэффициент вариации результатов измерения концентрации для 2/3 детектированных белков составил менее 30%. Мы проанализировали факторы, затрудняющие анализ целевых белков: от генетических вариаций и посттрансляционных модификаций и до несоблюдения стандартных процедур по пробоотбору и пробоподготовке. Детектируемость белков исследовали как функцию содержания белка в пробе и коэффициента вариации результатов измерений. На основании данных о детектируемости целевых белков установили, что число биообразцов находится в экспоненциальной зависимости от числа целевых белков и обратно пропорционально логарифму чувствительности измерительного метода.

THE ENDOGENOUS TRYPTIC PEPTIDES OF EDTA PLASMA FROM ALZHEIMER'S DEMENTIA, HEART ATTACK, SEPSIS, OVARIAN CANCER, BREAST CANCER, AND MULTIPLE SCLEROSIS ALONGSIDE INSTITUTION/STUDY MATCHED CONTROLS

John G. Marshall Department of Chemistry and Biology, Faculty of Science, Ryerson University, Toronto, ON, Canada

EDTA plasma from Alzheimer's Dementia, Breast Cancer, Heart Attack, Ovarian Cancer, Sepsis and Multiple Sclerosis and the corresponding institution-matched controls were compared by liquid chromatography & tandem mass spectrometry. Samples collected on ice, or purposefully degraded over time at room temperature, also served as controls. The peptides were precipitated in acetonitrile and then selectively extracted from the pellet with a step gradient of increasing water. The step fractions were collected and analyzed on a new preparative C18 and a new C18 analytical column for each patient to prevent cross contamination. The type I error rate of precursor ions of greater than 1000 counts were confirmed against a null random model of noise or computer generated random spectra. There was significant variation between EDTA plasma provided by different study/institution. Peptides from many

well-established acute phase markers such as amyloids, haptoglobin, complements, fibrinogens, hemopexin, antitrypsin, alpha 2 macroglobulin, and others showed variation in terms of frequency and/or intensity summed over all of the disease states ($n \geq 60$) versus all of the controls ($n \geq 60$) by the Chi Square test. There was significant disease-specific variation in peptides or phosphopeptides from Zinc Finger, coiled-coiled, DNA binding proteins, signaling factors and many other proteins including uncharacterized factors between disease states ($n \geq 10$) versus the matched institution/study control ($n \geq 10$), and the average of all controls ($n \geq 60$), by the Chi Square test. The parent proteins of the peptides enriched in disease were independently confirmed to be present in human blood fluid by pre-fractionation of the intact protein of plasma over a battery of stationary phase resins (Quaternary Amine, Propyl Sulfate, DEAE, CMC, Heparin, Hydroxyapatite and others), followed by trypsin digestions and LC-ESI-MS/MS of the peptides for subsequent targeted analysis without antibodies.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ТАРГЕТНАЯ ПРОТЕОМИКА БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

А.Т. Копылов, Е.В. Ильгисонис, О.В. Тихонова, М.Г. Завьялова, С.Е. Новикова, В.Г. Згода, А.И. Арчаков

НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

В работе проведен количественный протеомный анализ 54 образцов плазмы крови здоровых добровольцев, которые прошли всестороннее медицинское обследование и были признаны годными к космическим полетам.

Концентрация белков кодируемых генами 18 хромосомы определялась масс-спектрометрическим методом мониторинга множественных реакций (MRM). Для этого были синтезированы 270 изотопномеченных пептида, характеризующие последовательности 266-ти белков 18 хромосомы. Для снижения диапазона концентрации белков плазмы и повышения чувствительности метода измерений на первом этапе из образцов удаляли 14 наиболее представленных белков методом иммуноаффинной хроматографии. Образцы плазмы до и после иммуноаффинной хроматографии гидролизовали трипсином с использованием разработанного роботизированного метода. Методами MRM анализа с применением изотопномеченных пептидов в качестве внутренних стандартов удалось зарегистрировать присутствие и определить концентрации 84 белков плазмы крови. Измеренные концентрации белков находились в пределах от 10^{-6} М (transferrin, P02766) до 10^{-11} М (P4-ATPase, O43861).. Анализ межиндивидуальной вариабельности концентрации белков 18 хромосомы показал, присутствие пула белков с низкой вариабельностью ($CV < 30\%$). Таких белков оказалось 27. К средне-вариабельным (отклонение от среднего $< 50\%$) относятся около 20% исследованных белков. Высоко-вариабельные белки, для которых наблюдается межиндивидуальный разброс концентраций более 50%, составляют более половины от всех зарегистрированных белков. Таким образом, получены референсные данные о концентрации 84 белков плазмы крови человека и определены белки с низкой межиндивидуальной вариабельностью, которые потенциально могут использоваться в качестве биомаркеров.

ЭКЗОГЕННЫЕ ПЕПТИДЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Г.П. Арапиди^{1,2}, М.С. Осетрова^{1,2}, Т.М. Савельева^{1,2}, О.М. Иванова¹, П.В. Павлович^{1,2}, В.О. Шендер¹, Р.Х. Зиганшин¹, Н.А. Аниканов¹, В.М. Говорун^{1,3}, В.Т. Иванов¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²Московский физико-технический институт (государственный университет); ³ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России

Кровь, как соединительная ткань, потенциально может содержать пептидные фрагменты любого белка организма. Среди пептидов, обнаруживаемых в крови есть как фрагменты белков, секретируемых различными тканями и выполняющими свою функцию в плазме, так и лиганды рецепторов (гормоны, цитокины, медиаторы клеточного ответа). Кроме того, в минорных количествах в крови можно обнаружить пептидные маркеры процессов, происходящих в организме (к примеру, онкомаркеры), и даже чужеродные пептиды, относящиеся к патогенным организмам и инфекционным агентам. Изучение пептидома крови дает информацию практически о всех процессах, происходящих в организме. Мы провели LC-MS/MS исследование образцов плазмы крови 20 практически здоровых доноров. Пробоподготовку проводили на основании ранее разработанного нами высокопроизводительного и воспроизводимого метода выделения пептидов из сыворотки и плазмы крови человека. Для идентификации использовали согласованный подход, основанный на двух поисковых машинах (Mascot и X! Tandem) и валидацию на основе машинного обучения и анализа времени хроматографического выхода пептидов. Поиск проводили по базам данных известных белковых последовательностей человека, транскриптов, которые сейчас относят к длинным некодирующим РНК, а также белков различных микробиот человека. В результате анализа масс-спектрометрических данных идентифицировано более 3000 уникальных пептидных фрагментов белков человека, около 30 пептидов, относящиеся к транскриптам, которые ранее считались длинными некодирующими РНК, а также около 100 пептидов, относящихся к микробиотам, входящих в состав различных микробиот человека. Достоверность идентификации пептидов была подтверждена рядом биоинформатических подходов, а также при помощи синтетических аналогов. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).* Экзогенные пептиды плазмы крови

ПРОТЕОМИКА ДЕМИЕЛИНИЗИРУЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Р.Х. Зиганшин¹, О.М. Иванова¹, Я.А. Ломакин¹, А.А. Белогуров^{1,4}, Н.А. Аниканов¹, М.А. Пирадов³, Н.А. Супонева³, А.Г. Габитов^{1,4}, В.Т. Иванов¹, В.М. Говорун^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА;

³Научный центр неврологии, Москва; ⁴Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Синдром Гийена-Барре (СГБ) – это редкое, но крайне тяжелое заболевание периферической нервной системы, выражающееся в стремительно развивающемся восходящем параличе, который в особо тяжелых случаях поражает дыхательную мускулатуру. Синдром впервые был описан более 100 лет назад, но, несмотря на это, его этиология до сих пор остаётся плохо изученной. По наиболее распространенной на сегодняшний день гипотезе СГБ является аутоиммунным заболеванием, развивающимся в организме по механизму молекулярной мимикрии. В соответствии с этой гипотезой иммунный ответ на определённые вирусы и/или бактерии может приводить к образованию антител, имеющих кросс-реактивность с собственными антигенами, локализованными на поверхности миелиновой оболочки периферических нервов, что приводит к её повреждению в результате атаки макрофагов и последующему нарушению проводимости нервов. Другим аутоиммунным де-

миелинизирующим заболеванием, но локализующимся в центральной нервной системе, является рассеянный склероз. Основное отличие СГБ от хронического и неизлечимого заболевания, каковым является рассеянный склероз, заключается в его монофазном и самоограничивающемся течении (т.е. СГБ проходит и без лечения). Выделяют как минимум 4 различные формы СГБ, которые дифференцируют друг от друга по электрофизиологическим характеристикам нервов и которые, по-видимому, имеют различный патогенез. Самая распространённая форма СГБ (в западных странах на неё приходится порядка 90% случаев) – острая, воспалительная, демиелинизирующая полирадикулопатия» (ОВДП), и она же является наименее изученной с точки зрения причин её возникновения. Одним из признаков заболевания является значительное повышение у больных общей концентрации белка в спинномозговой жидкости (СМЖ), однако специфика изменения белкового и пептидного состава этой биологической жидкости были до последнего времени совершенно не изучены. Нами было проведено сравнительный анализ пептидно-белкового состава и иммунологических профилей СМЖ и сыворотки крови пациентов с ОВДП, рассеянным склерозом и пациентов, не имеющих неврологических заболеваний. В результате работы в спинномозговой жидкости пациентов с ОВДП, рассеянным склерозом и пациентов, не имеющих неврологических заболеваний, было идентифицировано 2355, 1066 и 774 эндогенных пептида, являющихся продуктами деградации 800, 260 и 230 белков, соответственно. Среди пептидов, идентифицированных исключительно в СМЖ пациентов с ОВДП, были обнаружены фрагменты белков клеточной адгезии, принимающих участие в организации миелиновой оболочки периферических нервов и перехватов Ранвье. Проверка наличия в крови пациентов потенциальных аутоантител к этим белкам не выявила статистически значимых отличий между контрольными и патологическими образцами, а анализ цитокиновых профилей сыворотки крови и СМЖ не обнаружил в них признаков, характерных для активации адаптивного иммунного ответа. Полученные данные позволили сформулировать новую гипотезу о патогенезе ОВДП, в соответствии с которой аутоиммунные процессы не играют ключевой роли в развитии заболевания. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).*

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В КРОВИ НУКЛЕОПРОТЕИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

С.Н. Тамкович^{1,2}, О.С. Тутанов¹, Т.Г. Дужак³, Н.А. Кирюшина⁴, В.Е. Войцкий⁺, Ю.П. Центалович³, П.П. Лактионов^{1,5}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет; ³Институт «Международный томографический центр» СО РАН; ⁴Новосибирский областной онкологический диспансер; ⁵Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. Е.Н. Мешалкина МЗ РФ, Новосибирск, Россия

Известно, что в крови постоянно циркулируют эндогенные внеклеточные ДНК. Эти ДНК защищены от действия нуклеаз и циркулируют в составе апоптотических телец, нуклеосом, комплексов с ДНК-связывающими белками крови. В настоящее время накоплено множество разрозненных данных о белках, способных аффинно связывать нуклеиновые кислоты, однако до сих пор достоверно не известно, какие белки, кроме гистонов и амилоида Р, участвуют в формировании циркулирующих в кровотоке нуклеопротеиновых комплексов (НПК). Целью работы является исследование белкового состава НПК, циркулирующих в плазме крови здоровых женщин (ЗЖ, n = 5) и больных раком молочной железы (РМЖ, n = 5) на начальных стадиях заболевания (T1-2N0M0). НПК из плазмы крови ЗЖ и больных РМЖ выделяли аффинной хроматографией на сорбентах с иммобилизованными антителами против гистонов [Тамкович и др., 2015]. Размер ДНК в составе НПК оценивали с помощью капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA) с использованием High Sensitivity DNA Kit, белки идентифицировали методом масс-спектрометрии. Установлено, что в составе гистон-содержащих НПК так же как и в плазме крови ЗЖ преобладает ДНК длиной 170-180 п.н., в крови и НПК больных РМЖ – ДНК длиной 170-180 п.н. и более 6 т.п.н. представлены в равном количестве. Методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии с высокой достоверностью (score более 56) идентифицировано 167 белков в составе гистон-содержащих НПК, обеспечивающих транспорт внеклеточных ДНК в кровотоке. Установлено, что в составе НПК больных РМЖ по сравнению со ЗЖ в два раза возрастает доля ферментов и в два раза снижается доля мембранных белков. Наиболее универсальными белками НПК плазмы крови (представлены более чем в 40% всех образцов) являются Инсулин-деградирующий фермент, Белок гомеобокса Noh-C5 и Вероятный G-белок-ассоциированный рецептор 22. Только в составе НПК крови больных РМЖ выявлено 34 белка, из которых 14 (41%) являются опухоле-ассоциированными, что указывает на то, что часть циркулирующей внеклеточной ДНК имеет опухолевое происхождение.

ВСТРЕЧАЕМОСТЬ ГОМОПОВТОРОВ В ПРОТЕОМАХ: СВЯЗЬ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ ФУНКЦИЯМИ И БОЛЕЗНЯМИ ЧЕЛОВЕКА

О.В. Галзитская, И.В. Соколовский, М.Ю. Лобанов Институт белка, Пуцзино, Россия

Нативно-неструктурированные белки не имеют уникальной пространственной структуры при физиологических условиях. Конформация такого белка в комплексе определяется партнером по взаимодействию, а не только собственной аминокислотной последовательностью, как у глобулярных белков. Нами выполнена работа по кластеризации белковых структур с заданной идентичностью между белковыми последовательностями и построена библиотека неструктурированных мотивов, которая включает 171 шаблон. Нами проведён анализ встречаемости гомоповторов и неструктурированных шаблонов в 122 протеомах и найдены часто встречающиеся мотивы и повторы. Встречаемость конкретного гомоповтора зависит от протеома. Протеомы близкие по классификации организмов имеют сходные наборы неструктурированных мотивов и гомоповторов. Анализ белков протеома человека с гомоповторами позволил нам ответить на несколько важных вопросов: какая длина гомоповтора может считаться не случайной; какая разница между ожидаемой встречаемостью длинных гомоповторов и реальной встречаемостью в протеомах; как много белок-белковых взаимодействий относится к белкам, в которых встречаются длинные гомоповторы; какую биологическую функцию выполняют гомоповторы и существует ли связь между заболеваниями и встречаемостью гомоповторов? Биологическая функция многих гомоповторов пока неизвестна, но их встречаемость в белках связана уже более чем с 20 наследственными заболеваниями, такими как болезнь Хантингтона, спиноцеребеллярная атаксия, синполидактилия II типа, блефарофимоз, окулофарингеальная мышечная дистрофия, ассоциированная голопрозэнцефалия и др. Используя базу OMIM мы нашли, что гомоповторы из таких аминокислот как G, A, P, E, S, Q, L, D и H с

большой вероятностью связаны с болезнями. При этом оказалось, что нейрональные белки, связанные с аутизмом, обогащены такими гомоповторами как S, E, P, A, Q, D и T. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (#14-14-00536).

МЕТОД ДЕКОЙНЫХ БАЗ ДАННЫХ В ПРОТЕОМИКЕ: ОГРАНИЧЕНИЯ И ОСОБЕННОСТИ

Л.И. Левицкий, М.В. Иванов, А.А. Лобас, М.В. Горшков

Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН, Москва, Россия

При анализе сложных белковых смесей методами “скорострельной” протеомики одной из ключевых проблем является контроль достоверности пептидных идентификаций. Как правило, для этого пользуются понятием доли ложноположительных идентификаций (false discovery rate, FDR). Наиболее распространенным методом оценки FDR является метод декойных баз данных (target-decoy approach, TDA). Он основан на предположении, что в случае ложной идентификации вероятности присвоения спектру пептидной последовательности из “таргетной” и “декойной” баз данных равны. Поэтому количество ложных идентификаций из таргетной базы данных, соответствующее заданному уровню FDR, полагают равным. В действительности это число может отличаться от ожидаемого значения в ту или иную сторону, поскольку ложные идентификации происходят случайно. Для анализа масштаба возможных отклонений истинной доли ложных идентификаций от оценки FDR в данном докладе вводится вероятностная модель процесса фильтрации пептидных идентификаций, являющегося одним из заключительных шагов в стандартном алгоритме обработки данных методом скорострельной протеомики. Модель позволяет получить точные выражения для математического ожидания и дисперсии количества ложных идентификаций, соответствующего заданному значению FDR. Анализ этих выражений выявляет и помогает формализовать естественные ограничения метода декойных баз данных, а также показывает, что распространенное уравнение для оценки уровня FDR имеет небольшую систематическую погрешность в случае фильтрации списка идентификаций. Дополнительным источником систематических ошибок при оценке FDR методом TDA может являться используемый поисковый алгоритм. Как известно из литературы, некоторые реализации многостадийного поиска по базам данных могут приводить к дискриминации декойных идентификаций и, как следствие, к недооценке FDR. В докладе демонстрируется простой способ коррекции ошибок такого типа, применимый к распространенным поисковым алгоритмам, таким как Mascot и X!Tandem, и заключающийся в изменении процедуры создания объединенной таргет-декойной базы данных.

ВИРТУАЛЬНО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ПОДХОД В ИССЛЕДОВАНИИ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПРОТЕОМА ЧЕЛОВЕКА

С.Н. Нарыжный *НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва; Петербургский институт ядерной физики*

им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

Протеомы клеток и плазмы крови человека являются чрезвычайно сложными объектами и состоят из огромного количества разнообразных гетерогенных генных продуктов – протеоформ. Совсем недавно даже такая минимальная задача, как их инвентаризация, казалась практически недостижимой целью. Однако последние достижения в области масс спектрометрии и применение новых системных подходов (технологических и методологических) дали надежду на ее решение. Особенно перспективным здесь выглядит применение комбинации масс спектрометрии с классическими биохимическими методами разделения белков. Среди этих методов двумерный электрофорез (2DE) занимает особое место и является самым мощным подходом, позволяющим не только разделять протеоформы но и определять их физико-химические параметры (изотопу и массу). Вместе с таким приемом, как ESI LC-MS/MS, где масс спектрометрия высокой чувствительности и разрешения объединена с жидкостной нано-хроматографией, данный подход переводит протеомные исследования на более высокий уровень получения знаний о протеомах. В наших исследованиях мы применили панорамный анализ клеточных и плазменных белков, используя вышеупомянутый подход и комбинацию экспериментального и виртуального двумерного электрофореза. Это позволило идентифицировать и частично охарактеризовать более 20000 протеоформ, кодируемых примерно 4000 генами, как в клеточном, так и плазменном протеомах. Более того, такой виртуально-экспериментальный подход дал возможность получить наглядное представление о состоянии и динамике как протеомов в целом (комплемент всего генома), так и протеомов отдельных генов.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ПРОТЕОМИКА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК ГЛИОМ ЧЕЛОВЕКА К ОНКОЛИТИЧЕСКИМ ВИРУСАМ

И.А. Тарасова, А.А. Лобас, И.Ю. Ильина, Е.М. Соловьева, А.В. Терешкова, А.С. Сидоренко, Ю.А. Бубис, М.В. Иванов, А.Т. Копылов,

В.Г. Згода, С.А. Мошковский, П.М. Чумаков, М.В. Горшков *Институт энергетических проблем химической физики РАН; НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*

Последние достижения в области фундаментальной биологии, расшифровка геномов и углубление знаний о биологии раковой клетки позволили начать разработку методов специфической биотерапии рака, которые нацелены на избирательное уничтожение злокачественных клеток. Одним из перспективных подходов к биотерапии рака является использование непатогенных штаммов микроорганизмов - онколитических вирусов и бактерий. Объектами исследования данной работы являлись клеточные линии глиобластомы мультиформной DBTRG-05MG (ATCC® CRL-2020™) и A-172 [A172] (ATCC® CRL-1620™), которые показывали, соответственно, отрицательный и положительный отклик на заражение вирусом везикулярного стоматита после инкубации с интерфероном. Целью работы являлось определение дифференциально экспрессируемых белков в обработанных и необработанных интерфероном клетках глиобластомы и выявление белковых маркеров, свидетельствующих о состоянии противовирусной защиты при инфицировании вирусом стоматита. Выполняли протеомный анализ гидролизатов белков, выделенных из клеточных линий DBTRG и A-172 до и после обработки интерфероном. Разделение гидролизатов проводилось на хроматографе Dionex UltiMate® 3000 RSLCnano, соединенном с гибридным масс-спектрометром Q Exactive Orbitrap (Thermo Scientific, Германия). Биоинформационный анализ проводили с использованием поисковой машины X!Tandem и программы MProphet для подтверждения результатов идентификации белков после первичного поиска. Составлены количественные карты белков, идентифицированных в клетках глиобластомы, определены и проанализированы дифференциально экспрессированные белки. В обеих клеточных линиях после обработки интерфероном обна-

ружены интерферон-индуцированные белки, характеризующиеся антивирусной активностью. Линия DBTRG с противовирусным ответом характеризовалась повышенной продукцией динамин-подобных ГТФаз MX1 и MX2 и РНК-связывающего IFIT1. В линии A-172, погибшей при заражении вирусом, была повышена продукция ГТФазы MX1 и ингибиторов различных клеточных и вирусных процессов, в том числе вирусной репликации (IFIT3) и проникновения вируса в цитоплазму клетки (IFM3). Таким образом, на протеомном уровне обнаруживается повышенная регуляция MX1 в обеих клеточных линиях, MX2 и IFIT1 только в линии DBTRG; IFIT3 и IFM3 только в линии A-172.

МАРКЕРЫ ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ РАЗВИТИЯ ТЯЖЕЛОЙ ОСЛОЖНЕННОЙ ФОРМЫ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ

А.А. Байгильдина Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

ГЛПС является «болезнью эндотелия» и интима сосудов повреждается в самые ранние сроки, поэтому для диагностики заболевания в начальный период является целесообразным определение уровня в крови соединений эндотелиального происхождения. Ранняя диагностика формы тяжести ГЛПС и терапия в первые дни от начала болезни позволяют снизить частоту развития осложнений - ОПН, ДВС-синдрома, разрыва капсулы почки, кровоизлияния в гипотиз и др. Цель исследования - изучение клинической информативности определения в крови больных ГЛПС уровня PAI-1, VCAM-1 и VEGF в период лихорадки. Обследованы 137 больных во возрасте 35,0 [25,0; 47,0] лет, в т. ч. со среднетяжелой - 44,5% (1 гр.), тяжелой неосложненной - 31,4% (2 гр.), тяжелой осложненной формой - 24,1% (3 гр.). Группу контроля составили 44 практически здоровых добровольца. Критерий исключения из исследования - наличие сердечно-сосудистых, эндокринных, злокачественных заболеваний, болезней печени и почек. Концентрации PAI-1, VCAM-1 и VEGF в сыворотке крови определены методом ИФА с использованием наборов компаний Technoclone (Австрия), Bender MedSystems (Австрия), BioSource (Бельгия) соответственно. Концентрация PAI-I (нг/мл): контроль - 228,2 [193,0; 263,3], 1 гр. - 438,5 [297,1; 570,0] ($p=0,01$), 2 гр. - 269,8 [240,4; 333,8] ($p=0,02$), 3 гр. - 106,0 [75,5; 138,3] ($p=0,02$). Уровень VCAM-1 (нг/мл): контроль - 963,0 [915,0; 1103,6], 1 гр. - 1760,2 [1690,3; 2220,1] ($p=0,009$), 2 гр. - 1437,2 [1385,6; 2177,3] ($p=0,03$), 3 гр. - 2625,4 [1475,2; 2825,8] ($p=0,02$). Содержание VEGF (пг/мл): контроль - 67,0 [43,4; 77,4], 1 гр. - 8,5 [8,2; 12,2] ($p=0,0007$), 2 гр. - 2,9 [2,5; 3,2] ($p=0,002$), 3 гр. - 50,5 [30,2; 73,2] ($p=0,04$). Наблюдаются выраженные межгрупповые различия в уровне изучаемых субстанций в крови больных ГЛПС уже в ее начальный период. Но если в 1 и 2 гр. изменения однонаправленны и носят только количественный характер, то в 3 гр. они являются не только количественными, но и качественными. Данная панель из трех маркеров метаболизма эндотелия может дополнить стандартные способы ранней диагностики ГЛПС и прогноза развития ее осложнений.

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ И ДИАГНОСТИКИ ПРЕЭКЛАМПСИИ ПО ПЕПТИДНОМУ ПРОФИЛЮ МОЧИ

А.Е. Бугрова^{1,2}, Н.Л. Стародубцева^{1,3}, А.С. Кононихин^{1,3}, В.А. Широкова³, М.И. Индейкина², В.В. Чаговец¹, И.А. Попов^{1,3}, К.Т. Муминова¹, З.С. Ходжаева¹, В.Е. Франкевич¹, Е.Н. Николаев^{2,3}, Г.Т. Сухих¹

¹Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова; ²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; ³Московский физико-технический институт (государственный университет), Москва, Россия

Преэклампсия (ПЭ) – мультисистемное патологическое состояние, возникающее во второй половине беременности (после 20-й недели), характеризующееся артериальной гипертензией в сочетании с протеинурией, отеками и проявлениями гетерогенной полиорганной/полисистемной дисфункции/недостаточности. Преэклампсия возникает в 2-8% беременностей и остается ведущей причиной материнской и перинатальной смертности и заболеваемости. Многообещающим объектом для протеомных исследований в области преэклампсии является моча. Стратегия анализа эндогенных пептидов в физиологических жидкостях (плазма, сыворотка, моча и др.) успешно применяется для поиска биомаркеров различных заболеваний, однако исследования изменений пептидома при ПЭ единичны. Для выявления кандидатных биомаркеров преэклампсии в пептидоме мочи нами было проведено исследование случай-контроль у женщин с подтвержденной умеренной и тяжелой преэклампсией. Хромато-масс-спектрометрический анализ изменений пептидного состава мочи при развитии преэклампсии с использованием биоинформационного подхода позволил выявить 35 пептидных биомаркеров преэклампсии: например, фрагменты альфа-1-антитрипсина (14 пептидов), альфа-цепей коллагена I и III типа (6 пептидов) и уромодулина (7 пептидов). Среди них есть как известные ранее биомаркеры, так и новые характерные для тяжелой формы преэклампсии эндогенные пептиды. Работа поддержана грантами РФФИ: 14-08-01236 А, 16-54-21011_SNF_a.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТЕОФОРМ В КЛЕТОЧНОМ ПРОТЕОМЕ ИЛИ ПЕРВОЕ УРАВНЕНИЕ ПРОТЕОМА

С.Н. Нарыжный^{1,2}, М.А. Майнскова¹, В.Г. Згода¹, А.И. Арчаков¹

¹НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва; ²Петербургский институт ядерной физики, НИЦ «Курчатовский институт», Ленинградская область, Гатчина, Россия

Клетки человека состоят из многих тысяч белковых компонентов – протеоформ, точная кооперация которых обеспечивает сложные механизмы функционирования протеома и всей клетки. Современные методы пока не позволяют получать одновременно всю картину данной кооперации, однако, как минимум, дают возможность получить общее представление о размере протеома и количественном распределении протеоформ в протеоме. С помощью двумерного электрофореза и масс-спектрометрии ESI LC-MS/MS мы провели количественный анализ присутствия различных протеоформ в клетках человека. Исследования проводили с использованием клеток гепатокарциномы (HepG2), клеток глиобластомы и печени. Кроме того мы просчитали ранее опубликованные данные по клеткам HeLa. Анализ проводили как на основе окрашивания гелей, так и масс-спектрометрии. Оказалось, что распределение количества различных протеоформ в зависимости от их процентного содержания (копийности) следует степенной функции (1) $N=14/x$, где N – число различных протеоформ, а x – процент содержания каждой протеоформы в клетке. Мы назвали уравнение (1) первым уравнением протеома. По-видимому, такой тип распределения отражает фундаментальную функциональную организацию клеточного протеома, так как имеет одинаковый вид во всех проанализированных типах клеток.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГИДРОЛИЗИРУЮЩИХ АГЕНТОВ ОРТОГОНАЛЬНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ
ДЛЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БЕЛКОВ В СЛОЖНЫХ СМЕСЯХ НА ОСНОВЕ МЕТОДА
ПЕПТИДНЫХ ОТПЕЧАТКОВ**

М.В. Иванов, И.А. Тарасова, В.Г. Згода, Л.И. Левицкий, Ю.А. Бубис, М.В. Горшков

Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН, Москва, Россия

Метод пептидных отпечатков в комбинации с хроматографическим разделением пептидов потенциально позволяет идентифицировать белки в большем динамическом диапазоне по сравнению с тандемной масс-спектрометрией. Однако, в настоящее время идентификация белков сложных смесей в масс-спектрах первого уровня является труднорешаемой задачей. В данной работе мы предлагаем метод пептидных отпечатков на основе использования гидролизующих агентов ортогональной специфичности. Эффективность метода демонстрируется на наборе *in silico* масс-спектров пептидов 2000 случайно выбранных белков человека. Теоретические оценки показали, что точности определения масс в 1 ppm и точности предсказания хроматографических времен удерживания в 3 минуты достаточно для успешной идентификации смесей подобной сложности. Подтверждение предложенного метода было получено на экспериментальных данных 48-белкового стандарта UPS, полученных на масс-спектрометре Orbitrap QExactive. Было показано, что используемый алгоритм позволяет идентифицировать 90% белков, определяемых в “классическом” анализе с применением тандемных масс-спектров.

**АУТОАНТИТЕЛА И МАРКЕРЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ/РЕГЕНЕРАЦИИ МОЗГА В ПАТОГЕНЕЗЕ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ
ТРАВМЫ У ДЕТЕЙ**

Е.Г. Сорокина, Ж.Б. Семенова, О.В. Карасева, Е.Н. Арсеньева, Л.А. Ветрилэ, В.П. Реутов, В.Г. Пинелис, Л.М. Рошаль

Научный центр здоровья детей МЗ РФ, НИИ неотложной детской хирургии и травматологии, Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва Россия

Изучение механизмов посттравматического повреждения мозга и регенерации нервной ткани при черепно-мозговой травме (ЧМТ) продолжает оставаться актуальной задачей современной медицины. Цель настоящей работы состояла в подборе маркеров мозга способных в совокупности помочь оценить тяжесть повреждения мозга и исход ЧМТ.

Учитывая роль гипоксии, воспаления и развития аутоиммунного процесса после ЧМТ в работе исследовали диагностическую значимость таких маркеров повреждения мозга как нейрон-специфическая энолаза (NSE), белок S100b, содержание аутоантител (аАТ) к рецепторам глутамата (GluRc, NR2 подтип) и аАТ к самому Glu, аАТ к S100b, а также содержание NO, нитротирозина (NT) эритропоэтина (Эпо) и мозгового нейротрофического фактора (BDNF). Все показатели определялись в динамике с 1го по 30й день после ЧМТ, а при вегетативном статусе – в течение года. Тяжесть ЧМТ оценивали в баллах по шкале комы Глазго, исход ЧМТ - по шкале исходов Глазго.

Содержание NSE и S100b увеличивалось сразу после травмы, независимо от тяжести ЧМТ. При полном восстановления неврологического статуса после ЧМТ наблюдалось быстрое снижение концентрации S100b и NSE в первые 1-2 дня после ЧМТ. Неблагоприятное течение посттравматического периода характеризовалось высокими значениями S100b, NSE, NO, NT и Эпо в крови в течение всего посттравматического периода. Максимальный уровень S100b, NSE, NO и Эпо отмечался у детей с летальным исходом ЧМТ. Сразу после ЧМТ отмечено увеличение содержания аАТ к Glu, GluRc и [NO], при этом повышение уровня аАТ к NR2 GluRc в первые сутки после ЧМТ способствовало благоприятному исходу тяжелой ЧМТ. Развитие вегетативных состояний вследствие тяжелой ЧМТ сопровождалось низкими показателями S100b и NSE, а также нарастанием уровня аАТ как к S100b, так и к аАТ к NR2 GluRc в отдаленном периоде. Легкая ЧМТ, а также тяжелая ЧМТ с полным восстановлением сопровождались более высокими значениями BDNF в 1й день с последующим снижением к 3му дню. При тяжелой ЧМТ с летальным исходом уровень BDNF в 1й день после ЧМТ оказывался наиболее низким из всех групп и в последующем продолжал снижаться. Таким образом, совокупность исследованных маркеров позволяет оценить степень вторичных повреждений мозга и прогнозировать исход ЧМТ. *Поддержано грантами РГНФ № 12-06-00943 и 15-06-10952a.*

**РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА ДЕЛЬТА-СОН ИНДУЦИРУЮЩИМ ПЕПТИДОМ
ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОМ СТАРЕНИИ ОРГАНИЗМА**

Т.И. Бондаренко¹, Д.С. Кутилин¹, И.И. Михалева² ¹Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Система регуляторных пептидов является одной из важнейших регуляторных систем организма. Регуляторные пептиды полифункциональны и плейотропны, что и определяет их важную функцию в организме. Спектр регуляторных пептидов чрезвычайно широк. Одним из них является дельта-сон индуцирующий пептид (ДСИП), имеющий следующую первичную структуру - WAGGDASGE. Изучение биологической активности ДСИП выявило уникальные регуляторные способности пептида. Интересным открытием явилось установление геропротекторной активности ДСИП. (Попович И. Г. и др., 2003). Вместе с тем, механизм геропротекторного действия этого пептида в настоящее время окончательно не известен. В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение молекулярных механизмов реализации геропротекторной активности ДСИП. Эксперимент выполнен на белых беспородных крысах-самцах в возрасте 2-24 мес. Подопытным животным ежемесячно, начиная с 2-х месячного возраста, курсами по 5 последовательных дней подкожно вводили ДСИП в дозе 100 мкг/кг массы тела животного. Для интактных 4-24 мес крыс контролем служили 2 мес. животные, для животных с введением ДСИП – интактные животные соответствующего возраста. Нами показано, что ДСИП повышает емкость антиоксидантной системы (АОС) тканей крыс на разных этапах онтогенеза через стимуляцию активности ключевых антиоксидантных ферментов (СОД, каталазы, глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионтрансферазы и глутатионредуктазы). В основе модулирующего влияния ДСИП на активность СОД и ГПО лежит его способность увеличивать экспрессию генов СОД1 и ГПО1, а также стабилизировать активность ферментов ЭТЦ митохондрий и снижать окислительную модификацию белков, липидов и ДНК в соответствующих тканях животных при физиологическом старении организма. ДСИП обладает также стабилизирующим влиянием на мембраны лизосом тканей крыс разного возраста, что может быть важной составной частью мембранопротекторного действия пептида при старении.

ПРОТЕОМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВОГО СОСТАВА ВНУТРЕННЕГО И СРЕДНЕГО СЛОЕВ АОРТЫ У БОЛЬНЫХ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

Л.И. Ковалев, Р.А. Жетишева, М.А. Ковалева, А.В. Иванов, В.Г. Наумов *Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН; НИИ кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «РКНПК» МЗ РФ, Москва, Россия*

Атеросклероз рассматривается как мультифакториальное заболевание со сложным патогенезом. Проведенное протеомное исследование подтверждает это мнение и позволяет охарактеризовать ряд белков, участвующих в этом процессе. При послойном исследовании грудного отдела аорты (интима, медиальный слой, $n=20$) в норме и при атеросклеротических изменениях было выявлено существенное отложение белковых продуктов 10 генов в зонах образования атеросклеротических бляшек в разных сочетаниях. Среди них удалось идентифицировать следующие белки: представители семейства аполипопротеинов A1, E и J, неканонические изоформы β -фибриногена и катепсина D, а также γ -фибриногена, макрофаг кэппирующего белка-1, амилоида P, фрагментов окисленного гладкомышечного трансгелина и фрагментов гаптоглобина. Кроме того, отмечено изменение электрофоретических свойств у 2-й изоформы глицеральальдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Во всех исследованных случаях регистрировалось накопление большого количества легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов. По результатам исследования иммунного статуса двумерным иммуноблоттингом у 8 больных с атеросклерозом ($n=24$) обнаружены аутоантитела к белковым продуктам 12-ти генов, в частности, к лактадгерину, проларгину и ламину A/C а также к гладкомышечному трансгелину. Известно, что первые три белка присутствуют во внутренней эластичной мембране, разделяющей интиму и медиальный слой аорты. Таким образом, появление соответствующих аутоантител может указывать на распространение деструкции в стенке аорты от интимы к медиальному слою. Данные белки можно рассматривать как перспективные маркеры для включения в систему стратификации при современной оценке степени риска атеросклероза.

БИОМАРКЕРЫ КРОВИ В РУТИННЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Л.А. Каминская¹, Л.В. Журило² *¹Уральский государственный медицинский университет; ²Многопрофильная клиника «Здоровье 365» ЗАО «Медицинские технологии», Екатеринбург, Россия*

В работе представлены данные биохимических клинических анализов. Направление выборки по результатам двухмесячных исследований связано с набором биомаркеров крови, составляющих стандартную панель - липидный спектр, С-реактивный белок (СРБ), ферменты АЛТ, АСТ, ГГТП. Составлены две наиболее многочисленные группы пациентов с полиорганной патологией, возраст (55 ± 8) лет, с основными диагнозами: I - артериальная гипертензия – 23,7%, II - хронический гастрит – 18,6%. В I группе средний уровень показателей липидограммы (ммоль/л): холестерин (6.31 ± 1.06), причем у 70% уровень холестерина выше значения 6,5. Остальные величины в интервалах референсных значений, средние значения ТГ (1.41 ± 0.73), ЛПНП (3.99 ± 0.89), ЛПВП (1.82 ± 0.23), но у 40% значения на 10- 15 % превышают верхние границы нормы. Значения индекса атерогенности (ИА) (2.54 ± 0.78) и СРБ (2.2 ± 0.3) у всех обследованных в пределах нормы. Результаты анализа II группы выявили содержание холестерина (5.73 ± 1.24), но у 40% обследованных от 6,3 до 8,5. Остальные показатели липидного обмена в пределах нормы, ИА равен (2.5 ± 1.28). О возможном нарушении липидного обмена у больных хроническим гастритом указывал (Сергеев С.М., 2005). Активность ферментов (ед/л): АСТ в пределах нормы, увеличены АЛТ (66.7 ± 3.3), ГГТП (89.3 ± 4.0), значение величины СРБ (4.58 ± 2.89), но у 50% обследованных выше нормы, что указывает на развитие воспаления. Повышенный уровень холестерина и артериальная гипертензия являются важнейшими факторами риска развития ишемической болезни сердца (Рекомендации 2007 г. по лечению артериальной гипертензии). Применение корреляционного анализа, расчет коэффициента корреляции (K) выявил высокие связи между уровнями маркерных белков, холестерина, ИА. I группа: ЛПНП/ холестерин, $K=+0.95$; ЛПНП / ИА, $K=+0.84$; имеется слабая обратная связь ЛПНП/ ЛПВП, $K= -0.22$. II группа: холестерин/ЛПНП, $K= +0.96$; холестерин/ ИА, $K=+0.71$; ТГ / ИА, $K= +0.37$; ЛПНП/ ИА, $K= +0.86$. Определение биомаркеров, характеризующих риск нарушения липидного обмена и развитие ишемической болезни сердца, имеет высокую информативность не только при обследовании больных с артериальной гипертензией, но и хроническим гастритом.

ПРОТЕОМНЫЙ ПРОФИЛЬ СИНЦИТИОТРОФОБЛАСТА ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ И ОСЛОЖНЕННОЙ ГЕСТАЦИИ

В.О. Гунько, Т.Н. Погорелова, А.А. Никашина, И.А. Аллилуев, А.В. Ларичкин

Ростовский НИИ акушерства и гинекологии, Ростов-на-Дону, Россия

Несмотря на значительный прогресс в области изучения биохимии гестационного процесса, многие вопросы патогенеза акушерской патологии остаются недостаточно выясненными. Принципиально новую информацию о ключевых аспектах формирования осложнений гестации, в том числе плацентарной недостаточности (ПН), дает использование современных медико-биологических технологий, к числу которых относится протеомный анализ. Модификация экспрессии белков плацентарной ткани может служить инициирующим фактором в цепи метаболических нарушений при ПН. Цель работы – изучение протеомного спектра синцитиотрофобласта при физиологической беременности и осложненной ПН. Фракционирование плацентарных белков проводили с помощью двумерного электрофореза в полиакриламидном геле (приборы Protein IEF Cell и Protein Ixi Multi-Cell, «Био-Рад», США). Идентификацию белков после их разделения и последующего трипсинолиза проводили методом времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) на масс-спектрометре AutoflexII («Брукер», Германия) с использованием программы «Mascot MSSearch» («Matrix Science», США) и международных баз данных (NCPI и Swiss-Prot). Полученные данные позволили выявить в синцитиотрофобласте при ПН 30 белков со сниженной экспрессией. Среди них: аннексины A2 и A4, шапероны Egr29, Hsp60, прохитинин, ингибитор диссоциации Rab, 20 S протеасома, 60S кислый рибосомальный белок, ряд митохондриальных ферментов дыхательной цепи и многие другие. Значительное уменьшение при ПН содержания белков, обладающих антиоксидантными свойствами, участвующих в различных регуляторных, трофических и транспортных процессах, может существенно нарушить метаболическую и функциональную полноценность плаценты и в целом гомеостаз в системе мать-плацента-плод. Для некоторых белков имела место обратная направленность их экспрессии: недетектированные при физиологической беременности виментин, тропомиозин, альфа-актинин, эндоплазмин, напротив, обнаружались при ПН, что, по-видимому, играет компенсаторную роль, способствуя донашиванию патологической беременности. В то же время усиление экспрессии этих протеинов не компенсирует отрицательные последствия подавления продукции большого количества мультифункциональных белков, что создает условия для развития ПН и перинатальных осложнений.

БИОХИМИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ МЕДИЦИНА

НЕИНВАЗИВНАЯ ДИАГНОСТИКА ГИПОКСИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ БИОСЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ЭЛЕКТРО- И БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

А.А. Карякин, Е.Е. Карякина *Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Неинвазивная диагностика является наиболее перспективной областью клинической диагностики, поскольку она не допускает повреждение ни стенок кровеносных сосудов, ни целостности кожных покровов. Это делает процедуру анализа нетравматичной, а также исключает риск инфицирования. Неприменимость физических (спектральных) методов для неинвазивной детекции ключевых метаболитов крови диктует необходимость использования для этой цели химического анализа. Фундаментальной проблемой применения последнего является поиск экскреторных жидкостей, концентрация ключевых метаболитов в которых коррелировала бы с их содержанием в крови. Нами установлено, что повышение концентрации лактата в крови при гипоксии вызывает соответствующее увеличение содержания лактата в поте. Однако концентрация лактата в поте в 10 раз больше, чем в крови, что делает невозможным его прямой анализ при помощи известных лактатных биосенсоров. Более того, пот содержит огромный набор пептидов, инактивирующих поверхность платины, на основе которой работают биосенсоры коммерческих лабораторных анализаторов. Для исключения отравления катализатора при анализе неразбавленного пота использовался созданный нами наилучший электрокатализатор восстановления пероксида водорода на основе берлинской лазури. Электрокатализатор также существенно улучшает аналитические характеристики биосенсоров, поскольку и по чувствительности, и по селективности превосходит обычно используемую платину на три порядка. Лактатный биосенсор с повышенной верхней границей определяемых концентраций (до 0,1 М) для анализа неразбавленного пота был разработан на основе инженерии фермента лактат оксидазы при ее иммобилизации из водно-органических сред с высоким содержанием органического растворителя [1]. Для понижения константы образования фермент-субстратного комплекса активный центр фермента экранировался отрицательно заряженным полиэлектролитом. Таким образом, создан неинвазивный монитор состояния гипоксии. *Авторы выражают благодарность РНФ за финансовую поддержку, грант № 16-13-00010.*

1. Pribil, M.M.; Laptev, G.U.; Karyakina, E.E.; Karyakin, A.A. Noninvasive Hypoxia Monitor Based on Gene-Free Engineering of Lactate Oxidase for Analysis of Undiluted Sweat. *Analytical Chemistry* 86 (2014) 5215-5219.

ТЕХНОЛОГИИ АНАЛИЗА ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА КАК ОСНОВА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ

И.Н. Дёмин *ЗАО «БиоХимМак», Москва, Россия*

Понимание метаболических процессов очень важно в современных биологических исследованиях. Изучение метаболизма и клеточной биоэнергетики становится неотъемлемой частью в ряде научных и прикладных направлений. Например, известно, что раковые клетки для получения АТФ в большей степени используют анаэробный гликолиз, чем окислительное фосфорилирование, при сердечной недостаточности клетки могут быть лучше защищены от ишемического повреждения за счёт перехода от кислородного дыхания к гликолитическим процессам. В процессе взросления и старения наблюдаются изменения в биоэнергетическом профиле клеток. Эти изменения, а также возможность их регуляции, позволяют глубже понимать основные механизмы функционирования клеток и применять новые терапевтические подходы при лечении многих заболеваний. Всего 5–10 лет назад заинтересованность в изучении биоэнергетики находилась в зачаточном состоянии. Всё потому, что митохондрии рассматривались только как фабрики для производства АТФ. И очень немногие имели представления о фундаментальной роли митохондрий в поддержании общего статуса клетки, о роли продукции АТФ в поддержании ключевых жизненных сил клетки, о ключевой роли внутренних мембран митохондрий в функционировании клеток. Сейчас глубокое внимание приковано к изучению роли митохондрий в процессах дифференцировки клеток, старения и апоптоза и ряде опасных заболеваний, таких как рак, сердечно-сосудистая недостаточность, нейродегенеративные и метаболические расстройства. Технология *Seahorse Bioscience* в настоящий момент признана золотым стандартом в изучении клеточного метаболизма и биоэнергетических процессов. Анализ проводится в формате микропланшетов на живых клетках в режиме реального времени. В каждой лунке микроплшета одновременно происходит измерение двух важнейших показателей: скорости поглощения кислорода (что позволяет характеризовать процессы митохондриального дыхания) и закисления клеточной культуральной среды протонами (что даёт представление о протекании процессов гликолиза в клетках). К тому же реализована возможность добавлять до 4-х препаратов в реакционную среду прямо во время анализа. Таким образом, в режиме реального времени можно оценить метаболический фенотип клеток и его изменение под воздействием тех или иных факторов или препаратов.

НОВЫЙ СПОСОБ ОЦЕНКИ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК С ПОМОЩЬЮ ПЦР

Р.Р. Гарифутдинов, А.А. Галимова, А.Р. Сахабутдинова, А.В. Чемерис

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

Метилирование ДНК как один из ключевых механизмов регуляции передачи наследственной информации представляет огромный интерес при исследовании молекулярных основ жизни. Известно, что метилированию подвергается преимущественно цитозин в CpG-динуклеотидах. Это позволило нам предположить о взаимосвязи данного феномена с еще одним – предпочтительностью разрушения ДНК под действием ультразвука по тем же CpG-динуклеотидным сайтам [1], тем более известно, что метилирование цитозина повышает стабильность двуцепочечной ДНК [2]. Ультразвуковая фрагментация ДНК находит применение в современных методах исследования генома, основанных на массивном параллелизме (NGS, биосенсоры). Однако применимость фрагментированной ДНК для проведения молекулярно-биологических исследований остается слабо изученной. Нами ранее было показано различие в скорости ПЦР-амплификации целевых ДНК-мишеней в зависимости от их длины и содержания CpG; так, обнаружено, что хуже амплифицируются фрагменты с большей плотностью динуклеотидов CpG, а число доступных для амплификации мишеней обратно-пропорционально числу CpG [3]. Нами на модельной

системе проведен цикл исследований по оценке с помощью ПЦР в реальном времени влияния CrG-метилирования на фрагментацию ДНК. Показаны различия в скорости фрагментации и, соответственно, в количестве доступных для амплификации ДНК-мишеней в зависимости от ряда параметров. Был разработан алгоритм для оценки статуса метилирования ДНК, который далее был успешно апробирован в экспериментах на пчеле медоносной для изучения участия некоторых генов в процессе ее онтогенеза, кастовой дифференциации и стресс-устойчивости, а также начаты работы по поиску генов-мишеней человека, потенциально ассоциированных с рядом онкозаболеваний.

1. Гроховский С.Л. Мол. биол. 2006, т. 40, № 2, с. 317-325.
2. Murchie A.L., Lilley D.M. J. Mol. Biol. 1989. V. 205. PP. 593-602.
3. Гарафутдинов Р.Р., Галимова А.А., Сахабудинова А.Р., Чемерис А.В. Мол. биол. 2016, т. 50, № 2, с. 272-278.

НОВЫЙ ПРИНЦИП БЕЗРЕАГЕНТНОЙ РЕГИСТРАЦИИ АФФИННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НА ОСНОВЕ ПОВЫШЕНИЯ ПРОВОДИМОСТИ ПРОВОДЯЩЕГО ПОЛИМЕРА

Е.А. Андреев¹, М.А. Комкова², А.А. Карякин¹

¹Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Факультет наук о материалах, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Детектирование бактерий и плесневых грибов с помощью сенсоров требует прекоцентрирование микроорганизмов для достижения необходимых пределов обнаружения. Методы прекоцентрирования делятся на три группы: первая использует заряженные поверхности (например, полилизин или полихитозан), вторая использует биораспознающие элементы, такие как антитела, аптамеры, белки (лектины), а третья основана на биомиметике. Последняя группа является наиболее перспективной в сенсорных приложениях, поскольку сочетает высокую стабильность и селективность. Фенилборная кислота часто применяется в составе сенсорных систем для детекции компонентов клеточных стенок – сахаров и оксикислот. Существенный недостаток импедиметрических и кондуктометрических (био)сенсоров на основе фенилборной кислоты – полезный и фоновый сигналы направлены на уменьшение проводимости и, тем самым, неразличимы.

В настоящей работе продемонстрирован сенсорный материал – проводящий боронат-замещенный полианилин. Связывание компонентов клеточных стенок с группой борной кислоты в полимере не требует дополнительных реагентов и временных затрат на пробоподготовку. Используется новый принцип детекции, основанный на увеличении проводимости полимера в присутствии микроорганизмов [1]. Такой принцип позволяет различать специфический и фоновый сигнал, поскольку в последнем случае проводимость всегда уменьшается. Сенсорный материал был успешно применен для детекции плесневых грибов *Penicillium chrysogenum*. Модифицированные разработанным полимером взаимопроницающие микроэлектроды продемонстрировали увеличение проводимости в присутствии плесневых грибов. Минимальное определяемое содержание составило 600 КОЕ/мл. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-13-00010) и МГУ им. М.В. Ломоносова в рамках программы «Функциональные материалы» (грант №013-05/16).

1. Electroanalysis, 27, 2015, 2055–2062.

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЕ (БИО)СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ БЕРЛИНСКОЙ ЛАЗУРИ ДЛЯ НОСИМЫХ УСТРОЙСТВ, НЕ ТРЕБУЮЩИЕ ИСТОЧНИКОВ ПИТАНИЯ

М.А. Комкова, А.А. Карякин Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Актуальной задачей современной электроаналитической химии является разработка (био)сенсоров, не требующих внешних источников питания. Такие сенсоры функционируют в энергетически автономном режиме, «включаясь» только в присутствии аналита, что перспективно для их использования в сигнализаторах и носимых устройствах.

В настоящей работе показан принцип функционирования сенсоров на основе Берлинской лазури (БЛ) без внешнего питания. БЛ является наиболее совершенным электрокатализатором восстановления H_2O_2 , а амперометрические сенсоры на ее основе востребованы как для определения непосредственно H_2O_2 (важнейшего маркера окислительного стресса), так и для создания биосенсоров на основе оксидаз [1]. Оптимальный потенциал функционирования амперометрических сенсоров на основе БЛ – около 0 В (отн. Ag/AgCl/1 М KCl). Не прибегая к внешнему источнику, задать близкий к 0 В потенциал рабочего электрода возможно, соединив его накоротко с хлоридсеребряным электродом (ХСЭ) сравнения. В настоящей работе сенсоры на основе БЛ функционируют в гальваническом режиме (рабочий электрод и ХСЭ замкнуты через амперметр). Генерируемый ток линейно зависит от концентрации H_2O_2 , а аналитические характеристики сенсоров совпадают с таковыми для идентичных сенсоров, функционирующих по трехэлектродной схеме. В работе также освещены основные закономерности функционирования самопитаемых сенсоров, показана селективность определения пероксида водорода в присутствии O_2 воздуха, рассмотрены подходы к созданию операционно стабильных сенсоров для задач определения высоких концентраций H_2O_2 и длительного мониторинга. В режиме гальванической ячейки были исследованы биосенсоры для определения глюкозы и лактата на основе БЛ и ферментов-оксидаз, иммобилизованных в полимерные матрицы. Показано, что аналитические характеристики биосенсоров с использованием и без внешнего источника питания совпадают. В работе впервые продемонстрирована возможность функционирования (био)сенсоров на основе БЛ и ХСЭ без внешнего источника питания. Показано, что использование сенсоров на основе БЛ без внешних источников питания столь же эффективно, как и с использованием потенциостата. Работа выполняется при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 16-13-00010.

ПОЛУЧЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМОГО РЕКОМБИНАНТНОГО OMPF ПОРИНА У *PSEUDOTUBERCULOSIS* ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗА

В.А. Голотин, Л.А. Балабанова, О.Ю. Портнягина, В.А. Рассказов, Ю.А. Носкова, Н.С. Буйновская, Л.В. Слепченко, О.Д. Новикова
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН; Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

Порообразующие белки, порины, являются главными компонентами структурных компонентов грамм-отрицательных бактерий. Порины обеспечивают жизнедеятельность микробной клетки путем формирования заполненных водой трансмембранных каналов для транспорта питательных веществ и продуктообмена веществ. В изолированной форме эти белки сохраняют тримерную пространственную структуру и являются нерастворимыми белками в водных растворах. Порины на-

ружной мембраны являются сильно иммуногенными компонентами и являются типичными характеристиками вида или рода микроорганизма. Кроме того, порины играют важную роль в качестве поверхностных антигенов в патогенезе инфекций. Они способствуют адгезии и инвазии бактерий и вовлечены в иммунный ответ на бактериальные клеточные структуры. Впервые OmpF порин наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* были выделены лабораторией молекулярных основ антибактериального иммунитета ТИБОХ ДВО РАН. Позднее на основе его уникальных антигенных свойств был разработан иммуноферментный метод диагностики псевдотуберкулеза. Для получения растворимых рекомбинантных аналогов нерастворимых мембранных белков с сохранения их нативных свойств является трудной практической задачей генной инженерии. Из-за осложненных белковых процессов посттрансляционной модификации в клетке-хозяине, рекомбинантные белки из нерастворимых телец включения часто не способны к полному функционированию. Поэтому целью явилось получение водорастворимой формы OmpF порина. С помощью методов генной инженерии была получена генетическая конструкция, кодирующая OmpF порин *Y. pseudotuberculosis*. Ранее разработанный метод экспрессии и среда для экспрессии МХ были взяты за основу. После проведения экспрессии, впервые был получен OmpF порин в водорастворимой форме. Рекомбинантный белок был очищен до гомогенного состояния. Для проверки его антигенных свойств был проведен иммуноферментный анализ диагностики псевдотуберкулеза, аналогичный методу, разработанному ранее для нативного OmpF порина. Для этого были проанализированы 12 образцов сыворотки крови от больных с обнаруженными антителами к нативному порину. В результате порин показал высокую эффективность обнаружения псевдотуберкулеза в сравнении с нативной формой порина.

БИОХИМИЯ И ГЕНЕТИКА СТРЕССА: МОДИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ У АТЛЕТОВ - ГЕМОСТАТИЧЕСКИЕ ГЕНЫ И КОАГУЛОМЕТРИЯ

Р.И. Жданов *Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет, Казань; Институт перспективных исследований, Московский педагогический государственный университет, Москва, Россия*

Острый психоэмоциональный стресс является триггером атеротромбоза даже у молодых студентов и преподавателей, поэтому необходимы исследования процессов стресс-индуцированной гиперкоагуляции наряду с возможностью их фармакологической коррекции и путем изменения поведения. В работе обследованы здоровые добровольцы – студенты КФУ обоего пола (всего 81, атлеты и неатлеты), у которых проводился забор венозной крови утром натощак в день экзамена или вне сессии. При стрессе нами обнаружена достоверная и значимая корреляция между значением АЧТВ и концентрацией протеина С, участвующего в регуляции активности VIII фактора (эта корреляция в норме отсутствует). При экзаменационном стрессе синтез протеина С оказался определяющей стадией плазменного звена системы гемостаза. В исследовании тромбодинамики (по Ф.И. Атауллаханову) установлена тенденция к усилению тромбообразования при экзаменационном стрессе, достигающее статистически значимых отличий у женщин, а именно, увеличение значений начальной скорости тромбообразования. Особое внимание уделяется сейчас не только определению генетических полиморфизмов, увеличивающих риск заболеваний, но и поиску факторов и механизмов, которые могут противодействовать генотипу риска, путем развития устойчивого фенотипа. Необходимо было исследовать приобретенные и врожденные механизмы функционирования вагуса. Были исследованы вариабельность сердечного ритма (высокочастотная составляющая ритма HF-HRV, индикатор активности блуждающего нерва) при ортостатической пробе (изменение позы), изменение количества тромбоцитов (PLT), среднего объема тромбоцитов (MPV) и одно-нуклеотидных SNP полиморфизмов в генах, кодирующих несколько факторов коагуляции, PAI-1 и MTNFR. Регулярные физические тренировки спортсменов косвенно (через MPV) модифицируют эффекты генетической предрасположенности некоторых гемостатических факторов (PAI-1 и MTNFR) на тонус и реактивность блуждающего нерва. Индивидуальные различия в тонусе блуждающего нерва также были связаны с полиморфизмами генов фактора 12 C46T и фактора 11 C2271T. Полученные результаты показали, что генетическая предрасположенность к коагуляции поддается изменению. Они помогут защитить у студентов от стресса и кровотечений при различных травмах, особенно у лиц с дефицитами свертывания крови.

УРОВЕНЬ КОРТИЗОЛА В КРОВИ АТЛЕТОВ И НЕАТЛЕТОВ В НОРМЕ И ПРИ СТРЕССЕ

Р.И. Жданов¹, В.Ю. Сыромятникова¹, В.Г. Двоеносов¹, И.И. Ахметов²

¹*Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет;* ²*Поволжская государственная академия физической культуры, спорта и туризма, Казань, Россия*

Физическая нагрузка, подобно другим стрессорам, является мощным активатором гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Это ведет к увеличению секреции корой надпочечников кортизола, основного катаболического гормона, который вырабатывается в ответ на стресс. В работе обследованы 97 здоровых добровольцев-студентов ПГАФКСиТ (53 спортсмена) и К(П)ФУ (44 неспортсмена) обоего пола, у которых проводился забор венозной крови утром натощак. Уровень кортизола определяли с использованием тест-системы «Стероид ИФА-кортизол» (Алкор Био). Для оценки уровня испытываемого стресса были использованы психологическая шкала тревожности Спилбергера и личностная шкала проявлений тревоги Тейлора. Достоверно более высокие величины кортизола в крови были обнаружены у студентов обоего пола, занимающихся спортом, (362,09±39,093) нмоль/л и (535,62±35,696) нмоль/л для мужчин, (275±22,216) нмоль/л и (504,8±30,205) нмоль/л для женщин. С этим соотносятся также и более высокие величины ситуационной тревожности, выявленные у студентов-спортсменов по сравнению с незанимающимися спортом (37,1±1,44 ед. и 31,9±1,38 ед., соответственно). У студентов, занимающихся и незанимающихся спортом, различий по уровню тревожности не обнаружено. Вместе с тем, достоверно более низкие величины ситуационной и личностной тревожности у студентов мужского пола не занимающихся спортом по сравнению со студентками свидетельствуют о гендерных различиях в большей склонности к переживанию психоэмоционального напряжения у последних. Это подтверждается и более высокими значениями теста Тейлора у студенток, как в норме, так и в день экзаменов. При этом у студенток отмечается более низкий уровень кортизола по сравнению со студентами юношами, что может свидетельствовать о большей чувствительности женского организма к гормонам, стимулирующим симпатические влияния на организм. В день экзаменов обнаружено повышение уровня кортизола в крови у студентов (24%) и в меньшей мере у женщин-спортсменок (11%). У мужчин, спортсменов и неспортсменов, не отмечалось достоверного повышения уровня кортизола крови в день экзаменов.

МЕЖФАЗНАЯ ТЕНЗИОМЕТРИЯ КАК ЭКСПРЕСС-МЕТОД ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ В ВЕТЕРИНАРИИ**Е.Н. Зарудная, С.Ю. Зайцев***Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, Москва, Россия*

Одним из наиболее перспективных коллоидно-химических методов, применяемых для анализа жидкостей, является метод межфазной тензиометрии (МТ) – измерение динамического поверхностного натяжения (ДПН), т. е. ПН в широком временном диапазоне. Измерение ДПН проводили на тензиометре ВРА–1Р (Sinterface Technologies), результаты которого визуализируются в виде тензиограмм – кривых зависимости ПН от времени «жизни», и определяли параметры МТ: σ_0 (ПН при $t \rightarrow 0$), σ_1 ($t=0,02$ с), σ_2 ($t=1$ с), σ_3 (ПН при $t \rightarrow \infty$); λ_0 и λ_1 – коэффициенты наклона тензиограммы в области малых и больших времен «жизни» поверхности, характеризующие скорость адсорбции поверхностно-активных компонентов к границе раздела фаз жидкость/воздух. Материалом для исследования служила сыворотка крови клинически здоровых животных разных видов (крупный рогатый скот, козы, свиньи) и возрастов, сгруппированных по 15 голов по принципу аналогов. Максимальные значения ДПН для сыворотки крови соответствуют σ_0 $71,8 \pm 0,9$ мН/м; при увеличении времени «жизни» поверхности происходит постепенное снижение ДПН до равновесного – σ_3 $56,9 \pm 1,9$ мН/м, имеющего минимальные значения у молодняка в молочный период и лактирующих животных, в крови которых отмечается наиболее высокий уровень общего белка и холестерина. Корреляционный анализ с биохимическими показателями крови выявил согласованные изменения параметров ДПН по группам животных. Отмечается достоверное влияние: триацилглицеролов – на σ_1 ($r=-0,60$) и σ_2 ($r=-0,44$); холестерина – на σ_0 ($r=-0,40$), σ_1 ($r=-0,65$), σ_2 ($r=-0,54$), λ_0 ($r=+0,67$) и λ_1 ($r=+0,84$). Белки понижают ДПН, но действие их начинается в разные периоды: альбумины как более лёгкие понижают ДПН уже при малых и средних временах ($r \leq -0,56$), общий белок и ферменты крови АсАТ и АлАТ оказывают большее влияние на средние и большие времена ($r \leq -0,69$). Мочевина и глюкоза, наоборот, выступают как поверхностно-инактивные вещества, оказывая влияние на значения σ_1 ($r \geq +0,34$) и σ_2 ($r \geq +0,45$). Наличие корреляции с биохимией и изменение значений ДПН по группам животных делают возможным использование метода МТ в качестве скринингового для исследования всего поголовья с целью своевременного выявления метаболических изменений в организме с минимальными затратами. *Исследование выполнено за счет гранта РНФ (проект №14-16-00046).*

ВЫСОКОСЕЛЕКТИВНЫЕ СИНТЕТИЧЕСКИЕ РЕЦЕПТОРЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИ(АНИЛИНБОРНЫХ КИСЛОТ) ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ САХАРОВ И ОКСИКИСЛОТ**В.Н. Никитина, Н.В. Зарянов, А.А. Карякин** *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Известно, что сахара и оксикислоты играют важную роль в метаболических процессах в организме, поэтому существует потребность создания аналитических систем для детектирования данных классов соединений для целей лабораторного клинического анализа. Повышенный интерес привлекают методы, основанные на использовании синтетических материалов. Полиолы способны селективно и обратимо связываться с фенилборными кислотами с образованием устойчивых боронатных эфиров. В данной работе нами были разработаны новые высокоселективные синтетические материалы для электрохимических сенсоров на основе проводящих полимеров аминофенилборных кислот. Полимеризацию проводящих полимеров на поверхности электродов осуществляли электрохимически. Ранее, для синтетических рецепторов на основе боронат-замещенного полианилина нами был разработан новый принцип детектирования специфических взаимодействий на фоне неспецифических [1]. Методом спектроскопии электрохимического импеданса удастся зарегистрировать обратимое увеличение проводимости чувствительного полимерного слоя на поверхности электрода в результате взаимодействия с сахарами и оксикислотами. Кроме того, путем синтеза полимеров анилинборных кислот с молекулярными отпечатками оксикислот удалось существенно улучшить аналитические характеристики разрабатываемых сенсоров на основе поли(анилинборных кислот): чувствительность и селективность к соответствующим оксикислотам увеличены в 10 раз при проведении полимеризации в присутствии молекул-темплатов по сравнению с полимерами без молекулярных отпечатков. Возможность управлять свойствами поли(анилинборных кислот), варьируя молекулы-темплаты при электрополимеризации, открывает широкие перспективы для использования сенсоров на их основе. Таким образом, селективность и чувствительность сенсоров на основе проводящих поли(анилинборных кислот) возможно увеличить благодаря выбору темплатирующих молекул при проведении электрополимеризации. *Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 16-13-00010) и МГУ им. М.В. Ломоносова в рамках программы «Функциональные материалы» (грант №013-05/16).*

1. E.A. Andreyev, M.A. Komkova, V.N. Nikitina, N.V. Zaryanov, O.G. Voronin, E.E. Karyakina, A.K. Yatsimirsky, A.A. Karyakin, Anal. Chem., 2014, 86, 11690–11695.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЕНДРИМЕРНОЙ ТОПОЛОГИИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ С ВЫСОКОЙ ЯРКОСТЬЮ**А.А. Пахомов** *Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

Флуоресцентные методы широко используются как в фундаментальных исследованиях, так и в различных тест-системах, а с недавнего времени и в медицинских устройствах для детекции патологических очагов. В качестве примеров можно привести флуоресцентное мечение клеточных структур; флуоресцентные биосенсоры pH, ферментативной активности, редокс потенциала, различных низкомолекулярных соединений; ПЦР в реальном времени; варианты иммуноферментного анализа, детекция опухолевых образований и фотодинамическая терапия с использованием порфиринов. Несмотря на то, что флуоресцентные методы являются одними из самых чувствительных, проблема увеличения яркости и фотостабильности флуоресцентных меток стоит довольно остро. Увеличение яркости зондов позволит с одной стороны детектировать процессы на более ранних стадиях, с другой стороны может перевести уровень существующих технологий на новый уровень. В данной работе для получения соединений с высокой яркостью были использованы дендримеры – сверхразветвленные химические соединения, модифицированные несколькими флуоресцентными группами. За счет увеличения количества хромофоров в одной молекуле увеличивается экстинкция соединения, если обеспечить при этом сохранение квантового выхода на достаточно высоком уровне, то можно получать флуоресцентные соединения с высокой яркостью. С использованием этого подхода нами получены соединения с яркостью на порядок выше, чем у коммерчески доступных в настоящее время соединений. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №14-13-01478).*

НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВНЫЕ БИОМАРКЕРЫ САХАРНОГО ДИАБЕТА

А.В. Соболева^{1,2,3}, Т.В. Гришина¹, В.Е. Стефанов¹, Т.Л. Каронова^{4,5}, А.А. Быстрова⁵, К. Биркемайер³, А.А. Фролов²

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет, Кафедра биохимии, Санкт-Петербург, Россия;

²Лейбниц-Институт биохимии растений, отдел биоорганической химии, Галле (Заале), Германия; ³Университет Лейпцига, факультет химии и минералогии, Институт аналитической химии, Лейпциг, Германия; ⁴Федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия; ⁵Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Гликирование – пост-трансляционная модификация белков, обусловленная взаимодействием восстанавливающих сахаров с их аминокислотными группами. При этом, конечные продукты глубокого гликирования (КПГТ, или AGEs) образуются как при окислении продуктов Амадори, так и в процессе взаимодействия высоко-реактивных карбонильных соединений (RCCs) с лизиновыми и аргининовыми остатками. Накопление AGEs играет ключевую роль в патогенезе диабетических осложнений, а индивидуальные сайты гликирования являются биомаркерами сахарного диабета 2 типа (СД 2) [1]. Для анализа таких сайтов в группах СД 2 и контроля (n=20) был выбран протеомный подход, основанный на ограниченном протеолизе белков плазмы крови трипсином, с последующим обогащением гликированных пептидов с помощью аффинной хроматографии на иммобилизованной борной кислоте и хромато-масс-спектрометрическим анализом полученных элюатов. Для сравнительного количественного анализа RCCs, карбонилы были дериватизированы 7-(диэтиламино)кумарин-3-карбоксимидом [2]. Полученные дериваты были экстрагированы из плазмы метанолом и разделены с помощью обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии и детектированы on-line с помощью ESI-LTQ-Orbitrap масс-спектрометра в режиме детекции положительно заряженных ионов. В ходе исследования было показано, что мажорные белки плазмы крови, отмеченные ранее как нечувствительные к СД 2 [3], демонстрировали статистически достоверные различия между диабетической и контрольной группами. Было выявлено 32 новых триптических пептидов со свойствами биомаркеров. Помимо этого, более 100 карбонильных соединений было идентифицировано в плазме крови человека. Количественный анализ этой группы веществ выявил достоверные различия между экспериментальной и контрольной группами. Это позволяет рассматривать ди-карбонилы в качестве потенциальных маркеров СД 2, которые могут быть использованы для ранней диагностики развития этого заболевания, контроля хода лечения и стратификации пациентов для подбора адекватной терапии в клинической практике.

1. 1. Ulrich P., Cerami A. Recent Prog. Horm. Res. 2001. V. 56, pp. 1-21. 2. Milic L., Fedorova M. Methods Mol. Biol. 2015. V. 1208, pp. 3-20. 3. Frolov A., Blüher M., Hoffmann R. Anal. Bioanal. Chem. 2014, V. 406. #24, pp. 5755-5763.

**ПЛАТФОРМА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ БИОЧИПОВ С ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
УСТОЙЧИВОСТИ БАКТЕРИЙ К БЕТА-ЛАКТАМНЫМ АНТИБИОТИКАМ**

М.Ю. Рубцова, М.М. Уляшова, Г.В. Преснова, Ю.И. Поболелова, О.В. Игнатенко, А.А. Филиппова, А.М. Егоров

Химический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Рост числа инфекционных заболеваний, вызываемых патогенными бактериями, является острой проблемой для всего мира, как развитых, так и развивающихся стран. Часто они вызываются резистентными к действию антибиотиков патогенами. В настоящее время наиболее широко применяемыми антибиотиками являются бета-лактамы, механизм действия которых заключается в ингибировании пенициллинсвязывающих белков, вследствие чего нарушается синтез клеточной стенки. Наиболее распространенным механизмом устойчивости к бета-лактамам является синтез ферментов бета-лактамаз, гидролизующих бета-лактамно-амино-кислотное кольцо антибиотика. По своей структуре и субстратной специфичности они разделяются на несколько молекулярных классов, которые далее разделяются на группы и подгруппы. Бета-лактамазы характеризуются высокой мутабельностью, что является следствием общебиологического механизма адаптации микроорганизмов к действию антибиотиков. Нами разработана платформа олигонуклеотидных биочипов с ферментативной детекцией, которая реализована на различных носителях для идентификации генетических детерминант резистентности, относящихся к наиболее распространенным генам бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) и карбапенемаз. Разработаны специальные алгоритмы высокоспецифического молекулярного дизайна олигонуклеотидных зондов для идентификации генов и позиций однонуклеотидного полиморфизма в них. Оптимизированы условия проведения мультипараметрического гибридного анализа для одновременной идентификации десяти типов бета-лактамаз и наличия мутаций в ключевых положениях генов. Тестирование биочипов проведено с использованием контрольных штаммов микроорганизмов, продуцирующих гены известных бета-лактамаз, охарактеризованных методами секвенирования и ПЦР в реальном времени. Далее биочипы были апробированы с использованием клинических штаммов *Enterobacteriaceae* - продуцентов БЛРС, а также штаммов *Pseudomonas* spp. и *Acinetobacter* spp., продуцирующих карбапенемазы различных классов. Метод идентификации генов бета-лактамаз на биочипах характеризуется высокой чувствительностью и производительностью. Он может быть использован в клинических микробиологических лабораториях и для изучения эпидемиологии бета-лактамаз. Работа выполнялась при финансовой поддержке РНФ (Проект № 15-14-00014).

ПРОТЕОМНЫЙ ПОИСК МАРКЕРОВ ПАТОГЕНЕЗА ЭНДОГЕННЫХ ПСИХИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ

Л.П. Смирнова¹, Л.В. Логинова¹, Е.М. Дмитриева¹, А.А. Серёгин¹, А.В. Семке¹, В.Г. Згода², С.А. Иванова¹

¹НИИ психического здоровья, Томск; ²НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Диагностика психических расстройств осуществляется исключительно по клиническим проявлениям болезни. До сих пор не удавалось обнаружить биохимического дефекта, специфичного для какого-либо эндогенного психоза. В настоящее время активно развиваются новые подходы к диагностике психических заболеваний и поиску биомаркеров этих расстройств, использующие достижения и методы протеомики. Сыворотка крови человека содержит патологически измененные белки, отражающие общую картину патогенетических процессов, протекающих в организме. Белковый спектр сыворотки крови был проанализирован у 30 человек с диагнозом параноидная шизофрения, у 12 – биполярное аффективное расстройство (БАР), у 10 человек с диагнозом острое психотическое полиморфное расстройство (ОППР) и 20 психически и соматически здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с исследуемыми группами. Подготовка образцов включала: очистку сыворотки от мажорных белков с помощью аффинной хроматографии, разделение белков с помощью 1-D электрофореза, трип-

синализ белков в геле с последующей экстракцией. Идентификация белков осуществлялась на масс-спектрометре LTQ Velos (Thermo Scientific). Количественная масс-спектрометрия с использованием синтетических стандартов проводилась на приборе QQQ TSQ Vantage (Thermo Scientific). Наличие идентифицированных белков в образцах было подтверждено методами ИФА и Вестерн-блоттинга на системе Trans-Blot Turbo (BioRad). В результате работы в сыворотке крови пациентов с БАР были выявлены белки, не встречающиеся в других группах: белок 12, содержащий анкириновые повторы, z-1 субъединица глутаматного NMDA-рецептора и три разновидности мутантного транстирета. У больных шизофренией выявлена экспрессия белка метаболитного глутаматного рецептора, цинк-связывающего белка, ядерного клеточно-специфичного эпителиального гаптоидного белка и гамма актина. Для больных ОППР характерны: белок мутантного трансферрина; В-фактор пропердина, последовательность 5 из патента WO0250290 и последовательность 3 из патента WO2005054292. В дальнейшем, на основе этих белков, возможно создание первой лабораторной диагностической модели эндогенных психических расстройств. *Работа поддержана грантом РФФИ № 14-15-00480 «Поиск ключевых биомаркеров патогенеза социально значимых эндогенных психических расстройств».*

ПРОТОКОЛ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ микроРНК ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

Е.А. Лехнов, И.А. Запорожченко, Е.С. Морозкин, О.Е. Брызгунова, В.В. Власов, П.П. Лактионов
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

МикроРНК являются перспективными маркерами различных заболеваний, мониторинга терапии, рецидивов опухолей и прогноза заболевания. Упаковка микроРНК в экзосомы и в белково-липопротеиновые комплексы обуславливает их стабильность в биологических жидкостях и затрудняет выделение. Известно, что традиционные протоколы для выделения внеклеточных РНК являются дорогостоящими, трудоемкими или содержат в своем составе опасные химические реагенты. Для выделения микроРНК мы предлагаем протокол, основанный на денатурации микроРНК-содержащих комплексов, осаждении белков при помощи гуанидин тиоцианата и октановой кислоты (Gu/OcA протокол) с последующей очисткой микроРНК на микроколонках Биосилика. Материалы и методы К образцу плазмы крови или мочи последовательно добавляли 1% 2-меркаптоэтанол, 0.3–1.35 М гуанидин тиоцианат (Gu), 0.8 М ацетат натрия pH 4.0–6.0 и 0.5–2.5% октановую кислоту (приведены конечные концентрации). Смесь перемешивали, инкубировали 3 мин., добавляли равный объем этанола и наносили на колонку Биосилика. Колонку дважды промывали буферами для промывки, элюировали и переосаждали микроРНК с гликогеном. Препараты РНК анализировали с использованием капиллярного электрофореза (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, США). Эффективность выделения микроРНК из плазмы крови и мочи оценивали, сравнивая фенол-хлороформную экстракцию, miRCURY Kit – Biofluids (Exiqon) и протокол, предложенный в работе (Запорожченко, 2015). Для оценки эффективности выделения определяли концентрации miR-16 и miR-126 при помощи qRT-PCR. Результаты. Электрофоретический анализ препаратов РНК, полученных из плазмы крови и мочи, показал присутствие в образцах коротких РНК (10–50 Nt). При выделении miR-16 и miR-126 из плазмы крови, протокол Gu/OcA оказался в 7,21 и 1.43 раза эффективнее, чем экстракция фенол-хлороформом и в 1,65 и 2.85 раза эффективнее, чем miRCURY Biofluids соответственно. При выделении miR-16 из мочи, протокол Gu/OcA превзошел экстракцию фенол-хлороформом в 2,29 раз и эффективность выделения при помощи набора miRCURY Biofluids в 142 раза. Таким образом, протокол Gu/OcA позволяет быстро и эффективно выделять микроРНК из плазмы крови и, особенно из мочи.

БИОКАТОД С ДВОЙНОЙ ФУНКЦИЕЙ НАКОПЛЕНИЯ И ГЕНЕРАЦИИ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ЭНЕРГИИ

Ю.М. Парунова, С.О. Бушнев, С.В. Шлеев, А.В. Липкин *НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия*

Разработка миниатюрных автономных биоэлектронных устройств, работающих во внутренних средах животных и человека, является одним из популярных направлений исследований биоэлектроники. В недавних работах была разработана концепция создания сохраняющих заряд топливных элементов – самозаряжающихся суперконденсаторов – функционирующих как в непрерывном, так и в импульсном режимах на основе (био)электродов с двойной функцией генерации и накопления электроэнергии [1]. Был разработан потенциально имплантируемый биокатод с двойной функцией генерации и накопления электроэнергии на основе нанобиокомпозитного материала многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ)/полианилин (ПАНИ)/катодный редокс фермент и исследованы особенности его функционирования в фосфатном буферном растворе pH 7.4, а также в фосфатном буферном растворе, содержащем редокс активные компоненты крови. При создании биоэлектродов ПАНИ, благодаря высокой электропроводности, обратимости редокс процессов, а также электростатическим характеристикам поверхности, использовался для обеспечения эффективного электронного переноса между редокс ферментом и электродом. Энергогенерирующая компонента представляет собой иммобилизованный на поверхности композита фермент билирубиноксидазу из гриба *Murothecium verrucaria* (MvBOx), эффективность функционирования которой в имплантируемом режиме была показана в ранее опубликованных работах [2].

1. D. Pankratov, Z. Blum, S. Shleev. Hybrid electric power biodevices. *ChemElectroChem*, 2014, 1, 1798.
2. Andoralov V., Falk M., Suyatin D.B., Granmo M., Sotres J., Ludwig R., Popov V.O., Schouenborg J., Blum Z., Shleev S. *Sci. Rep.* 2013. V. 3. 3270.

РНК-АПТАМЕРЫ КАК ОСНОВА ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ АПТАСЕНСОРОВ НА ХАРАКТЕРНЫЕ ДЛЯ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА АУТОАНТИТЕЛА

М.А. Воробьева¹, В.В. Тимошенко¹, В.В. Красицкая^{1,2}, А.С. Давыдова¹, М.Р. Кабилов¹, Г.А. Невинский¹, Л.А. Франк², А.Г. Веньямина¹ *¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск;*
²Институт биофизики СО РАН, Красноярск, Россия

Рассеянный склероз (РС) – хроническое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание аутоиммунной природы. Диагностика РС представляет собой сложную задачу и требует анализа клинических и лабораторных данных, а также результатов МРТ. Один из характерных признаков РС – появление в организме аутоантител к основному белку миелина (ОБМ), обладающих протеолитической активностью. Нами был предложен новый подход к диагностике РС, основанный на использовании 2'-фтор-РНК-аптамеров, специфично узнающих эти аутоантитела. Методом селекции *in vitro* на IgG-антитела к ОБМ из крови больных РС с последующим секвенированием обогащенных библиотек была получена серия аптамерных

последовательностей-кандидатов. Исследование аффинности и специфичности их связывания с аутоантителами позволило выбрать наиболее эффективные варианты. Минимизация их нуклеотидных последовательностей привела к получению 57-звенного и 26-звенного аптамеров. Было показано, что данные аптамеры способны специфично и высокоаффинно узнавать анти-ОБМ аутоантитела как в модельных системах, так и в образцах суммарных IgG из крови пациентов с РС. Созданные 2'-фтор-РНК-аптамеры были использованы в качестве узнающих элементов при конструировании биолюминесцентных апта-сенсоров, содержащих в качестве репортерной группы фотопротеин обелин. Были созданы различные варианты аптасенсоров, в которых аптамеры играли роль первичных компонентов, улавливающих аналит, либо вторичных компонентов, несущих репортерную группу. Показана возможность высокочувствительной специфической детекции аутоантител-мишеней с использованием таких сенсоров. Предложен новый подход к созданию аптасенсоров на основе бифункциональных РНК-аптамеров, объединяющих в своем составе аптамерные модули со сродством к анти-ОБМ аутоантителам и к обелину. С этой целью были получены и охарактеризованы новые 2'-фтор-РНК-аптамеры, способные связывать обелин. Полученные результаты позволяют рассматривать созданные РНК-аптамеры и аптасенсоры как перспективную основу для разработки новых средств лабораторной диагностики РС. *Работа поддержана грантами РФФИ № 14-04-01611 (получение аптамеров к аутоантителам) и РНФ № 16-14-10296 (получение аптамеров к обелину и бифункциональных РНК-аптамеров).*

ПРОСТАГЛАНДИН E2 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МАРКЕР В УРОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Д.М. Никулина, В.М. Мирошников, П.А. Иванов, А.С. Адилов, Д.А. Зорин

Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России, Астрахань, Россия

Простагландин E2 (ПгЕ2) – представитель большой группы биологически активных производных полиненасыщенных жирных кислот, синтезируемых почти во всех органах и тканях. Это короткоживущие вещества с периодом полураспада некоторых из них в секундах, что обуславливает реализацию эффектов Пг, главным образом, в месте синтеза. Несмотря на то, что открытие Пг связано с функцией предстательной железы (ПЖ), они мало изучены при заболеваниях мужской репродуктивной системы. Мы начали изучение роли ПгЕ2 в диагностике и оценке эффективности лечения заболеваний ПЖ 10 лет назад. Позже возникла цель установить воспроизводимость результатов лабораторных исследований в зависимости от внешних факторов. ПгЕ2 определяли с ИФА наборами (R & D Systems) в 230 образцах биологических жидкостей (сыворотка крови - 113 и секрет простаты - 93) больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ), раком предстательной железы (РПЖ), хроническим простатитом (ХП) и мужским бесплодием (МП), а также в 24 образцах донорской крови. Установлено, что концентрация ПгЕ2 в крови при всех заболеваниях ПЖ отличается от значений в группе здоровых мужчин. Наиболее интересным оказался факт снижения концентрации ПгЕ2 в крови больных ДГПЖ и РПЖ по сравнению с донорами в среднем в 2-3 раза (соответственно 1100-1300 и 400-500 пг/мл). Уровень ПгЕ2 при опухолях простаты снижается больше, чем при воспалении. Его концентрация в секрете простаты при РПЖ возрастает до 50000 пг/мл, при ДГПЖ только до 30000 пг/мл. Разнонаправленные изменения концентрации ПгЕ2 в крови и секрете простаты позволяют рассчитать коэффициент для клинической оценки результатов. По окончании комплексного лечения отмечено снижение уровня ПгЕ2 в секрете простаты. Результаты, аналогичные данным при ХП, получены и для мужского бесплодия. Закономерности синтеза ПгЕ2 в измененной ПЖ и его секреции в биологические жидкости могут быть использованы для дифференциальной диагностики РПЖ с ХП. То, что концентрация ПгЕ2 в секрете простаты выше, чем в крови, позволяет сделать вывод о возможности использования теста на ПгЕ2 для неинвазивной диагностики заболеваний мужской половой сферы. Основным препятствием к этому является нестабильность лабораторных реагентов для иммуноферментного анализа из-за высокой химической активности ПгЕ2.

ДИАГНОСТИКА ЛЕГОЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА БЕЛКОВОГО СОСТАВА КОНДЕНСАТА ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА МЕТОДАМИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ

К.Ю. Федорченко^{1,2}, А.М. Рябоконь^{1,2}, М.А. Аксенова², Т.С. Широковских², С.И. Митрофанов², А.С. Кононихин¹, Э.Х. Анаев³, Е.Н. Николаев¹, С.Д. Варфоломеев¹ ¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; ²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова; ³НИИ пульмонологии ФМБА, Москва, Россия

Исследование конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) – неинвазивный метод мониторинга состояния дыхательной системы. Сбор пробы КВВ может быть осуществлен даже для очень тяжелых пациентов и повторен через короткие интервалы времени. Исследование КВВ имеет большие перспективы для скрининговых программ, направленных на раннюю диагностику заболеваний легких. В настоящее время отсутствуют системные сравнительные исследования изменения белкового состава КВВ в зависимости от состояния дыхательной системы в норме и при различных заболеваниях. В нашей работе мы собрали и проанализировали КВВ здоровых некурящих доноров, здоровых курильщиков, больных с диагнозами внебольничная пневмония, хроническая обструктивная болезнь легких, рак легкого. Для группы с диагнозом рак легкого было проведено сравнение результатов анализа белкового состава КВВ с имеющимися в литературе данными по белковому составу опухолевой ткани легкого, полученными с помощью 2D-электрофореза, и данными по экспрессии генов в опухолевой ткани легкого, полученными с помощью микрочипирования. В исследовании приняли участие 106 человек. Мы показали, что анализ белкового состава КВВ позволяет разделить все группы между собой и для каждой группы можно выделить специфический пул белков, характерных для данного состояния дыхательной системы. При сравнении группы белков, характерных для КВВ больных с диагнозом рак легкого, с опубликованными массивами данных по экспрессии генов в опухолевой ткани было найдено 36 пересечений (10 гистонов, 12 иммуноглобулинов, 11 кератинов, альбумин, остеокальцин и цинк-альфа2-гликопротеин). При аналогичном сравнении с опубликованными данными по белковому составу опухолевой ткани также найдены пересечения: DPYSL5 и лактоферрин. Интересно, что эти белки были ранее выделены нами в диагностическую панель рака легкого для КВВ, состоящую из двух десятков белков. Еще одним интересным результатом работы стало обнаружение в КВВ двух больных с диагнозом пневмония белков из предложенной диагностической панели, а при дальнейшем их обследовании в ГКБ№57 г. Москвы у них был подтвержден рак легкого и им был поставлен диагноз параканкрозная пневмония. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-04-05168 А.*

ГЕНОМЫ БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ СОДЕРЖАТ ПОВЫШЕННОЕ КОЛИЧЕСТВО КОПИЙ РИБОСОМНЫХ ГЕНОВ И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

И.В. Честков¹, Н.Н. Вейко¹, Е.С. Ершова¹, В.Е. Голиббет², Е.М. Жесткова³, О.С. Брусов², Н.А. Ляпунова¹, С.В. Костюк¹ ¹Медико-генетический научный центр; ²Научный центр психического здоровья; ³Психиатрическая больница № 14 ДЗ Москвы, Москва, Россия

В геноме человека несколько сотен копий генов рРНК (рДНК) организованы в повторяющиеся кластеры, расположенные в ядрышкообразующих регионах на коротких плечах акроцентрических хромосом. В последнее время появляются данные о том, что снижение или увеличение копий рДНК оказывает влияние на такие клеточные процессы, как организация и структура гетерохроматина, глобальная экспрессия генов и ответ на повреждение ДНК. Эти процессы, в свою очередь, могут затем способствовать старению, развитию рака и различных заболеваний (Diesch et al., 2014). Используя полногеномное секвенирование нового поколения, Gibbons с соавторами показали обратную зависимость между дозой рДНК и копийностью митохондриальной ДНК (Gibbons et al., 2014). Ранее методом гибридизации было показано, что геномы больных шизофренией содержат увеличенное количество копий рДНК (Veiko et al., 2003). Можно предположить, что увеличенное число копий рДНК в геномах больных ассоциировано со сниженным числом копий мтДНК, что может вносить вклад в развитие некоторых форм шизофрении. С целью проверки этого предположения мы определили число копий рДНК и мтДНК в ДНК, выделенной из клеток крови больных шизофренией (N=60) и здоровых доноров (N=60). Число копий рДНК и мтДНК определяли двумя способами: (1) qRT-PCR; (2) гибридизация на мембранах с нерадиоактивными мечеными ДНК зондами. Для калибровки использовали образцы ДНК с известным числом копий анализируемых повторов. Число копий рДНК в геномах больных было достоверно выше, чем в геномах здоровых доноров (соответственно 509±190 против 402±148; p=0.002). Число копий мтДНК также было выше в геномах больных (752±471 против 360±237; p<0.00001). Была обнаружена положительная корреляция между числом копий рДНК и числом копий мтДНК в геномах больных шизофренией (k=0.62, p<0.0001). В геномах здоровых доноров число копий рДНК не зависит от числа копий мтДНК (k=0.22, p=0.08). Заключение. Не подтверждена ранее описанная (Gibbons et al., 2014) отрицательная корреляция между числом копий рДНК и мтДНК в геноме человека. Число копий рДНК и мтДНК увеличено в ДНК клеток крови больных шизофренией.

СУПЕРСТАБИЛЬНЫЙ ЭЛЕКТРОКАТАЛИЗАТОР ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА КАК ОСНОВА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО БИОСЕНСОРА

Е.В. Карпова, А.А. Карякин *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Берлинская лазурь (БЛ) является наиболее высокоэффективным низкопотенциальным трансдьюсером пероксида водорода [1]. Возможности ее применения для конструирования высокоэффективных биосенсоров для клинической диагностики были продемонстрированы нашей научной группой [2]. Низкая операционная стабильность – единственный, но существенный недостаток, ограничивающий возможности применения БЛ в электроанализе. В качестве стабилизирующего покрытия может быть использовано более стабильное механически и химически соединение, изоструктурное БЛ, но не обладающее электроактивностью по отношению к H_2O_2 – гексацианоферрат никеля ($Ni^{II}CF_6$). Наиболее стабильный сенсор был получен при послойном осаждении (5 бислоев) БЛ и $Ni^{II}CF_6$. Стабилизированная БЛ при этом уступала по чувствительности немодифицированной. В данной работе был получен высокостабильный сенсор для определения пероксида водорода на основе одного бислоя, состоящего из каталитического покрытия БЛ и стабилизирующего покрытия $Ni^{II}CF_6$. Данный сенсор показывает такую же высокую операционную стабильность, как и разработанный ранее сенсор [3]: в режиме непрерывного мониторинга 1 мМ H_2O_2 первоначальный отклик сохраняется в течение около 80 минут. Чувствительность анализа ($0,34 \pm 0,02$ А·М⁻¹·см⁻²) в результате стабилизации электрокаталитического покрытия несколько понижается в сравнении с БЛ; диапазон определяемых концентраций (1×10^{-7} – 1×10^{-3} М) остается прежним. Полученное сенсорное покрытие может выступать как трансдьюсер при создании биосенсоров для определения двух важнейших метаболитов в организме человека – глюкозы и лактата. Кроме того, с помощью разработанного сенсора кинетическим методом можно измерять концентрации глюкозы и лактата в образцах со сложной матрицей (например, пот) и образцах, содержащих пероксид водорода (например, конденсат выдыхаемого воздуха), присутствие которого делает невозможным использование биосенсоров. Таким образом, данные сенсоры могут быть использованы в целях развития неинвазивной диагностики. *Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант 16-13-00010).*

1. Karyakin A.A., et al. *Angew. Chem.*, 2007 (46), p. 7678-7680.
2. Pribil M.M. et al. *Anal. Chem.*, 2014 (86), p. 5215-5219.
3. Sitnikova N.A. et al. *Anal. Chem.*, 2011 (83), p. 2359-2363.

НЕФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СЕНСОР НА ОСНОВЕ БОРОНАТ-ЗАМЕЩЕННЫХ ПОЛИАНИЛИНОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ЛАКТАТА В ПОТЕ В ЦЕЛЯХ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Н.В. Зарянов, В.Н. Никитина, А.А. Карякин *Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Определение лактата в крови имеет важное значение в спортивной медицине для контроля степени тренированности спортсменов. Однако последнее время все больший интерес уделяется неинвазивным методам диагностики, поскольку в этом случае при анализе исключается риск заражения и травматизм. Например, было показано, что увеличение содержания лактата в поте коррелирует с увеличением содержания лактата в крови [Sakharov D.A. et al., 2014]. Известные на сегодняшний день методы детекции ключевых метаболитов человека, основанные, как правило, на использовании биоматериала, обладают рядом серьезных недостатков. В связи с этим исследовательский интерес вызывает поиск новых высокочувствительных, селективных и экспрессных методов анализа. Настоящая работа посвящена созданию безреагентного ферментативного сенсора для определения лактата в поте.

В основе работы сенсора лежит способность борных групп связываться с соединениями, содержащими диольные фрагменты. Регистрация взаимодействия боронат-замещенного полимера, синтезированного на поверхности электродов, с полиолами осуществлялась методом спектроскопии электрохимического импеданса. При этом фиксировалось относительное изменение сопротивления полимерной пленки в присутствии определяемого соединения. Для увеличения чувствительности и селективности определения лактата разработана методика электрохимического синтеза боронат-замещенного полианилина

в присутствии темплатирующих агентов (фторид-ион, лактат-ион). Новые сенсорные материалы с молекулярными отпечатками (поли-3-АФБК) характеризуются повышенными константами связывания лактатом по сравнению с полимером, синтезированным в отсутствие темплата (поли-2-АФБК).

Таблица 1. Константы связывания (M^{-1}) полимеров с полиолами
[Andreyev E.A. et al., 2014; Nikitina V.N. et al., 2015]

	Поли-2-АФБК	Поли-3-АФБК с темплатирующим агентом	
		Фторид-ион	Лактат-ион
Глюкоза, pH 6	2.5±1.5	12±3	4,5±1,8
Лактат, pH 6	19±4	32±6	150±20

Разработанный импедиметрический сенсор был также адаптирован для детекции лактата в поте. Полученные значения концентрации лактата в поте (в диапазоне 10–50 мМ) с учетом погрешности совпадают со значениями, полученными методом сравнения. Авторы благодарят РФФИ (грант №16-13-00010) за финансовую поддержку.

БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОНДЕНСАТА ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА КАК ИНСТРУМЕНТ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Д.В. Вохмянина, С.В. Никулина, Е.Е. Карякина, А.А. Карякин

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Количество пациентов, страдающих от сахарного диабета, почти достигло 350 млн человек и продолжает увеличиваться. Диабет неизлечим, но проявление его осложнений можно отсрочить при постоянном контроле над концентрацией глюкозы в крови. В настоящее время это достигается за счет применения глюкометров – персональных приборов, анализирующих концентрацию глюкозы в микрообъеме отбираемой пробы. Но появление неинвазивного способа контроля над концентрацией глюкозы могло бы значительно улучшить качество жизни пациентов. В качестве такого способа можно использовать определение глюкозы в экскреторной жидкости, при условии, что концентрация глюкозы в крови и исследуемой жидкости будут коррелировать. В данной работе в качестве объекта анализа предлагается использовать конденсат выдыхаемого воздуха (КВВ). Для определения концентрации глюкозы в КВВ предложено использовать метод, основанный на амперометрическом измерении скорости гомогенной реакции окисления глюкозы под действием глюкозооксидазы в режиме постоянного перемешивания. В качестве рабочего электрода используется сенсор на пероксид водорода на основе планарного электрода, модифицированного берлинской лазурью. Аналитическим сигналом являлась начальная скорость реакции, пропорциональная тангенсу угла наклона кривой накопления продукта ферментативной реакции – пероксида водорода. Установлено, что глюкоза в матрице КВВ расходуется при комнатной температуре. Тем не менее, этот процесс можно полностью подавить, если осуществлять сбор конденсата в пробирку, содержащую хлорамфеникол. В пробах конденсата, собранных с использованием хлорамфеникола у здоровых доноров, обнаружена глюкоза в концентрации около 5 мкМ – в 1000 раз ниже, чем в крови. Для установления корреляции между изменениями концентрации глюкозы в крови и КВВ использовали глюкозотолерантный тест. Отбор проб крови и КВВ осуществляли до и через 50 минут после того, как доноры принимали 75 г глюкозы перорально. Наблюдается увеличение концентрации глюкозы в крови и КВВ у доноров, коэффициент корреляции данных величин составил 0,71. Таким образом, показана возможность использования КВВ как замены крови для неинвазивного определения концентрации глюкозы в организме пациентов. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 16-13-00010).

БЕЛКОВЫЙ БИОЧИП ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ СЕПСИСА И СИСТЕМНОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ

С.А. Клотченко¹, Е.В. Воробьев¹, М.А. Плотникова¹, А.В. Васин^{1,2}

¹НИИ гриппа МЗ РФ; ²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Системная воспалительная реакция организма (SIRS), в том числе сепсис, является одной из ведущих причин смертности в отделениях интенсивной терапии некоронарного профиля и занимает при этом 10 место среди всех причин смертности населения. Современные методы диагностики SIRS зачастую основаны на клинических и лабораторных симптомах и/или биохимических показателях. Однако клиническая картина SIRS и сепсиса весьма разнообразна и в некоторых случаях вообще может не иметь специфических симптомов, что затрудняет постановку диагноза и негативно влияет на качество проводимой терапии. Целью данной работы является разработка биочипа, позволяющего диагностировать SIRS и сепсис на различных стадиях путем количественного определения белковых биомаркеров в крови человека. Ни один из биомаркеров, предлагаемых в настоящее время для лабораторного подтверждения диагноза SIRS, не является одновременно достаточно чувствительным и специфичным. Для адекватной диагностики SIRS и контроля проводимой терапии необходим комплексный мониторинг клеточных факторов, вовлеченных в его патогенез. Предложенный белковый микрочип, работающий по принципу сэндвич-метода ИФА, позволяет одновременно количественно выявлять несколько белков в одном биологическом образце, что делает эту технологию особенно перспективной для диагностики SIRS. В качестве предполагаемых биомаркеров были выбраны С-реактивный белок, прокальцитонин, липополисахарид-связывающий белок, липокалин-2, TGF- β 1, TNF- α , антагонист рецептора IL-1 и интерлейкины -6, -8, -10, -18. Предлагаемые маркеры обладают сравнительно высокой специфичностью, надежностью и позволяют дифференцировать SIRS неинфекционного и инфекционного генеза. Ключевым этапом, определяющим точность и воспроизводимость количественного анализа с использованием биочипа, является определение условий иммобилизации антител. При выполнении работы была разработана методика получения аминосилановой поверхности чипа, оптимизирована сорбция антител на биочип посредством глутарового альдегида и последующая блокировка активных связывающих центров подложки. Для валидации разработанной диагностической тест-системы с использованием лабораторного образца биочипа планируется исследовать парные сыворотки от пациентов с клинически подтвержденным диагнозом SIRS/сепсис на разных стадиях.

ИММУНО-ПЦР ДЛЯ СВЕРХЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ДЕТЕКЦИИ АНТИГЕНОВ И АНТИТЕЛ

Д.Ю. Рязанцев, А.А. Стахеев, С.К. Завриев

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Метод иммуно-ПЦР (иПЦР), предложенный Сано с соавторами в 1992 г., является сверхчувствительным методом детекции, который по своим принципам и схеме аналогичен иммуоферментному анализу (ИФА), однако в качестве метки в иПЦР используется конъюгат антител с молекулой ДНК, а не с ферментом. Детекция сигнала осуществляется с помощью метода количественной ПЦР с праймерами, специфичными к ДНК-метке. Так как чувствительность метода ПЦР достигает одиночных копий ДНК на образец, иПЦР обладает сверхвысокой чувствительностью и дает возможность работать с небольшим количеством или высокими разведениями образца. Одним из ключевых моментов иПЦР, является выбор модели конъюгации ДНК-метки и антитела. Мы использовали комплексы, формируемые из одноцепочечных ДНК (60 нт), биотинилированных с 5'- и 3'-концов и стрептавидина. Использование подобных супермолекулярных комплексов позволяет усилить специфический сигнал за счет того, что на одну молекулу детектирующего антитела приходится десятки и сотни молекул маркерной ДНК. Кроме того, данная система является универсальной.

Нами проведена работа по количественному определению уровня холерного токсина и токсинов золотистого стафилококка (токсин тканевого шока – TSST и токсин А – SEA). Анализ проводили в формате «сэндвич». Чувствительность анализа при детекции токсина в фосфатном буфере составила для SEA – 100 фг/мл, TSST – 1 пг/мл и холерного эндотоксина – 10 пг/мл, при этом превышение по чувствительности над методом ИФА составляет 5000, 500 и 30 раз, соответственно. При детекции токсинов стафилококков в культуральной жидкости чувствительность составила 10 пг/мл. При количественном определении уровня природных IgM антител к дисахариду LeC чувствительность составила 4 нг/мл (в работе использовали сыворотки, разведенные в 500 раз). Показано, что концентрация антител была выше ($p \leq 0,0005$) в сыворотках крови здоровых доноров ($n=45$; $31,3 \pm 4,3$ мкг/мл) по сравнению с сыворотками больных с диагностированным РМЖ ($n=38$; $17,0 \pm 4,1$ мкг/мл). Также нами проведены исследования по оптимизации метода иПЦР для выявления общих IgE антител в сыворотках больных аллергией к клещам домашней пыли. Было четко продемонстрировано снижение порогового цикла ПЦР при анализе образцов сывороток больных аллергией по сравнению с сыворотками здоровых доноров. В дальнейшем нами планируется адаптация предлагаемого подхода для определения аллерген-специфических IgE в сыворотках, и создание на его основе соответствующих диагностикумов. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 16-14-00136 и стипендии Президента РФ СП-4413.2015.4.*

АЭРОГЕЛИ КАК СРЕДСТВА ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Н.В. Меньшутина *Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия*

Создание новых систем доставки – это возможность получать лекарственные препараты с усиленным терапевтическим эффектом и максимальной безопасностью, что позволяет разрабатывать новые лекарственные формы на основе известных активных фармацевтических ингредиентов (АФИ). Для труднорастворимых АФИ, а также АФИ с низкой биодоступностью крайне важно найти вспомогательные вещества или матрицы-носители, увеличивающие растворимость и биодоступность. На сегодняшний день известны типы матриц-носителей как дендримеры, липосомы, мицеллы. В настоящее время большой интерес представляет такой инновационный материал как аэрогель. Аэрогели – это материалы с высокоразвитой пористой структурой, высокими значениями внутренней удельной поверхности (Суд от 300 м²/г до 1000 м²/г) и низкой плотностью. Получают аэрогели в среде сверхкритических флюидов. Средний размер пор для разных типов аэрогелей колеблется от 3 нм до 30 нм. Исследовались аэрогели различных типов: неорганические на основе оксида кремния и органические, разрешенные фармакопейными статьями. Были получены аэрогелевые матрицы различной природы (на основе альгината натрия, хитозана, пектина, крахмала, желатина и белков), изучались свойства получаемых материалов. Органические аэрогели имеют менее развитую площадь внутренней поверхности (300–700 м²/г), чем кремниевые (800–1000 м²/г), и больший средний диаметр пор: органические – 30 нм, неорганические – 10 нм. Кроме того, были получены аэрогели на основе полимолочной кислоты, а также гибридные аэрогели на основе альгината натрия, которые получали добавлением различных полимеров: Карбопол 940, Карбопол 974, Эудрагит, Плюроник. Было установлено, что аэрогелевые матрицы-носители – нейтральные (не воздействуют на человеческий организм и не искажают действия АФИ). Органические аэрогели являются биоразлагаемыми.

Было протестировано два способа внедрения АФИ в аэрогелевые матрицы: внедрение на стадии золь-гель процесса и внедрение путем адсорбции в среде сверхкритических флюидов (СКФ), что применимо только для растворимых в СКФ веществ. В качестве АФИ использовались такие вещества как: нимесулид, кетопрофен, ибупрофен, лоратадин, артемизинин, рифабутин. Установлено, что в аэрогелевые матрицы может быть адсорбировано от 20–60% АФИ. Анализировалось фазовое состояние АФИ в аэрогеле. Было определено, что вещество находится в аморфном состоянии. Специальные расчеты с использованием таких методов, как SASA (Solvent Accessible Surface Area) и расчета Ван-дер-Ваальсова объема молекулы, показали, что коэффициент заполнения внутренней поверхности аэрогеля АФИ не превышает единицы. Композиция аэрогель-АФИ тестировалась на растворимость, биодоступность. Было установлено, что растворимость и биодоступность композиций выше, чем кристаллического АФИ. *Работа поддержана в рамках базовой части госзадания при финансовой поддержке министерства образования и науки.*

РАЗРАБОТКА ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ КОМПЛЕКСНОГО ДЕЙСТВИЯ НА ПРОТЕАСОМЫ

Н.П. Шарова¹, Т.М. Астахова¹, А.В. Морозов², М.И. Михайловская¹, Н.И. Чупкиова¹, Р.Р. Сафаров

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН; ²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Со времени обнаружения протеасом – события, отмеченного в 2004 г. Нобелевской премией, открылась новая эра в разработке противоопухолевых лекарств. Интерес к протеасомам обусловлен их участием в регуляции множественных клеточных процессов, в том числе в злокачественных опухолях. В настоящее время во многих странах используется противоопухолевое лекарство Велкейд, созданное на основе бортезомиба, конкурентного ингибитора активностей протеасом. Велкейд применяется, главным образом, для лечения множественной миеломы, для которой он наиболее эффективен. Вместе с тем Велкейд оказывает сильное токсическое действие на организм, поэтому срок его применения строго ограничен даже в случае

эффективного воздействия на опухоль. Незвизирая на негативный опыт использования Велкейда, предпринимаются попытки синтезировать все новые и новые лекарственные соединения, ингибирующие активности протеасом. Можно ожидать, что эти соединения будут проявлять побочные токсические эффекты, подобные эффектам Велкейда. Нами предложен новый подход к разработке противоопухолевых препаратов, действующих на протеасомы. Этот подход основан на использовании бортезомиба в низких дозах совместно с витамином К3, который сам по себе нарушает функции активатора РА700 протеасом *in vivo*. Оказалось, что при совместном действии эти соединения оказывают синергетический сенсibiliзирующий эффект на активность протеасом *in vitro* и на опухолевые клетки *in vitro* и *in vivo*. Доклинические испытания двух композиций, созданных на основе витамина К3 и низких доз бортезомиба, показали, что они проявляют эффект, превышающий эффект Велкейда в 1,5–2 раза (или соизмеримый с ним) по отношению к опухолям молочной железы, печени, легких. Вместе с тем, токсичность этих композиций по показателю ЛД50 была в 4–12 раз ниже по сравнению с Велкейдом. Полученные результаты диктуют необходимость проведения клинических испытаний разработанных противоопухолевых композиций. *Работа поддержана ФЦП (госконтракт №12411.1008799.13.175).*

ОСОБЕННОСТИ ПРОИЗВОДСТВА ГЛИКОПРОТЕИНОВ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Ю.А. Серегин, Н.В. Лобанова, Е.В. Воронина, И.Р. Яхин, И.Н. Трусова, Н.А. Романова, В.М. Колышкин
ООО «Фармапарк», Москва, Россия

Среди биотехнологических препаратов, представляющих интерес для современной медицины, большая часть является гликопротеинами. К этой группе относятся моноклональные антитела, гормоны, факторы коагуляции и другие белки. Их производство возможно только в клетках млекопитающих, обеспечивающих правильный профиль гликозилирования. Наиболее часто используются суспензионные клетки яичников китайского хомячка (СНО), хорошо изученные и приспособленные для культивирования в биореакторах разных типов. Наиболее важной характеристикой большинства гликопротеинов является их профиль гликозилирования, т. е. совокупность характеристик, связанных с составом олигосахаридов, присоединенных к полипептидной цепи. Профиль достаточно сложен, и только часть из его характеристик способна влиять на биологические свойства каждого конкретного белка. Например, для эритропоэтина и его аналогов важно содержание сиаловых кислот, для антител – фукозы и галактозы, и т. д. Соответственно, для получения белкового препарата с хорошей биологической активностью необходимо достижение заданного профиля гликозилирования. В докладе представлены собственные и литературные данные по успешным способам оптимизации гликозилирования, включая целевой выбор клонов, состав питательных сред и добавок, параметры процессов культивирования.

Собственные данные основаны на разработке технологий производства 4 биоподобных препаратов разного происхождения, включая 2 гормона и 2 моноклональных антитела. Во всех случаях за счет выбора условий культивирования удалось достичь профиля гликоформ, соответствующего оригинальному препарату. Препараты, произведенные по разработанным технологиям, успешно прошли доклинические и частично клинические исследования, по результатам которых они не отличаются от оригинаторов.

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН

И.В. Красильников, С.В. Петровский, В.П. Трухин

Санкт-Петербургский институт вакцин и сывороток ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Появление новых штаммов вируса гриппа, вызвавших панику среди населения в странах Юго-Западного региона и ожидание пандемии гриппа, привели к пересмотру научным сообществом отношения к гриппозной инфекции и опасности, связанной с ее распространением. Начались интенсивные исследования новых путей для создания профилактических препаратов, прежде всего вакцин нового поколения. К этому времени было создано несколько платформ для получения вирусных антигенов в виде вирусоподобных частиц (ВПЧ). Прежде всего, были задействованы платформы, позволяющие получать рекомбинантные белки вирусов гриппа, которые в результате самосборки, образовывали вирусоподобные частицы уже в процессе биологического синтеза. Одна из таких платформ была предложена компанией Protein Sciences, США. Эта платформа связана с системой экспрессии генов в клетках насекомых, вектором служат бакуловирусы. Система позволяет, в частности, получать антигены сезонного и пандемического вируса гриппа. Бакуловирусовая система позволяет экспрессировать неслайсированные гены, а особенности структуры капсидной оболочки бакуловирусов позволяют упаковывать в нее очень большие гены. Основным преимуществом платформы, по данным её разработчиков, является её универсальность для производства рекомбинантного белка, что делает возможным производство широкого спектра профилактических и терапевтических вакцин для человека и животных. Примером такого препарата является гриппозная вакцина Flublok. Новая технология позволяет быстро и в больших количествах нарабатывать рекомбинантный белок гемагглютинина, нейраминидазы и мембранного белка М, что особенно важно в случае возникновения пандемии. В настоящее время гриппозные вакцины, произведенные на базе системы бакуловируса, прошли сертификацию в FDA и одобрены к производству в США. Оригинальная платформа была разработана компанией MEDICAGO (Канада) на базе растений табачного ряда. Антигены вируса гриппа интегрировались в геном агробактерии, которая использовалась для заражения листьев растения. Особенности процессов синтеза гриппозных антигенов в листьях способствовали сборке и «отпочковыванию» вируса от мембран клеток листьев растения и выхода в межмембранное пространство, а оригинальная схема выделения ВПЧ из сока листьев растения позволила получать вакцинные препараты, которые характеризовались высокой иммуногенностью. Из 1 кг сока листьев удалось выделить около 1,5 г. гемагглютинина. Данная платформа также применяется в настоящее время для производства пре-пандемических и сезонных вакцин против гриппа. Компания Lentigen (США) разработала платформу на основе лентивирусов, которая позволяет интегрировать гены вирусных белков в геном клеток животных и человека. Данная платформа позволила получить гриппозную вакцину в виде ВПЧ против штамма гриппа H1N1 в течение трех месяцев с момента секвенирования генома этого штамма. Данная платформа позволяет непрерывно синтезировать вирус гриппа клетками, который ежедневно накапливается в культуральной среде, с последующей очисткой и формулированием. В нашей стране разработана платформа на основе гриппозного вектора, позволяющая синтезировать отдельные вирусные антигены в культуре клеток млекопитающих.

О НЕОБХОДИМОСТИ СОЗДАНИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ ОТРАСЛЕВОЙ БАЗЫ ЗНАНИЙ ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОХИМИИ

В.М. Колышкин¹, С.А. Богатиков², С.Н. Марченко² ¹Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов; ²НПО «Микроген» МЗ России, Москва, Россия

Создание новых препаратов превратилось из творческой деятельности отдельных исследователей в промышленный процесс. Сегодня можно говорить о том, что разработка новых препаратов является не просто частью биофармацевтического бизнеса, а в значительной степени именно отдельной индустрией, для которой фармацевтический бизнес служит одним из заказчиков. Индустрия создания медикаментов представляет собой неоднородную среду, состоящую из огромного количества компаний, которые с каждым годом становятся более структурированными. Осознание необходимости узкой специализации приходит ко многим участникам рынка. Они считают, что в настоящее время специализация является объективной необходимостью из-за огромного объема накопленной первичной информации. Создание национальной отраслевой базы знаний поможет биофармацевтической отрасли повысить качество процессов разработки и вывести на новый уровень экономическую отдачу для акционеров компаний. При ФГУП ГосНИИгенетики работает инициативная группа, которая занимается следующими вопросами:

- Технологией поиска и анализа информации в масштабах интернета и средствами анализа текста – извлечение содержательной информации из колоссальных объемов данных по исследованиям, маркетингу и лечению пациентов.
- Структурированием полученной информации – организации информации, в результате которой элементы связываются по смыслу в целостную группу или несколько таких групп.
- Хранением данных – организации хранения огромных объемов отраслевых данных и управление ими.

В настоящее время существует безотлагательная потребность в эффективном применении накопленных знаний на практике. Биологические науки подошли к тому «порогу» в своем развитии, когда количество накопленной информации должно перейти в новое качество.

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ИЗОФОРМ IgA, ШИРОКОСПЕЦИФИЧНЫХ К РАЗЛИЧНЫМ ПОДТИПАМ ВИРУСА ГРИППА А

В.В. Аргентова¹, Т.К. Алиев¹, В.А. Топорова¹, И.Г. Дементьева³, Л.П. Позднякова³, М.Н. Боков³, Д.А. Долгих², П.Г. Свешников³, М.П. Кирпичников¹ ¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова РАН; ³Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва, Россия

Получение рекомбинантных антител, специфичных к гемагглютиниnam разных подтипов вируса гриппа А (ВГА), является перспективным подходом в профилактике и терапии вирусной инфекции. При мукозальном применении значительный интерес вызывает возможность использования рекомбинантных антител в формате иммуноглобулина А, наиболее представительного класса антител на слизистых оболочках человека. Иммуноглобулины класса А присутствуют в различных изоформах (мономер, димер, секреторная форма) и в зависимости от структуры способны задействовать различные механизмы нейтрализации вируса. В данной работе были получены и исследованы рекомбинантные антитела IgA-изотипа, содержащие вариабельные домены широкоспецифичного человеческого антитела FI6. Были клонированы константные домены тяжелой цепи иммуноглобулина А IgA1 и IgA2m1-изотипов и проведена сборка генов рекомбинантных антител в составе бипромоторного вектора для эукариотической экспрессии. Получены клеточные линии СНО - продуценты мономерных форм рекомбинантных антител IgA1 и IgA2m1-изотипов. На их основе в результате дополнительной трансфекции экспрессионной плазмидой, содержащей J-цепь, получены продуценты димерных форм рекомбинантных антител IgA1 и IgA2m1-изотипов. Иммунохимический анализ мономеров и димеров IgA в отношении различных штаммов ВГА H₁N₁ и H₃N₂ подтипов показал, что все рекомбинантные изоформы распознают 10 реликтовых и актуальных штаммов ВГА в непрямом ИФА и направлены против консервативного эпитопа, расположенного на фрагментах гемагглютинина HA0 и HA1. Константы диссоциации комплекса антиген-антитело всех полученных изоформ не превышают 4 нМ. Аффинность исследованных антител по отношению к штаммам подтипа H₁N₁ выше, чем по отношению к штаммам подтипа H₃N₂. Работа выполнена с использованием средств субсидии (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI60714X0060).

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ЛИПОСОМЫ С ЛИПОФИЛЬНЫМИ ПРОЛЕКАРСТВАМИ

Е.Л. Водовозова Институт биоорганической химии им. М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Включение противоопухолевых препаратов в состав наноразмерных носителей, в том числе липосом, позволяет уменьшить общую токсичность и повысить эффективность лечения за счет уменьшения концентрации свободного лекарства в кровотоке и явления пассивного транспорта носителей в опухоли. В лаборатории химии липидов ИБХ РАН разрабатывается способ получения липосомальных препаратов путем включения липофильных пролекарств в липидный бислой. Синтезированы пролекарства ряда известных химиотерапевтических агентов. Доставка лекарств в опухолевые клетки в виде липофильных пролекарств в мембране липосом дает ряд преимуществ по сравнению с инкапсулированием во внутренний водный объем носителя: уменьшается утечка препарата в процессе циркуляции липосом в кровотоке и при взаимодействии с клеткой; изменяется механизм проникновения лекарства в клетку и его внутриклеточный трафик, что повышает потенциал преодоления множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток; упрощается технология получения наноразмерных липосом с эффективной концентрацией лекарства. В докладе рассмотрены принципы построения молекул липофильных пролекарств, способ получения липосомальных препаратов длительного хранения. Показана эффективность предлагаемого подхода на примерах улучшения терапевтических свойств лекарств на моделях экспериментальных животных с раком молочных желез, раком легких, лимфолейкозами. С целью увеличения селективности действия (таргетная терапия) получены липосомы, несущие молекулярный адрес углеводной природы (тетрасахарид SiaLeX) для доставки к ангиогенному эндотелию опухоли. Установлено селективное действие SiaLeX-липосом на активированные эндотелиальные клетки. Показан антиваскулярный эффект цитотоксических SiaLeX-липосом, который приводил к усилению торможения роста карциномы легкого Льюиса, по сравнению с лечением липосомами без адреса. Визуализировано связывание SiaLeX-липосом с микрососудами опухоли и накопление безадресных липосом в опухолевой ткани за счет экстравазации.

ПЛАЗМИДНЫЕ ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ ГЕНА EEF1A КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ СНО

И.И. Воробьев, Н.А. Орлова, С.В. Ковнир, Ю.А. Ходак, А.Г. Габиров, К.Г. Скрябин

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Промышленно используемые клеточные линии-продуценты терапевтических белков должны обладать максимально возможной удельной продуктивностью и постоянством удельной продуктивности на протяжении 60–90 дней последовательного культивирования. Известные плазмидные векторы на основе вирусных или минимальных промоторов не всегда позволяют получить линии клеток млекопитающих с требуемыми свойствами. Ранее нами был разработан вектор p1.1, содержащий нетранслируемые участки гена фактора элонгации трансляции 1а китайского хомячка (EEF1A), фрагмент конкатемера концевой повтора вируса Эпштейна–Барр и селекционный маркер - дигидрофолатредуктазу. С помощью p1.1 был получен продуцент фактора свертываемости крови VIII с удельной продуктивностью более 10 мкМЕ/клетка/день и постоянным уровнем секреции. Для ко-трансфекции нескольких генов были получены производные вектора с различными селекционными маркерами. При помощи комбинации трех таких векторов была создана линия-продуцент фактора свертывания крови IX с удельной продуктивностью 2,1 мкМЕ/клетка/день и долей неактивной формы фактора IX менее 3%. Для создания продуцентов гетеродимерных белков применен трицистронный вектор, в котором открытые рамки считывания целевых генов объединены интактным внутренним сайтом связывания рибосом вируса энцефаломиокардита. Получена клональная линия-продуцент фолликулостимулирующего гормона человека с удельной продуктивностью 12 пг/клетка/день, секретирующая преимущественно корректную гетеродимерную форму гормона. Плазмидный вектор p1.1 и его производные пригодны для быстрого получения высокопродуктивных линий клеток млекопитающих, секретирующих белки различных типов.

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ХИМЕРНОГО БЕЛКА НА ОСНОВЕ ТРЕТЬЕГО ДОМЕНА БЕЛКА E ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА И ПОРИНА OmpF YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS

Н.С. Воробьева, А.М. Стенкова, Л.А. Давыдова, А.Н. Мазейка, О.Ю. Портнягина, Э.Я. Костецкий, Н.М. Санина

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

Несмотря на нарастающее распространение вируса клещевого энцефалита в Дальневосточном и Сибирском федеральных округах России, до сих пор используются классические инактивированные вакцины, обладающие побочными эффектами и требующие длительного времени для иммунизации. Поэтому создание эффективной и безопасной вакцины для защиты от вируса клещевого энцефалита крайне необходимо для преодоления глобального экономического ущерба от этого заболевания (Šmit, Postma, 2014). Разработка нового поколения вакцин связана с использованием высокоочищенных субъединичных антигенов, способных повысить безопасность и протективность вакцин, получить высокоспецифичный иммунный ответ к бактериальным и вирусным патогенам. Конструирование рекомбинантных, химерных антигенов на их основе является перспективным направлением в иммунологии. Нами были получены генно-инженерные конструкции на основе экспрессионных векторов *E. coli* для экспрессии химерного белка, состоящего из неспецифического порина OmpF *Y. pseudotuberculosis* и третьего домена белка E вируса клещевого энцефалита. Полученные конструкции не содержали мутаций и были пригодны для дальнейшей работы. В результате проведения экспериментов по оптимизации экспрессии химерного белка была выбрана следующая схема получения химеры в препаративных количествах: концентрация индуктора (ИПТГ) – 0,1 mM, наращивание клеток в «богатой» среде 2×YT, время индукции – 2 часа. Для исследования иммуногенности химерного белкового антигена, был проведен ряд экспериментов по иммунизации инбредных мышей линии Balb/c. В результате была выбрана наиболее эффективная доза введения химерного антигена (20 мкг/мышь), приводившая к повышению уровня антител против химерного белка по сравнению с интактным контролем в 1,7 раза и двукратная схема иммунизации (в 1-й и 14-й дни) при продолжительности эксперимента 28 дней. Применение в качестве адьюванта тубулярных иммуностимулирующих комплексов привело к повышению уровня антител против химерного белка в 4–7 раз по сравнению с животными, иммунизированными антигеном в чистом виде. *Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант N15-15-00035).*

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ МОДЕЛИ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ МЕДЬСОДЕРЖАЩИХ ФЕРМЕНТОВ КАК НОВЫЙ КЛАСС ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

А.Г. Мажуга, Е.К. Белоглазкина, О.О. Красновская, Н.В. Зык, М.Э. Зверева, М.П. Рубцова, Д.А. Скворцов, О.А. Донцова

Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Исследование противоопухолевой активности координационных соединений переходных металлов является ключевой задачей современной медицинской химии и онкологии. Доля металлосодержащих препаратов (прежде всего препараты платины) в клинической онкологии составляет 15%, не смотря на ряд побочных эффектов (нефротоксичность и др.) для некоторых типов опухолей использование препаратов платины является единственным вариантом. Среди других металлов медь – важный микроэлемент, который играет центральную роль в биохимии и физиологии каждого живого организма [Exр Toxicol Pathol. 2010, 62(5), 577–82]. Медь является одним из наиболее важных металлов, присутствующих в организме в следовых количествах. Медь необходима для нормальной клеточной активности в качестве кофактора во многих ферментах. Среди металлоферментов большую роль играют медьсодержащие ферменты, причем атом меди в их активном центре связан с такими донорными атомами, как азот (гистидин), сера (метионин и цистеин) и иногда с атомом кислорода (тирозин). Биологическая роль медьсодержащих ферментов связана со следующими процессами: 1) перенос электронов; 2) связывание, хранение и транспорт кислорода; 3) окислительный катализ; 4) восстановление оксида азота на последней стадии круговорота азота. В связи с тем, что медь является эндогенным металлом, предполагается, что комплексы на ее основе будут менее токсичными. Было показано, что свойства координационных соединений меди сильно зависят от природы лигандов и типов донорных атомов, координирующих ион металла. С этой целью в настоящее время активно исследуются комплексы меди, обладающие цитотоксической активностью, в условиях *in vitro* и *in vivo*.

В настоящей работе нами впервые был получен новый класс координационных соединений меди (II, I), содержащих производные 2-тиогидантоина. Была показана каталитическая активность координационных соединений. Проведено биологиче-

ское исследование координационных соединений: определена цитотоксичность на панели клеточных линий, исследовано взаимодействие с ДНК оперирующими ферментами, изучен процесс проникновения координационных соединений в клетки. В докладе приведены данные противоопухолевого эффекта *in vivo*.

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ IMR-32 ПОД ДЕЙСТВИЕМ СЕЛАНКА И ОЛАНЗАПИНА

Т.А. Коломин¹, Е.В. Филатова¹, А.П. Волкова¹, М.И. Шадрина¹, Е.Ю. Рыбалкина², Г.В. Павлова², С.А. Лимборская¹, Н.Ф. Мясоедов¹, П.А. Сломинский¹ ¹*Институт молекулярной генетики РАН;* ²*Институт биологии гена РАН, Москва, Россия*

Регуляторный пептид селанк является перспективной альтернативой транквилизаторам благодаря практически полному отсутствию побочных эффектов. Сходство клинического действия селанка и препаратов бензодиазепинового ряда позволяет предположить, что в основе механизма действия пептида лежит его способность модулировать работу ГАМКергической системы. Для проверки гипотезы о возможном действии селанка через ГАМКА-рецепторы было проведено изучение изменений экспрессии 84 генов, вовлечённых в процессы нейрорецепции и нейротрансмиссии, под влиянием селанка в культуре клеток нейробластомы IMR-32. Для выявления эффектов, связанных с активацией ГАМК-А рецепторов, проведён анализ изменения экспрессии исследуемых генов в ответ на действие основного лиганда ГАМКА-рецепторов – ГАМК, а также атипичного бензодиазепина – оланзапина, обладающего выраженным сродством к 5-HT₂ рецепторам. После инкубации клеток с ГАМК наблюдается изменение экспрессии 14 генов, при этом большая часть (11 генов) характеризуется падением уровня мРНК. Инкубация с оланзапином привела к изменению экспрессии 25 генов, при этом для 21 гена было показано снижение уровня мРНК, особенно выраженное для генов CSF2, FOS и JUNB. Под действием селанка не было выявлено изменений уровня мРНК исследуемых генов. Это может быть связано с тем, что пептид не оказывает непосредственного действия на ГАМКА-рецепторы, представленные в культуре клеток IMR-32, из-за состава входящих в данные рецепторы субъединиц. Совместное действие селанка и ГАМК приводит к практически полному подавлению изменений экспрессии генов, наблюдаемых после инкубации клеток непосредственно с ГАМК. В то же время, при применении селанка совместно с оланзапином наблюдается изменение экспрессии большего количества генов, чем после инкубации клеток непосредственно с оланзапином, а изменения уровня мРНК становятся более выраженными. Это позволяет предположить, что селанк способен влиять на сродство эндогенного лиганда, гамма-аминомасляной кислоты, к ГАМКА-рецепторам и усиливает действие оланзапина, который в данной культуре клеток, по всей видимости, непосредственно взаимодействует с ГАМКА-рецептором и влияет на функционирование ГАМКергической системы. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-00320.*

ВЛИЯНИЕ СЕЛАНКА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ С ФУНКЦИОНИРОВАНИЕМ ГАМК-ЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

А.П. Волкова, М.И. Шадрина, Т.А. Коломин, Л.А. Андреева, С.А. Лимборская, Н.Ф. Мясоедов, П.А. Сломинский
Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Синтетический аналог природного иммуномодулятора тафцина селанк оказывает на организм воздействие, сходное с действием классических противотревожных препаратов бензодиазепинового ряда, которые являются аллостерическими модуляторами ГАМКА-рецепторов и способны усиливать тормозящее действие гамма-аминомасляной кислоты. Это позволяет предположить, что молекулярный механизм действия селанка может быть обусловлен его способностью оказывать влияние на ГАМК-рецепторы. Для проверки этой гипотезы мы провели оценку изменения уровня мРНК 84 генов, кодирующих основные субъединицы рецепторов ГАМК, переносчики и ионные каналы, участвующие в транспорте ГАМК, а также другие белки, вовлечённые в процессы нейрорецепции и передачи сигналов в нервных клетках, в лобной коре крыс спустя 1 и 3 часа после введения селанка и ГАМК. В ходе сравнения действия селанка и ГАМК на экспрессию исследуемых генов мы обнаружили, что спустя 1 час после введения исследуемых соединений наблюдаются изменения уровня мРНК 45 генов, а спустя 3 часа – 22 генов. При этом после введения исследуемых соединений наблюдалось снижение уровня мРНК большей части генов, изменивших уровень мРНК через 1 час, тогда как практически для всех генов, изменивших экспрессию спустя 3 часа, был отмечен рост уровня мРНК. Кроме того, нами была выявлена положительная корреляция между изменениями экспрессии генов через 1 час после введения селанка и после введения ГАМК. Таким образом, было показано, что селанк вызывает целый ряд изменений в экспрессии генов, вовлечённых в процессы нейрорецепции и передачи сигналов в нервных клетках. Полученные данные указывают на то, что для селанка, как и других пептидных препаратов, характерно комплексное воздействие на нервные клетки. Один из его возможных молекулярных механизмов связан с аллостерической модуляцией работы ГАМКергической системы. *Работа проводилась при поддержке гранта РФФИ № 16-15-00238.*

ЛИПИДОПОСРЕДОВАННОЕ МОДУЛИРОВАНИЕ ИОННЫХ КАНАЛОВ, ФОРМИРУЕМЫХ АНТИМИКРОБНЫМИ ПЕПТИДАМИ В МОДЕЛЬНЫХ МЕМБРАНАХ

О.С. Остроумова, С.С. Ефимова, В.В. Малев, Л.В. Щагина *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

Антимикробное действие широкого круга пептидов связано с порообразованием в мембранах клеток-мишеней. Выявление механизмов модулирования образуемых пептидами пор является одной из ключевых проблем современной фармакологии. Особое значение имеют регуляторные пути, опосредованные липидами мембраны, поскольку именно они определяют специфичность действия антимикробных пептидов. Целью работы являлось установление молекулярных механизмов влияния физико-химических свойств модельных липидных мембран на каналообразующую активность антимикробных липопептидов бактериального происхождения, сирингомицина Е и сурфактина, а также антибактериальных пептидов насекомых, цекропинов. Установлено, что одним из ключевых факторов, модулирующих активность тестируемых пептидов, является дипольный потенциал мембран. Его уменьшение с помощью введения специфических веществ, называемых дипольными модификаторами, сопровождается ростом каналообразующей активности сирингомицина Е и падением активности сурфактина и цекропинов. Выявлено, что за наблюдаемые эффекты ответственны заряд-дипольные и диполь-дипольные взаимодействия между антимикробными пептидами и липидами мембраны. В дополнение обнаружено, что фазовая сегрегация компо-

нентов мембраны приводит к неоднородному распределению дипольного потенциала в латеральном направлении и, тем самым, обуславливает различия в характеристиках ионных каналов, встроенных в упорядоченные и неупорядоченные липидные домены. В ходе работы обнаружен синергизм действия антимикробных пептидов и некоторых дипольных модификаторов, который целесообразно учитывать при разработке оптимальных условий их применения в фармакологических целях. Выявлено, что другим критическим фактором регуляции каналообразующей активности антимикробных агентов является распределение латеральной компоненты давления вдоль нормали к плоскости мембраны. Такой механизм регуляции наблюдается для пор, геометрические характеристики которых в открытом и закрытом состоянии существенно различаются. В частности, показано, что увеличение кривизны липидных монослоев сопровождается ростом числа открытых сирингомидиновых пор. *Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (№14-14-00565), Российского фонда фундаментальных исследований (№ 15-34-20356) и ФАНО РФ.*

РАЗРАБОТКА БИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АГЕНТОВ НА ОСНОВЕ АНАЛОГОВ ЛАКТАПТИНА

Е.В. Кулигина, А.А. Немудрая, А.А. Макарецова, Г.А. Степанов, А.А. Нуштаева, О.А. Коваль, В.А. Рихтер

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Одно из ключевых направлений развития современной фармакологии – создание лекарственных средств, воздействующих непосредственно на очаг поражения и оказывающих минимальный токсический эффект на здоровые ткани и органы. Особенно остро эта проблема стоит в случае онкологических заболеваний. Повысить противоопухолевую эффективность лекарственного средства можно конъюгируя его с опухолеспецифическими лигандами, адресующими препарат к раковым клеткам. Эффективным способом получения таких лигандов является скрининг фаговых пептидных библиотек, который проводят как *in vitro* на культурах раковых клеток, так и *in vivo* на опухолевых моделях [Немудрая А.А., Acta Naturae, 2016]. Противоопухолевый препарат Лактаптин индуцирует апоптоз раковых клеток человека в культуре и тормозит рост и метастазирование опухолей животных и человека. Однако Лактаптин, как и другие белковые терапевтические препараты, равномерно распределяется по органам и тканям организма, что снижает его противоопухолевую эффективность [Бондаренко Д.А., Биофармацевтический журнал, 2015]. Проведен скрининг фаговой пептидной библиотеки *in vitro* на культурах раковых клеток мыши и человека и *in vivo* на мышинной опухолевой модели и на опухоли молочной железы человека в модели ксенографтов. На основе последовательностей отобранных пептидов и лактаптина были получены рекомбинантные слитые белки, состоящие из лактаптина и опухолеспецифических пептидов. Проведена сравнительная оценка цитотоксической активности полученных слитых белков *in vitro* на раковых клетках и их адресности и противоопухолевой эффективности *in vivo* на опухолевых моделях. В экспериментах *in vitro* показано, что слитые белки, также как лактаптин, вызывают гибель раковых клеток по пути апоптоза, и их цитотоксическая активность не уступает цитотоксической активности лактаптина. В экспериментах *in vivo* на мышинной опухолевой модели ГА-1 показано преимущественное накопление в опухоли сульфидо-Су5 меченых слитых белков по сравнению с лактаптином. На опухоли молочной железы человека MDA-MB-231 в модели ксенографтов показано, что конъюгирование лактаптина опухолеспецифическим пептидом значительно повышает его противоопухолевую эффективность. *Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ Соглашение 14.607.21.0063 (RFMEFI60714X0063).*

СТРУКТУРНЫЕ АСПЕКТЫ АКТИВАЦИИ ПОЛИАМИНОКСИДАЗЫ ПРОИЗВОДНЫМИ АЗАФЛУОРЕНА И АНИЛИНА

С.П. Сяткин¹, Н.А. Шевкун¹, А.И. Хлебников², А.Т. Солдатенков¹, Е.В. Неборак¹, С.В. Кутяков¹, Р.И. Сокуев¹, К.Ю. Сунграпова¹

¹Российский университет дружбы народов, Москва; ²Алтайский государственный технический университет, Барнаул, Россия

Полиаминоксидаза (ПАО) участвует в биодegradации полиаминов, катализируя их окислительное дезаминирование. Цитотоксичность продуктов окисления полиаминов – иминоальдегидов рассматривают как причину апоптотической гибели клеток, поскольку они способны, в качестве карбонильных агентов, конъюгировать с белками и нуклеиновыми кислотами. Снижение активности полиаминоксидазы отмечено при гистохимическом исследовании ткани злокачественных опухолей животного и человека, в нитрозодиэтиламино- индуцированных гепатомах, у карциномы Герена, в нейробластомах и лимфомах человека и других типов рака. Катализ полиаминов путем окислительного дезаминирования практически отсутствует в опухолевых клетках. Поэтому, активаторы катаболизма полиаминов могут оказаться потенциальными противоопухолевыми агентами. Исследовали влияние производных анилина, азафлуорена, бензимидазола и диоксаторенинопиридина на уровень окислительного дезаминирования путресцина, спермидина и спермина в бесклеточной тест-системе из регенерирующей печени крыс. Активаторами катаболизма полиаминов оказались только производные азафлуорена и анилина, в частности: 1-амино-9-phenylamino-4-azofluorene, 1-амино-2-бром-4-azofluorene-9, 3-(4-iodinanilino)- 1-phenylpropanone-1, 3-(1-фенил-2-fluorinanilino)-пропанона-1. Для исследования антипролиферативной активности использовали культуру клеток рака простаты линии PC-3 в тесте на жизнеспособность с Аламар синим. Количественный корреляционный анализ системы «структура-активность» по программе ChemicDescript показал высокую степень корреляции цитотоксичности с топологическим индексом Балабана (P2=0.7), но не с индексом обхода. Докинг с активного центра ПАО, ферментом Fms1 из дрожжей, проводили с помощью компьютерной программы Molegro Virtual Docker по гибкости в торсионных углах лигандов. Позиции с наименьшим уровнем энергии для каждого соединения были описаны по энергиям взаимодействия лиганда с различными радикалами фермента. Были определены несколько важных радикалов в сфере с радиусом 12Å в активном центре ПАО.: His67, Tyr450, His191, Trp174, Gly487 Результаты формируют базу данных структур для дизайна и синтеза новых активаторов катаболизма полиаминов как потенциальные противоопухолевые агенты.

РОЛЬ TALE ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ В МЕТАБОЛИЗМЕ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ КЛЕТОК

Д.Н. Пеньков¹, А.Д. Егоров², К.Ю. Кулебякин², В.А. Ткачук^{1,2} *¹Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ; ²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Углеводный обмен составляет основу жизнедеятельности клетки. Его исследования необходимы как для всестороннего понимания клеточных процессов, так и предупреждения развития патологий, среди которых различные проявления метаболического синдрома. Несмотря на многочисленные исследования, сахарный диабет остается крупнейшей проблемой современности.

менной медицины. Его причины лежат в инсулиновой резистентности тканей, приводящей к гипергликемии, при которой происходит повреждение сосудов за счёт нерегулируемого гликирования белков и дегидратация организма. Многие сахароснижающие препараты (тиазолидиндионы, инсулин) имеют опасный побочный эффект - увеличение массы тела за счёт адипогенеза. Основу наших исследований составляют исследования транскрипционных механизмов этих процессов. Транскрипционные факторы из группы TALE являются гомеобокс-содержащими факторами и регулируют транскрипцию, связываясь с промоторами и другими регуляторными элементами в геноме клетки. К ним относятся Pterp, Pbx и Meis белки. Роль этих факторов в дифференцировке клеток хорошо доказана. В данном исследовании мы показали, что Pterp1, Meis1 и Pbx1 играют ключевую роль в адипогенной дифференцировке, являясь ее супрессорами. Их роль проявляется на самых ранних стадиях дифференцировки, что говорит о их роли в качестве "пионерных" факторов, либо факторов, изменяющих структуру хроматина сразу после индукции дифференцировки. Детальный анализ исследованных нами молекулярных механизмов показывает, что Pterp1 регулирует экспрессию целого ряда хроматин-модифицирующих генов, участвующих в адипогенной дифференцировке. Кроме того, мы показали роль фактора Pterp1 в глюконеогенезе, процессе, играющем ключевую роль в продукции глюкозы в организме. Нами было установлено, что при искусственном снижении уровня экспрессии Pterp1 чувствительность гепатоцитов к инсулину возрастает. Ранее нами также была показана роль Pterp1 в инсулиновой чувствительности других клеток. Это дает возможность предположить, что он является одним из регуляторов чувствительности клеток к инсулину. Таким образом, мы показали роль TALE факторов Pterp1 и Meis1 в чувствительности клеток к инсулину и адипогенной дифференцировке. Эти их свойства могут быть использованы для разработки новых лекарственных средств для лечения диабета.

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ РАСТЕНИЙ В БИОТЕХНОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

А.А. Замятин (мл.)^{1,2}, Н.В. Гороховец¹, Е.Ю. Зерний², В.А. Макаров¹, С.Ю. Морозов², А.И. Петушкова³, Л.В. Савватеева¹, М.В. Серебрякова², А.Г. Соловьев²

¹Институт молекулярной медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ; ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова; ³Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Нарушения процессов деградации белков могут являться причиной развития серьезных патологий у человека. Принято считать, что развитие таких патологий возможно предотвращать при помощи заместительной энзиматической терапии, основанной на применении дополнительных протеолитических ферментов. В связи с тем, что причиной патологий является неспособность деградации человека обеспечить гидролиз белков-мишеней, для обеспечения эффективной заместительной энзиматической терапии было предложено использовать протеиназы, обладающие недостающими активностями. Протеолитические ферменты, обладающие необходимыми свойствами, можно выявить у многих организмов, в том числе, у растений. В представляемой работе показано, что рекомбинантный протеолитический фермент Тритикаин-α из пшеницы (*Triticum aestivum* L) способен активироваться *in vitro* и образовывать каталитически активный фермент, проявляющий коллагеназную и глютиназную активности при кислых и нейтральных значениях pH и температуре человеческого тела. Биохимический анализ, проведенный с помощью флуорогенных пептидных субстратов, а также масс-спектрометрический анализ продуктов гидролиза, катализируемого Тритикаином-α, выявил целый ряд сайтов протеолиза, расположенных в первичных структурах коллагена, а также белков, составляющих глютен. Сайты протеолиза также обнаружены в аминокислотной последовательности 33-звенного пептида, который является продуктом гидролиза α-глиадина и инициирует воспалительные реакции у пациентов, страдающих целиакией – наиболее изученного заболевания человека, связанного с непереносимостью глютена. Также показано, что Тритикаин-α оказался относительно стабильным в условиях, моделирующих желудочный сок. Таким образом, можно заключить, что протеолитический фермент Тритикаин-α может быть использован в качестве основы (i) для создания лекарственных препаратов эффективных при терапии целиакии, (ii) для создания препаратов для местного применения при очистке ран, а также (iii) для биотехнологического использования в пищевой промышленности, в том числе, при переработке мясной продукции и при производстве продуктов, не содержащих глютен.

НОВЫЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ГЛИКОПРОТЕИНУ ВИРУСА ЭБОЛА: СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ

А.А. Панина¹, Т.К. Алиев², О.Б. Шемчукова³, И.Г. Дементьева³, В.А. Топорова¹, Н.Е. Варламов³, Л.П. Позднякова³, М.Н. Боков³, Д.А. Долгих¹, П.Г. Свешников³, М.П. Кирпичников²

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова; ³ОАО Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва, Россия

Использование вирусспецифических моноклональных антител (мАТ) для пассивной иммунизации больных, зараженных вирусом геморрагической лихорадки Эбола, обладает значительным терапевтическим потенциалом даже по истечении 24 ч после инфицирования. Наибольшей эффективности удалось добиться при одновременном применении трех антител к гликопротеину вирусного капсида.

Нами была проведена иммунизация мышей конъюгатом рекомбинантного гликопротеина вируса Эбола с белком теплового шока HSP70. В результате селекции и анализа полученных линий гибридом были отобраны 5 высокоаффинных мАТ. В результате применения различных методов иммунологического анализа (непрямой иммуноферментный анализ, иммуноблоттинг и др.) были отобраны мАТ, специфичные к индивидуальным эпитопам гликопротеина вируса Эбола: GPE118 и GPE534 IgG-изотипа и GPE325 IgM-изотипа. Из гибридомных линий, продуцирующих мАТ, была выделена тотальная РНК, на основе которой создана кДНК. С помощью специфичных праймеров амплифицированы вариabельные домены легких (VL) и тяжелых (VH) цепей антител, определена их первичная структура, установлены каркасные и гипервариabельные участки VL и VH. Для подтверждения правильности определения первичной структуры вариabельных доменов мАТ был использован метод пептидного масс-фингпринта. Аминокислотные последовательности сравнили с базой данных GenBank. Выяснилось, что VH-последовательность GPE534 на 88% гомологична последовательности антитела 14G7, распознающего выступающий линейный эпитоп муцин-подобного домена гликопротеина GP вируса Эбола и обладающего протективными свойствами. При этом различающиеся аминокислотные остатки располагаются в областях гипервариabельности, ответствен-

ных за связывание с антигеном. Аналогов аминокислотных последовательностей МАТ GPE118 и GPE325, а также VL GPE534 в базе данных не найдено. Таким образом, нами были определены уникальные структуры VL и VH высокоаффинных МАТ против гликопротеина капсида вируса Эбола. На основе VL и VH исследуемых антител с использованием константных участков человеческих иммуноглобулинов создан ряд искусственных генов, кодирующих химерные антитела в форме Fab-фрагментов и полноразмерных молекул. *Работа выполнена с использованием средств субсидии (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI60714X0096).*

НОВЫЙ МЕТОД ДЕТЕКЦИИ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НА ПОВЕРХНОСТИ ЕДИНИЧНОЙ КЛЕТКИ

В.М. Украинская¹, А.В. Степанов^{1,2}, А.А. Белогуров^{1,2} ¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Одной из важнейших мишеней современных фармакологических препаратов является система поверхностных клеточных рецепторов. Взаимодействие рецепторов с их лигандами и ко-рецепторами вовлечены в процессы передачи сигнала в клетку и являются основополагающими в жизни любой клетки. Зачастую становится практически невозможным изучить взаимодействие рецептора и его лиганда и последующей передачи сигнала путем активации рецептора в силу методических ограничений воспроизведения условий подобных взаимодействий на поверхности клетки. В связи с этим разработка новых фармакологических препаратов, действие которых направленно на функционирование рецепторов и их акцепторных доменов, требует создания эффективных скрининговых систем, максимально воспроизводящих условия биологической активности исследуемого терапевтического агента.

Для решения данной задачи нами предлагается универсальная платформа, позволяющая изучать взаимодействия рецепторов и их лигандов в формате одной клетки непосредственно на поверхности клеточной мембраны. С этой целью был получен ряд генетических конструкций, основанных на принципе создания химерных рецепторов и активации репортерных Т-клеток. В данной работе нами была доказана применимость данной системы для анализа взаимодействия рецептора с растворимым лигандом, а также лигандом, закрепленным на поверхностной мембране клетки. На примере взаимодействия варибельного домена анти-тус антитела в составе химерного рецептора и тус пептида, слитного с константным фрагментом иммуноглобулина, закрепленного мембране клетки, нами было показано, что химерный рецептор взаимодействует с тус эпитопом, что приводит к активации Т-клеток. Путем добавления лиганда во внеклеточную среду была показана применимость метода для анализа взаимодействий трансмембранно закрепленных рецепторов с растворимыми лигандами.

Полученные доказательства эффективности работы предложенной платформы позволят осуществлять широкомасштабные скрининговые исследования фармакологических препаратов на мембранах клеток *ex vivo*. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 14-24-00106 и РФФИ « 15-34-70037 мол_а_мос.*

ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ КАРБОКСИЛЭСТЕРАЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ МЫШЕЙ ФОСФОРИЛИРОВАННЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ФЛАВОНОИДА КРИЗИНА

Д.С. Прокофьева, В.В. Абзианидзе, Н.Г. Войтенко

НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Вопрос поиска новых селективных и эффективных ингибиторов карбоксилэстераз (КЭ) не теряет своей актуальности. Известно, что ферменты подкласса сериновых эстераз, к которым помимо КЭ относят ацетилхолинэстеразу (АХЭ), бутирилхолинэстеразу (БХЭ) и др., имеют сходное строение активного центра, в связи с чем одно и то же соединение способно в той или иной степени ингибировать весь подкласс ферментов. В то же время исследование фармакологически активных соединений содержащих сложноэфирные или амидные связи затруднено тем, что в сыворотке крови грызунов в отличие от людей очень велика активность КЭ. Использование новых селективных ингибиторов КЭ грызунов позволит избирательно модулировать метаболизм такого рода соединений, что существенно упростит межвидовую экстраполяцию данных. Были синтезированы 7 производных природного флавоноида кризина [1]. По результатам опытов *in vitro* рассчитаны IC_{50} соединений по отношению к коммерчески доступным препаратам АХЭ и БХЭ человека и КЭ печени свиньи и оценена селективность соединений. Также в опытах *in vitro* при использовании в качестве объекта исследования пулированной сыворотки мышей были рассчитаны значения IC_{50} соединений по отношению к КЭ и БХЭ. На основании данных *in vitro* были отобраны несколько производных кризина для исследования их влияния на активность сериновых эстераз крови мышей в опытах *in vivo* при п/к введении исследуемых соединений. В качестве вещества сравнения во всех экспериментах использовали 2-(*o*-cresyl)-4Н-1,3,2-benzodioxaphosphorin-2-oxide (CBDP), необратимый ингибитор сериновых эстераз. Установлено, что соединения Кр-1 и Кр-3 являются высокоизбирательными ингибиторами КЭ сыворотки крови мышей. Они способны полностью подавлять активность КЭ, не влияя при этом на активности БХЭ и АХЭ сыворотки крови и АХЭ эритроцитов. Для соединения Кр-1 выявлены существенные различия в действии на КЭ разных видов в опытах *in vitro*, что свидетельствует о различиях в строении активных центров этих ферментов у мышей и свиней. Химический синтез представленных соединений прост и относительно дешев, что повышает практическую значимость предложенных ингибиторов.

1. V.V. Abzianidze, D.S. Prokof'eva, and A.S. Bogachenkov. Russian Journal of General Chemistry, 2016, Vol. 86, No. 2, pp. 425–428.

ПОЛУЧЕНИЕ НАНОПЛАТФОРМ ДЛЯ ПРЕЗЕНТАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ В РЕЗУЛЬТАТЕ ТЕРМИЧЕСКОЙ ПЕРЕСТРОЙКИ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ С РАЗЛИЧНОЙ СТРУКТУРОЙ

Е.А. Трифонова, Е.К. Петрова, Е.В. Путляев, Н.А. Никитин, И.Г. Атабеков, О.В. Карпова

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия

В последнее время вирионы и вирусоподобные частицы (ВПЧ) вирусов растений рассматриваются в качестве основы для создания новых биотехнологий в медицине и ветеринарии, в том числе для получения современных безопасных вакцин, систем адресной доставки и новых диагностических препаратов. Ранее было показано, что при термической обработке папчовидного вируса табачной мозаики (ВТМ) образуются сферические частицы (СЧ), состоящие из белка оболочки. Варьируя исходную концентрацию ВТМ можно получать СЧ различного размера [1]. СЧ ВТМ обладают уникальными адсорбци-

онными свойствами и являются эффективным адъювантом [2]. Недавно была показана возможность термической перестройки X вируса картофеля (ХВК), который в отличие от ВТМ обладает более гибкой, нитевидной структурой. Образование СЧ ХВК происходит при более низкой температуре (90°C). Строгая зависимость размера СЧ ХВК от исходной концентрации вируса не была обнаружена. СЧ ХВК, как и СЧ ВТМ, обладают высокими адсорбционными свойствами и могут служить платформами для презентации функционально активных молекул [3]. Настоящая работа посвящена сравнительному изучению термической перестройки вирусов растений с различной структурой. В качестве вирусов растений со спиральным типом симметрии были выбраны вирус мозаики дольки (ВМД) и вирус штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ), а в качестве вирусов с икосаэдрическим типом симметрии – вирус мозаики цветной капусты и вирус мягкой мозаики фасоли. Изучена зависимость между температурой структурной перестройки вируса и типом капсида вириона. Показана возможность получения СЧ из вирусов со спиральным типом капсида (ВМД, ВШМЯ). Продемонстрирована зависимость размеров СЧ ВМД от исходной концентрации вируса. *Изучены адсорбционные свойства СЧ ВМД и СЧ ВШМЯ. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-34-00208 мол. а.*

1. Atabekov J., Nikitin N., Arkhipenko M., Chirkov S., Karpova O. J. Gen. Virol. 2011. V. 92. N 2. P. 453–456.
2. Karpova O., Nikitin N., Chirkov S., Trifonova E., Sheveleva A., Lazareva E. Atabekov J. J. Gen. Virol. 2012. V. 93. N 2. P. 400–407.
3. Nikitin N., Ksenofontov A., Trifonova E., Arkhipenko M., Petrova E., Kondakova O., Kirpichnikov M., Atabekov J., Dobrov E., Karpova O. FEBS Letters. 2016. doi:10.1002/1873-3468.12184.

КОНЬЮГАТЫ ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫХ ОЛИГО-2'-О-МЕТИЛРИБОНУКЛЕОТИДОВ С ВЕКТОРНЫМИ ПЕПТИДАМИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ НОВЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ ДЮШЕНА

А.А. Фокина¹, Б.П. Челобанов^{1,2}, G. McClorey³, А.А. Arzumanov⁴, M.J. Gait⁴, M.J.A. Wood⁵, Д.А. Стеценко^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия; ³Department of Physiology, Anatomy and Genetics, University of Oxford, Oxford, Великобритания; ⁴MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, Великобритания

Мышечная дистрофия Дюшена (МДД) – тяжелое генетическое заболевание, поражающее одного мальчика из примерно 3600. Болезнь возникает из-за мутаций в гене *DMD*, нарушающих биосинтез белка дистрофина – одного из важных структурных компонентов мышечной ткани. Основным подходом к лечению МДД является коррекция сплайсинга пре-мРНК дистрофина за счет пропуска мутантного экзона под действием антисмыслового олигонуклеотида. Как потенциальные терапевтические агенты для коррекции сплайсинга изучаются аналоги нуклеиновых кислот, такие как морфолиновые олигонуклеотиды (РМО), которые до недавнего времени проходили клинические испытания. Однако, клиническая эффективность РМО при системном введении невысока из-за быстрого выведения из организма и недостаточного накопления в критически важных тканях и органах, таких как диафрагма и сердечная мышца. В то же время, конъюгаты РМО с векторными пептидами, такими как Рірба [3], обладают улучшенным проникновением в мышечную ткань.

Недавно в ИХБФМ СО РАН был открыт новый класс аналогов нуклеиновых кислот – фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО), в которых природные отрицательно заряженные фосфодиэфирные группы замещены незаряженными фосфорилгуанидиновыми группами [2, 3]. Мы обнаружили ранее, что фосфорилгуанидиновые олиго-2'-О-метилрибонуклеотиды (2'-ОМе ФГО) способны вызывать пропуск экзона в культуре мышечных миобластов H2k mdx на уровне, не уступающем соответствующему РМО. В данном докладе мы показываем, что конъюгат 25-звенного антисмыслового 2'-ОМе ФГО с пептидом Рірба [1] не только обладает на порядок большей активностью в культуре клеток, чем неконъюгированный олигонуклеотид, но и способен вызывать коррекцию сплайсинга *in vivo* после однократной внутривенной инъекции мышам линии mdx. При этом активность конъюгата и накопление дистрофина были отмечены не только в скелетной мышце, но и в диафрагме и сердце. Таким образом, конъюгаты фосфорилгуанидиновых олиго-2'-О-метилрибонуклеотидов с векторными пептидами могут рассматриваться как перспективные кандидаты на роль терапевтических агентов для лечения мышечной дистрофии Дюшена. *Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №№ 15-03-06331 и 15-54-10049. Синтез фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов поддержан грантом РНФ 15-15-00121.*

1. Lehto T., Castillo Alvaraz A., Gait M. J. et al., Nucleic Acids Res., 2014, 42, 3207.
2. Купрюшкин М.С., Пышный Д.В., Стеценко Д.А. Acta Naturae, 2014, 6, 123, <http://www.actanaturae.ru/attachment.aspx?id=2059>.
3. Stetsenko D., Kupryushkin M., Pyshnyi D., заявка на патент WO2016/028187A1, приоритет от 22.08.2014.

ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛИПОСОМ, НЕСУЩИХ В БИСЛОЕ ЛИПОФИЛЬНОЕ ПРОЛЕКАРСТВО МЕЛФАЛАНА, В СЫВОРОТКЕ КРОВИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТРУКТУРЫ СТАБИЛИЗИРУЮЩЕГО КОМПОНЕНТА

Д.С. Третьякова, Е.Л. Водовозова Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Липосомы – наиболее био- и гемосовместимые системы доставки лекарств. Но в кровотоке, как и другие наночастицы, они мгновенно покрываются белками, модифицирующими поверхность. что влияет на биораспределение и фармакокинетику лекарства. Для уменьшения связывания с белками поверхность наночастиц покрывают высокогидратируемыми молекулами различной природы. В данной работе исследована стабильность в плазме крови липосом, нагруженных в бислое липофильным пролекарством противоопухолевого препарата мелфалана, в зависимости от структуры включенных в мембрану защитных амфифильных конъюгатов. Липосомы на основе яичного фосфатидилхолина (ePC) и 10% диглицеридного сложнэфирного конъюгата мелфалана, содержащие внутри раствор кальцеина в само-затухающей концентрации (80 мМ), получали методом экструзии через 100-нм поры, не включившийся кальцеин отделяли на колонке с сефадексом-G-50. В качестве защитных молекул в бислой включали фосфатидилинозит (10%), ганглиозид GM1 (2% и 10%), ПЭГ2000-фосфатидилэтаноламин (2% и 10%) и конъюгат фосфолипидов с COOH-пептидом Ac-CMG-Ad-DOPE (2% и 10%). Определяли кинетику вытекания кальцеина в ходе 24-ч инкубации липосом в 80% сыворотке крови: отбирали аликваты и измеряли интенсивность флуоресценции до и после разрушения липосом Тритоном X100. В течение 10 мин для липосом с 10% GM1 и Ac-CMG-Ad наблюдалось разгорание флуоресценции до 60 и 80% от максимальной величины, затем выход на плато. Предположительно, основной вклад во взаимодействие белков с поверхностью липосом вносят электростатические контакты: при

взаимодействии с отрицательно заряженными белками сыворотки жесткие отрицательно заряженные структуры GM1 или Ас-СМГ-Ad на поверхности мембраны должны перестраиваться за счет латеральной диффузии в жидком бислое, что повышает проницаемость мембраны. При уменьшении включения (2%) данных лигандов значимых деформаций бислоя нет, проницаемость резко падает. Фосфатидилинозит, не формирующий на поверхности жесткий каркас и имеющий меньший отрицательный заряд, в первые 5 ч проявил себя на уровне 2% GM1. Постепенное умеренное повышение проницаемости мембраны связано, очевидно, с действием ферментов. Однако быстрого разрушения липосом при контакте с белками сыворотки крови не происходит. *Работа поддержана грантом РФФИ № 16-04-01585.*

ВЛИЯНИЕ КАРБАМИЛИРОВАННОГО ДАРБЭПОЭТИНА НА УРОВЕНЬ BDNF И НЕКОТОРЫХ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ ПРИ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

Н.А. Щелчкова^{1,2}, П.А. Логинов¹, К.И. Самсонова¹, Р.Д. Лапшин¹, И.И. Белоусова^{1,2}, И.В. Осе³, М.А. Калинкина³, И.В. Мухина^{1,2}

¹Нижегородская государственная медицинская академия МЗ РФ, Нижний Новгород; ²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород; ³ООО «Фармапарк» Москва, Россия

Ишемическое повреждение головного мозга приводит к нарушению регуляции взаимовлияния иммунной и нервной систем посредством цитокинов и нейропептидов (BDNF). Перспективным направлением в лечении ишемии головного мозга является разработка препаратов на основе цитокинов, одним из которых является эритропоэтин и его дериваты. Целью работы явилось изучение влияния карбамилированного эритропоэтина на уровень интерлейкинов и BDNF при моделировании локальной ишемии мозга у крыс. Односторонний фотохимический тромбоз средней мозговой артерии в области префронтальной коры головного мозга крыс моделировался на крысах-самцах Wistar. Препарат «Карбамилированный дарбэпоэтин (CdEPO)» (ООО «Фармапарк», Россия) вводили внутривенно через 6 и 24 часа после операции в дозе 50 мкг/кг. Контрольная группа получала 0,9% раствор NaCl. Через 10 дней определяли уровень BDNF, IL-2 и IL-4 в плазме крови (ИФА, CUSABIO).

Формирование тромбоза мозговой артерии головного мозга приводит к развитию ишемического очага воспаления, являющегося предиктором иммунных реакций и нейроцитоза. В контрольной группе уровень BDNF достоверно выше по сравнению с интактной группой ($42,0 \pm 1,0$ и $35,2 \pm 0,7$ пг/мл соответственно ($p < 0,05$)). Применение CdEPO в постоперационном периоде снижало уровень BDNF относительно значений контроля ($29,66 \pm 2,0$ пг/мл). Содержания IL-2 и IL-4 возрастало также в контрольной группе относительно интактных значений ($110,8 \pm 4,2$ и $83,0 \pm 5,0$; $2,27 \pm 0,2$ и $2,53 \pm 0,15$ нг/мл соответственно, $p < 0,05$). Введение CdEPO сохраняло значения IL-2 и IL-4 на уровне интактных животных ($99,2 \pm 5,8$ и $2,30 \pm 0,12$ нг/мл соответственно, $p < 0,05$).

Проведенные исследования показали, что формирование ишемического очага префронтальной коры головного мозга ведет к увеличению уровня BDNF в плазме крови, что свидетельствует о гибели клеток, в сочетании с активацией иммунной системы по содержанию IL-2 и IL-4. Двукратное введение CdEPO в постоперационный период модулирует механизмы защиты нейронов, а также гуморальное и клеточное звено иммунитета. Положительное сочетанное влияние CdEPO на нейротрофическую и иммунную системы является критерием для его дальнейшего изучения при коррекции ишемических нарушений головного мозга.

МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЫЙ АНТИОКСИДАНТ SKQ1 ДЕМОНИСТРИРУЕТ СИЛЬНОЕ АНТИМИКРОБНОЕ ДЕЙСТВИЕ

П.А. Назаров¹, А.В. Токарчук¹, К.Г. Лямзаев¹, М.В. Скулачев³, Е.А. Котова¹, В.П. Скулачев¹, Ю. Н. Антоненко¹

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова; Институт митохонгенерики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Митохондриально-направленные антиоксиданты уменьшают окислительное повреждение митохондрий, являющееся причиной множества болезней. SkQ1, состоящий из трифенилфосфониевого катиона и пластохинона, связанных через линейный углеводородный фрагмент, обнаружил высокую антибактериальную активность в отношении грамположительных бактерий *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium sp.* и *Staphylococcus aureus*, подавляя их рост в микромолярных концентрациях. SkQ1 проявлял значительно меньшую (примерно на два порядка ниже) антибактериальную активность в отношении *Escherichia coli*, очевидно, из-за наличия очень эффективной помпы множественной лекарственной устойчивости AcrAB-TolC. Мутанты *E. coli*, делеционные по любому из компонентов AcrAB-TolC, обнаруживали примерно такую же чувствительность к SkQ1, как *B. subtilis*, *Mycobacterium sp.* и *S. aureus*. Мутанты, делеционные по белкам других транспортеров, также использующих белок TolC, таких как AcrD, AcrE, AcrF, MdtA, MdtB, MdtC, MdtE, MdtF, MacA, MacB, EmrA и EmrB, продемонстрировали чувствительность к SkQ1, сопоставимую с чувствительностью дикого типа *E. coli*. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что AcrAB-TolC – единственный транспортер, который выкачивает SkQ1 из клеток *E. coli*. Несмотря на значительные различия в устройстве клеточных мембран, чувствительность к SkQ1 оказывается одинаковой как у микобактерий, так и у грамположительных бактерий *B. subtilis* и *S. aureus*, указывая на то, что основные факторы, определяющие накопление SkQ1 в бактериальных клетках, не связаны со сложностью устройства клеточных мембран.

Падение мембранного потенциала под действием SkQ1 позволяет связать механизм антибактериального действия SkQ1 с разобщением окислительного фосфорилирования. Минимальные ингибирующие концентрации SkQ1 не оказывали заметного цитотоксического действия на эукариотические клетки. Поэтому SkQ1 может использоваться как в качестве самостоятельного антимикробного агента, так и в качестве протектора эукариотических клеток в ходе применения митохондриально-направленных антиоксидантов при окислительном стрессе. *Работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант №15-04-017555.*

МОДЕЛИРОВАНИЕ РОСТА КЛЕТОК СНО В ПОВОЛОКОННОМ МЕМБРАННОМ БИОРЕАКТОРЕ

Е.В. Гусева¹, Р.Р. Сафаров², Е.С. Воробьева¹, Н.В. Меньшуткина¹

¹Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, ²ООО «Клеточные Системы», Москва, Россия

В настоящее время вопросы получения новых лекарственных препаратов, разработки, создания и внедрения новых установок для их производства стоят достаточно остро. Огромное внимание уделяется развитию и совершенствованию техноло-

гий, связанных с использованием клеток млекопитающих, которые могут использоваться для получения ферментов, моноклональных антител, белков, противовирусных вакцин, противоопухолевых лекарственных препаратов; для проведения различных исследований *in vitro*; для целей регенеративной медицины и тканевой инженерии и т.д.

В данной работе рассмотрены гидродинамические аспекты процесса культивирования клеток млекопитающих, на примере яичников китайского хомячка СНО, в одноразовом мембранном полуволоконном биореакторе, включающем 20 волокон. Математическое моделирование процесса было проведено в одном из пакетов вычислительной гидродинамики FLUENT ANSYS, широко использующемся для расчета, прогнозирования, масштабирования различных процессов. Важным моментом для моделирования процесса культивирования клеток является получение кинетической зависимости роста клеток, которая была описана при помощи логистического уравнения Ферхюльста. Клетки СНО, являясь адгезивными, растут на внешней поверхности волокон, во внутреннее пространство которого подается питательная среда. Моделирование гидродинамики в полуволоконном биореакторе было проведено сначала для внутриволоконного пространства одного волокна, затем для 20 волокон и для всего мембранного биореактора в целом. Были исследованы три способа подачи питательной среды во внутриволоконное пространство, и на основе анализа энергоэффективности элементов, входящих в разработанную технологическую схему для проведения процесса культивирования, был выбран вариант посуточной подачи питательной среды. Кроме того, был определен расход питательной среды, подаваемый на вход в межволоконное пространство. Используя полученные расчетные данные, были проведены экспериментальные исследования в полуволоконном мембранном биореакторе, и была проверена адекватность модели. Кроме того, было проведено масштабирование полуволоконного мембранного биореактора, содержащего 60 волокон.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КАТИОННЫХ НАНОГЕЛЕЙ ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ ЭНДОСОМАЛЬНОГО БАРЬЕРА ПРИ ДОСТАВКЕ БИОАКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ

А.А. Ежов, Е.Д. Максимова, М.В. Жирякова, Е.Б. Файзулов, А.А. Никонова, В.А. Изумрудов, В.И. Орлов, И.Д. Гроздова, Н.С. Мелик-Нубаров *Физический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова; Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия; НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Проведено сравнительное изучение взаимодействия линейного поли(2-диметиламино)этилметакрилата и его катионных наногелей, имеющих различную степень сшивки, с ДНК, а также полистиролсульфонатом натрия. Серия частиц наногеля с различной степенью сшивки была получена сополимеризацией катионного мономера N,N'-диметиламиноэтилметакрилата и N,N'-метиленбисакриламида (МБА) в обращенных мицеллах. Рост степени сшивки достигался увеличением количества МБА в диапазоне мольных долей 0.002–0.15. Рост содержания МБА приводил к уменьшению размера частиц и сужению их распределения по размерам. При содержании МБА более 0.05 мольных долей распределение по размерам было очень узким. Комплексы, образованные с ДНК сшитыми полимерами, полученными при использовании 0.02–0.05 мольных долей МБА, обладали наименьшим размером. Хотя все аминокислотные группы наногелей могут полностью протонироваться низкомолекулярной кислотой, их доступность при образовании ионных пар с полианионами контролируется степенью их сшивания. Исследование взаимодействия комплексов наногелей с клетками в культуре, проведенное с помощью pH-чувствительного флуоресцентного зонда кальцеина, выявило закономерное увеличение цитоплазматической флуоресценции при росте степени сшивки вследствие утечки кальцеина из кислотных компартментов в цитозоль. Полученные данные показывают, что пространственная структура наногелей на основе слабых поликатионов ограничивает доступность локализованных внутри частиц аминокислотных групп для их взаимодействия с любыми синтетическими полианионами или ДНК. Это способствует сохранению буферных свойств наногелей при их захвате клетками путем эндоцитоза. Вследствие этого поликатионные наногели проявляют способность преодолевать лизо/эндосомальный барьер в клеточных компартментах с низким pH по механизму «протонной губки». Таким образом, показано что сетчатая архитектура наногеля вносит важный вклад в способность слабых поликатионов разрушать эндосомы по механизму «протонной губки». Полученные результаты открывают перспективы для конструирования катионных носителей, предназначенных для эффективной доставки анионных противоопухолевых препаратов, нуклеиновых кислот и белков в живые клетки. *Работа поддержана грантом РФФИ 14-15-00391.*

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ КОЗЫ *CAPRA HIRCA*

И.А. Болосов, А.А. Калашников, П.В. Пантелеев, Т.В. Овчинникова
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

Проблема устойчивости бактериальных штаммов к воздействию антибиотиков является одной из активно обсуждаемых тем современной медицины. Решением проблемы может стать использование антимикробных агентов с принципиально иным механизмом действия. Такими веществами могут стать антимикробные пептиды (АМП) – небольшие, чаще всего обогащенные основными аминокислотными остатками молекулы, способные эффективно уничтожать бактериальные штаммы, в том числе устойчивые к воздействию классических антибиотиков. Целью данной работы является изучение биологических свойств антимикробных пептидов козы *Capra hircus* – CAP-28, ChDode и mini-ChBac7.5Na. Эти пептиды относятся к кателицидинам – одному из ключевых семейств АМП. Кателицидины синтезируются в виде неактивных предшественников, включающих консервативный кателин-подобный домен. При инфекционной инвазии белок-предшественник расщепляется, и зрелый пептид высвобождается непосредственно в очаг воспаления. Указанные АМП были получены методом гетерологической экспрессии в бактериальной системе. Определена гемолитическая активность пептидов в отношении эритроцитов человека, а также измерены значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) в отношении трёх бактериальных тест-культур: *Escherichia coli* C600, *Staphylococcus aureus* 209P и *Pseudomonas aeruginosa* PA01. Измерения МИК проводились методом двойных серийных разведений в жидкой питательной среде Мюллера–Хинтона как в бессолевым условиях, так и в присутствии солей в физиологической концентрации. Показано, что активность пептидов ChDode и mini-ChBac7.5Na в присутствии солей значительно снижается. Высказано предположение, что слабо выраженная активность этих пептидов может повышаться в физиологических условиях за счёт синергического эффекта при совместном действии с другими АМП в очаге инфекции. Для проверки гипотезы проанализированы антибактериальные свойства исследуемых АМП в присутствии

СМАР-28, механизм действия которого, как было установлено, связан с нарушением целостности бактериальных мембран. Показано, что при совместном применении ChDode или mini-ChBac7.5Na с пептидом СМАР-28 наблюдается четырёхкратное снижение значений МИК по сравнению с таковыми у индивидуальных пептидов. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).*

ПРИМЕНЕНИЕ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ Т-КЛЕТОК СЛИТНЫХ С ЛИГАНДОМ В-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА ДЛЯ ТЕРАПИИ НЕХОДЖКИНСКИХ ЛИМФОМ

А.С. Рыбинец¹, А.В. Степанов^{1,2}, А.А. Белогуров^{1,2} ¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Неходжкинские лимфомы (НХЛ) – неоднородная группа злокачественных новообразований лимфоцитарной этиологии, включающих в себя все лимфомы за исключением лимфогранулематоза. В 85–90% случаях регистрируемых НХЛ именно В-клетки являются объектом опухолевой трансформации. На сегодняшний день существует большое количество препаратов для терапии НХЛ, однако наиболее эффективные препараты обладают существенным недостатком – повышенным уровнем элиминации нормальных лимфоцитов. Поэтому поиск более специфических маркеров патологических лимфоцитов для направленной терапии является крайне актуальной задачей. Уникальным поверхностным маркером определенного клона В-клеток является В-клеточный рецептор (BCR). Идентификация лиганда BCR лимфомных клеток позволит специфически элиминировать патологические В-лимфоциты. Для реализации поставленной задачи у пациентов с диагнозом фолликулярная лимфома и лимфома Беркитта были изолированы биоптаты лимфоузлов. После определения нуклеотидных последовательностей, кодирующих гены вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей иммуноглобулинов, В-клеточные рецепторы лимфомных клеток были получены в виде полноразмерных антител. С помощью скрининга лигандов BCR из комбинаторной фаговой библиотеки циклопептидов был обнаружен пептид, специфически гибридирующий с лимфомными клетками. Данный пептид был интегрирован в состав химерного антигенного рецептора Т-клеток для получения лентивирусных конструкции и последующей трансдукции цитотоксических лимфоцитов. В результате анализа цитотоксического действия Т-лимфоцитов человека, модифицированных химерным рецептором, по отношению к контрольным и лимфомным клеткам было показано, что предлагаемый подход направленной элиминации позволяет с высокой специфичностью подавлять опухолевые клетки, не подвергая опасности здоровые В-клетки. Разрабатываемый подход позволит создавать персонализированные препараты для терапии большинства неходжкинских лимфом В-клеточного происхождения.

Исследования были проведены в рамках проекта Минобрнауки России № RFMEFI60714X0061.

SHTXIII-ПОДОБНЫЕ ПЕПТИДЫ КУНИТЦ-ТИПА АКТИНИЙ *HETERACTIS CRISPA* И *STICHODACTYLA MERTENSII* – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ЦИТОПРОТЕКТОРЫ

О.В. Синцова, М.М. Монастырская, Е.А. Пислягин, Е.С. Менчинская, Е.А. Юрченко, М.П. Исаева, Е.В. Лейченко, Д.Л. Аминин, Э.П. Козловская Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

Ингибиторы сериновых протеаз Кунитц-типа присутствуют в организмах животных разных уровней организации и принимают участие в регуляции жизненно важных процессов. Однако в организмах ядовитых животных некоторые из них приобрели способность не только ингибировать протеазы, но и модулировать рецепторы и ионные каналы жертв (TRPV1, K_v, Na_v, Ca_v). Показано, что пептиды Кунитц-типа актиний обладают анальгетическим, противовоспалительным и антипаразитарным действием, что позволяет считать их перспективной моделью для дизайна на их основе фармакологических препаратов. Ранее при исследовании кДНК транскриптов актиний *H. crispa* и *S. mertensii* нами были найдены последовательности пептидов Кунитц-типа с высокой степенью идентичности по отношению к последовательности блокатора K_v каналов SHTXIII из актинии *Stichodactyla haddoni*. Три пептида, HCTX1, SMTX1, SMTX1 A49E, полученные в экспрессионной системе *Escherichia coli*, обладали трипсинингибирующей активностью, и оказались не токсичны для мышей и крабов. Электрофизиологические исследования показали, что пептиды не оказывают блокирующего действия на K_v каналы. Установлено, что HCTX1 и SMTX1 A49E, в концентрации 1 мкМ, ингибируют индуцированное гистамином увеличение внутриклеточной концентрации Ca²⁺ в макрофагах костного мозга мыши, что может указывать на их способности блокировать гистаминовые рецепторы H₁ типа. Кроме этого было показано, что в концентрации 10 мкМ пептиды снижают уровень активных форм кислорода, увеличенный в RAW 264.7 макрофагах в результате обработки липополисахаридом из *E. coli*, SMTX1 и SMTX1 A49E увеличивают уровень экспрессии шаперона Hsp70 в клетках асцидной карциномы Эрлиха, а HCTX1 увеличивает выживаемость клеток нейробластомы Neuro2a при инкубировании с 6-гидроксидопамином (индуктором гибели клеток нейробластомы по механизму болезни Паркинсона).

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что SHTXIII-подобные пептиды актиний *H. crispa* и *S. mertensii* обладают значительным фармакологическим потенциалом, однако механизм их действия пока не ясен. Таким образом, изучение механизмов их действия на молекулярном уровне является актуальной задачей для дальнейших исследований. Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 14-25-00037).

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИШЕНИ ПРИ АНТИБИОТИКОТЕРАПИИ ОППОРТУНИСТИЧЕСКОГО ПАТОГЕНА *SERRATIA MARCESCENS* SM6

И.В. Хияс, Т.В. Ширшикова, Л.Е. Матросова, М.Р. Шарипова, Л.М. Богомольная

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, Россия

Сидерофоры представляют собой высокоспецифичные к железу низкомолекулярные соединения. Продукция сидерофоров микроорганизмами является ответом на недостаток железа в окружающей среде или в организме хозяина во время инфекции. Исследование путей биосинтеза микробных сидерофоров способствует разработке новых лекарственных препаратов, направленных на увеличение эффективности антибиотикотерапии в отношении патогенов. *Serratia marcescens* является оппортунистическим патогеном, вызывающим инфекции мочевыводящих путей, сепсис и пневмонию. Клинические изоляты *S. marcescens* часто характеризуются устойчивостью к широкому спектру антибиотиков, что осложняет процесс лечения больных. Целью исследования явилось охарактеризовать сидерофоры, синтезируемые бактерией *Serratia marcescens*. Бионин-

форматический поиск выявил в геноме *S. marcescens* SM6 четыре биосинтетических кластера, ответственных за нерибосомальный синтез вторичных метаболитов (NRPS). Первые два кластера имеют низкий уровень специфичности (12% и 4%) к биосинтетическому генному кластеру энтеробактина и ксантолипина, соответственно. Кластеры 3 и 4 не имеют схожести с другими известными кластерами NRPS. Функциональный анализ сидерофоров, продуцируемых *S. marcescens* SM6, показал их принадлежность к классу катехолов. Установили, что низкие концентрации глюкозы (20–40 мМ) и глицерина (2–4%) являются оптимальными для продукции сидерофоров в жидкой среде. В результате экстрагирования сидерофоров из культуральной жидкости *S. marcescens* SM6 и проведением ВЭЖХ анализа было получено 13 чистых фракций, которые были проверены на способность к связыванию с катионами железа. Были получены УФ-видимые спектры чистых фракций сидерофоров. Дальнейшие исследования позволят исследовать возможность применения сидерофоров *S. marcescens* SM6 для повышения эффективности антибиотикотерапии во время инфекций, вызываемых этим патогеном. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров" и поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований РФФИ 15-04-02110.

НОВЫЕ БЕНЗОФУРАКСАНЫ – ГЕНЕРАТОРЫ ОКСИДА АЗОТА

Е.Ю. Харченко¹, В.А. Чистяков¹, Ю.П. Семенов¹, П.Г. Морозов¹, Е.В. Празднова¹, В.К. Чмыхало¹, И.О. Покудина¹, М.Е. Клецкий¹, Г.С. Бородин¹, А.В. Лисовин¹, О.Н. Буров¹, С.В. Курбатов¹, В.А. Сереженков², Н.А. Ткачев²

¹Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону; ²Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия

NO является мультимодальным регулятором множества физиологических процессов и патологических состояний (инфекционные, воспалительные, опухолевые заболевания) иммунной и нервной систем. Фуроксаны и фуразаны обладают широким спектром биоактивности (антибактериальной, фунгицидной, альгицидной, сосудорасширяющей, антиагрегирующей), обусловленным NO донорными свойствами. Перспективным подходом к комплексной первичной оценке пригодности новых потенциальных доноров NO для дальнейших исследований является применение биосенсоров, объединяющих живые организмы и электронные модули. Методами нуклеофильного ароматического замещения и циклоприсоединения синтезированы дигетарилы, включающие суперэлектрофильный динитробензоксадиазольный фрагмент и π-избыточные азотистые гетероциклы. С помощью генно-инженерных Lux-биосенсоров (штамм) *E. Coli* MG 1655 pSoxS-lux количественно определена их способность вызывать SOX-индукцию, что может быть результатом генерации NO *in vivo*. Исследуемые вещества показали статистически значимую индукцию SOX-оперона и высокую ДНК-протекторную активность при действии диоксида (штамм *E. Coli* MG 1655 pRecA-lux), возможно связанную с антиоксидантными свойствами NO и отсутствием неспецифической токсичности. Интерес для поиска фармакологической активности представляют α- и β-пирролил производные 2,1,3-бензоксадиазолов (например, 4-(1-бензил-1H-пиррол-2-ил)-5,7-динитро-2,1,3-бензоксадиазол и 4-(1-бензил-1H-пиррол-3-ил)-5,7-динитро-2,1,3-бензоксадиазол), наиболее перспективным является производное N-метилпиррола - 7-(1-метил-1H-пиррол-3-ил)-4,6-динитро-2,1,3-бензоксадиазол-1-оксид, имеющий слабый генотоксический и сильный ДНК-протекторный эффект. Методом ЭПР для этих соединений подтверждена способность генерировать NO. Исследованные вещества не проявили антимикробной активности для грам-отрицательных бактерий *E.coli* ATCC 25922 и дрожжей *Candida albicans* (клинический изолят). Производное N-метилпиррола 7-(1-метил-1H-пиррол-3-ил)-4,6-динитро-2,1,3-бензоксадиазол-1-оксида и 7-(1-метил-1H-пиррол-2-ил)-4,6-динитро-2,1,3-бензоксадиазол-1-оксида показали их ингибирующий эффект в опытах с грам-положительными бактериями *Streptococcus mutans* ATCC 25175, ассоциированными с развитием кариеса.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ, проект № 14-13-00103.

НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ 2-ОКСИНДОЛА КАК ЭФФЕКТИВНЫЕ ЛИГАНДЫ МЕЛАТОНИНОВОГО РЕЦЕПТОРА МТЗ-ПОДТИПА

Е.В. Ардаширова, Н.А. Лозинская, М.С. Волкова, Н.Б. Чеснокова, О.В. Безнос, Н.С. Зефилов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова; НИИ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия

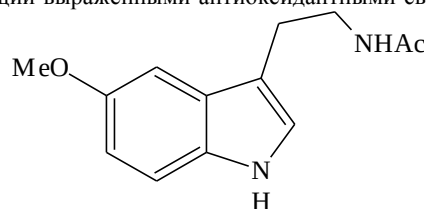
Мелатонин представляет собой эпифизарный гормон, участвующий в регуляции циркадных ритмов у многих животных, усиливающий эффективность функционирования иммунной системы, обладающий выраженными антиоксидантными свойствами.

Нейропротекторные, антиоксидантные свойства, а также способность мелатонина снижать внутриглазное давление (ВГД) связывают с взаимодействием с МТЗ-подтипом мелатониновых рецепторов, который также является ферментом хинон редуктазой 2 [1]. Однако применение мелатонина в качестве лекарственного препарата ограничено в связи с его нестабильностью на свету. Единственный известный синтетический селективный лиганд МТЗ-подтипа мелатониновых рецепторов – 5-MCA-NAT – эффективно снижает ВГД. Тем не менее, его применение в медицинской практике также ограничено. Поэтому исследовательский интерес вызывает дизайн и синтез эффективных лигандов МТЗ подтипа мелатониновых рецепторов.

Нами впервые был проведен синтез ряда новых производных 2-оксиндола и показано, что они являются эффективными лигандами хинонредуктазы 2 (мелатонинового рецептора МТЗ-подтипа) [1]. Проведено исследование антиоксидантной активности полученных соединений *in vitro*. Показано, что полученные производные оксиндола значительно снижают внутриглазное давление *in vivo*. Кроме того показано, что и сам мелатонин оказывает противовоспалительное действие в случае иммуногенного увеита [2].

Полученные данные говорят о возможности практического применения полученных соединений в терапии заболеваний, связанных с окислительным стрессом, таких как увеит и ретинопатия новорожденных, а также в терапии глаукомы.

1. Maria S. Volkova, Katherine C. Jensen, Natalia A. Lozinskaya, Sergey E. Sosonyuk, Marina V. Proskurnina, Andrew D. Mesecar, Nikolay S. Zefirov. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 22, 2012, 7578–7581
2. Чеснокова Н.Б., Безнос О.В., Лозинская Н.А., Бейшенева Г.А., Нестерова Т.В. Биомедицинская химия 62 (2), 2016, 164–168



БИЦИКЛО[3.3.1]НОНАНОВЫЙ СКЕЛЕТ КАК ИЗОСТЕРИЧЕСКАЯ ЗАМЕНА КАРКАСА ТАКСОЛА И ЭЛЕУТЕРОБИНА**А.В. Тутушкина** *Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Рак является второй по значимости причиной смерти в промышленно развитых странах. Один из подходов к химиотерапии рака предполагает использование цитотоксических агентов, основным классом которых являются митостатические препараты, такие, как, например, лиганды тубулина – таксол и элеутеробин. В ходе молекулярного моделирования связывания упрощенных аналогов элеутеробина с белком были сформулированы основные требования к лигандам таксола сайта тубулина. Мы предлагаем заменять центральный блок на различные полициклические каркасы, содержащие в своем составе две гидроксигруппы. Одна из которых должна быть этерифицирована остатком N-метилурокановой кислоты, который занимает карман таксола сайта при связывании с ним элеутеробина, а другая – остатком бензойной кислоты, занимающим другой карман при связывании таксола. В качестве первых из потенциальных лигандов тубулина в нашей научной группе были получены соединения, имеющие в качестве центрального блока 8-оксабицикло[3.2.1]октан. Однако эти соединения не продемонстрировали биологическую активность, вероятно, из-за того, что центральный фрагмент был слишком мал для обеспечения эффективного связывания с тубулином. Далее на основе молекулярного докинга были предложены 1,3 и 1,4-дизамещенные производные адамантанового ряда. По результатам биологических испытаний два соединения продемонстрировали цитотоксическую активность по отношению к трем линиям раковых клеток в микромолярном диапазоне. Однако, адамантан – довольно жесткая структура. Для повышения соответствия структуры сайту связывания было предложено перейти к конформационно более подвижным производным бицикло[3.3.1]нонана. С этой целью мы синтезировали ряд 1,5- и 2,6-дизамещенных производных. Диолы, необходимые для дальнейшего ацилирования, были получены гидролизом с декарбокислированием эфира Мейервейна и последующим восстановлением образующегося диона. Кроме того, 1,5-производные получали гидрируя эфир изофталево́й кислоты, с последующим акилированием 1,3-дибромпропаном и восстановлением сложноэфирных групп.

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ И НЕОАНГИОГЕНЕЗА 2D И 3D КУЛЬТУРАМИ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ**EA.HY926****С.Ш. Гапизов^{1,2}, Л.Е. Петровская¹, Л.Н. Шингарова¹, Е.В. Свищевская¹, Д.А. Долгих^{1,2}**¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия

Хронические воспалительные и онкологические заболевания представляют собой серьезную проблему для современной медицины. Оба процесса характеризуются неоангиогенезом в очагах патогенеза, который сопровождается повышенной экспрессией на поверхности эндотелия $\alpha\text{v}\beta 3$ -интегрина и рецептора фактора роста эндотелия сосудов-2 (VEGFR-2). Поэтому создание адекватной клеточной модели воспаления на основе эндотелиальных клеток является актуальной задачей для разработки новых средств борьбы с различными заболеваниями. Известно, что добавление фактора некроза опухоли (TNF) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A) приводит к активации клеток эндотелия. С целью сравнения экспрессии маркеров воспаления и неоангиогенеза, получена клеточная модель воспаления с использованием 2D и 3D (сфероиды) культур клеток Ea.hy926, имеющих эндотелиальное происхождение. Клетки культивировали в присутствии TNF (25 нг/мл) или VEGF-A (25 нг/мл) в течение 5 ч. Для выделения мРНК из клеток использовали набор RNeasy (Qiagen), а для синтеза кДНК – набор RevertAid (Ферментас). ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией) проводили с специфическими праймерами, обеспечивающими амплификацию фрагментов генов, кодирующих $\alpha\text{v}\beta 3$ -интегрин и VEGFR2. Методом конфокальной микроскопии исследовали экспрессию $\alpha\text{v}\beta 3$ -интегрина и VEGFR2, используя специфические моноклональные антитела и ранее полученные нами гибридные флуоресцентные белки (ГФБ). Согласно данным конфокальной микроскопии и ОТ-ПЦР экспрессия $\alpha\text{v}\beta 3$ -интегрина и VEGFR2 увеличилась на 3D культурах по сравнению с 2D. Также с помощью вышеуказанных методов была выявлена повышенная экспрессия $\alpha\text{v}\beta 3$ -интегрина в 3D культуре Ea.hy926, активированной TNF, и VEGFR2 в культуре, активированной VEGF-A. Таким образом, показано, что 3D культуры клеточной линии Ea.hy926 представляют собой перспективную модель исследования воспалительных процессов, сопровождающихся неоангиогенезом.

ЛИПОСОМАЛЬНАЯ ФОРМА ПРОЛЕКАРСТВА МЕТОТРЕКСАТА: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА**А.С. Алексеева, Е.Л. Водовозова** *Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

Цитостатический препарат метотрексат (MTX, антиметаболит фолиевой кислоты) широко применяется для лечения солидных опухолей, гематологических злокачественных заболеваний и аутоиммунных патологий. Эффективность лечения MTX ограничивается системной токсичностью и частым развитием лекарственной устойчивости, связанной, главным образом, с мутациями и понижением активности белка-транспортера восстановленного фолата и аналогов-антифолатов. Включение MTX в наноразмерные носители способствует улучшению фармакологических показателей и снижению побочных эффектов. Мы разработали стабильные 100-нм липосомы на основе природных фосфолипидов (яичный фосфатидилхолин и фосфатидилинозит, 8:1 мольн.), нагруженные в липидном бислое липофильным пролекарством метотрексата – сложноэфирным конъюгатом MTX с гас-1,2-диолеилглицерином (MTX-DG). Короткий гидрофильный спейсер (N-метиленакарбокси-β-аланин) между объемистой группой MTX и диглицеридным мембранным якорем обеспечивает минимальное нарушение структуры липидного бислоя и позволяет включать в него до 10 мольн.% MTX-DG. Попадая в клетку, молекула пролекарства может расщепляться эстеразами и высвобождать лекарство. Для изучения механизмов проникновения липосом, нагруженных MTX-DG, в клетки был синтезирован флуоресцентный зонд – аналог MTX-DG, несущий BODIPY-метку в ω-положении алифатической цепи остатка диглицерида. С помощью этого зонда установлено, что после связывания с опухолевой клеткой липосомы локализуются в области гликокаликса не менее 1,5 ч, через 2–4 ч они начинают перемещаться в цитоплазму ближе к ядру и при этом наблюдается разделение компонентов липосом (матричных липидов и пролекарства), что означает разгрузку наноносителя. Количественная оценка накопления липосом в культурах клеток проведена с помощью проточной цитометрии. Показано, что опухолевые клетки (A549, CoLo357) в ~2 раза более активно связывают MTX-липосомы, по сравнению с «нормальными» клетками (3T3, HEK293T), при этом накопление пустых липосом было существ-

венно ниже (в 4 раза) вне зависимости от типа клеток. Обработка клеток различными ингибиторами эндоцитоза показала участие клатрин-зависимого пути в проникновении липосом в клетку и в меньшей степени вовлеченность других механизмов эндоцитоза. *Работа поддержана грантами РФФИ №№ 16-34-01237 и 13-04-00069.*

ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

А.А. Макарецова, А.А. Немудрая, О.А. Коваль, В.А. Рихтер, Е.В. Кулигина

Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск; Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Одной из наиболее перспективных тенденций разработки противоопухолевых лекарственных препаратов является получение адресующих агентов, способных доставлять лекарства к опухоли. Опухолеспецифические агенты позволяют обеспечить эффективное воздействие на опухоль и избежать общего токсического воздействия лекарства на здоровые клетки организма. При этом доза препарата, необходимая для достижения терапевтического эффекта, значительно снижается. В настоящее время перспективными адресующими агентами считают короткие пептиды, отобранные из фаговых пептидных библиотек. Целью данной работы является отбор опухолеспецифических пептидов, экспонированных на поверхности бактериофага, из комбинаторной фаговой пептидной библиотеки в системах *in vitro* и *in vivo* для адресной доставки противоопухолевых лекарственных препаратов. Для получения бактериофагов, экспонирующих опухолеспецифические пептиды, был проведен скрининг фаговой пептидной библиотеки на культурах раковых клеток аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 и MCF-7 и на мышах линии SCID с трансплантированной опухолью человека MDA-MB-231. Сравнительный анализ специфичности отобранных пептидов, экспонированных бактериофагами, показал достоверное связывание пептидов YTYDPWLIFPAN и FIPFDPMRWE с раковыми клетками MDA-MB-231 и пептида FIPFDPMRWE с раковыми клетками MCF-7 по сравнению с бактериофагом дикого типа. Изучено накопление фаговых клонов, экспонирующих отобранные *in vitro* и *in vivo* пептиды, в опухолевой ткани MDA-MB-231 в модели ксенографтов. При анализе взаимодействия бактериофагов с раковыми клетками MDA-MB-231 показано, что фаг, экспонирующий пептид YTYDPWLIFPAN, обладающий наибольшей специфичностью к опухолевой ткани, интернализуется в раковые клетки. Таким образом, отобранные опухолеспецифические пептиды можно использовать для адресной доставки цитотоксических агентов к опухолям молочной железы человека. *Работа поддержана ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы», соглашение № 14.607.21.0063 (RFMEFI60714X0063).*

АНАЛИЗ СПОСОБНОСТИ ПЕПТИДОВ-МИМЕТИКОВ, ИНГИБИТОРОВ АМИЛОИДОГЕНЕЗА, ПРОХОДИТЬ ЧЕРЕЗ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР

П.К. Шувалова, О.И. Большакова, А.Л. Шварцман, С.В. Саранцева

Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенной формой первичных нейродегенеративных заболеваний пожилого возраста. Многочисленные исследования поддерживают гипотезы о ключевой роли амилоидоза в патогенезе БА. Основным компонентом амилоидных бляшек, найденных в аутоптатах мозга больных, представляет собой фибриллярные агрегаты короткого пептида (42 аминокислоты), названного амилоидным пептидом бета (Абета). Ранее были выделены и охарактеризованы пептиды, являющиеся потенциальными ингибиторами амилоидогенеза. Но для того чтобы они могли быть использованы как терапевтические агенты, необходимо чтобы они могли проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Однако данные пептиды такой способностью не обладали. Мы модифицировали пептиды, используя для этого векторные пептиды, способные проходить через клеточные мембраны (TP2, Arg9). Целью данной работы являлось исследование способности составных пептидов (пептид и векторный пептид) и фуллеренолов, проходить внутрь клеток и ГЭБ *Drosophila melanogaster*. Исследование способности пептидов проходить через клеточную мембрану были проведены на культурах клеток HEK 293 (почка эмбриона человека) и HELA. Для этого пептиды были мечены флуоресцентным красителем ФИТЦ. Результаты показали, что все исследованные пептиды хорошо проходят внутрь клеток обеих линий и регистрируются в цитоплазме и ядре клеток. Чтобы понять, проходят ли исследуемые нами пептиды через ГЭБ, мы провели эксперименты *in vivo* на *Drosophila melanogaster*. Для этого мы применили разработанный нами ранее метод инъекций пептидов в абдомен мух с последующей их детекцией в мозге методом конфокальной микроскопии через определенные промежутки времени. В результате исследования мы показали, что изучаемые пептиды с разной эффективностью проходят через ГЭБ. Мы также исследовали способность фуллеренолов C60, C70 и C120 проходить через ГЭБ и динамику накопления фуллеренолов в мозге *Drosophila melanogaster* через определенные промежутки времени. Для анализа использовали первичные антитела к фуллеренам и вторичные, меченные флуорохромом. Анализировали относительный уровень флуоресценции в мозге. В результате было показано, что исследованные нами фуллеренолы проходят ГЭБ и равномерно распределяются в мозге. *Работа поддержана грантом РФФИ № 15-29-01350.*

ОСОБЕННОСТИ СТАНДАРТИЗАЦИИ ПРЕПАРАТОВ ММСК, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

Ю.Г. Суздальцева, М.А. Лагарькова *ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия*

В настоящее время установлена значительная роль мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) в регуляции механизмов воспаления и регенерации тканей. Однако у человека регенеративный потенциал снижается с возрастом. В связи с этим возникает интерес к получению ММСК на более ранних стадиях развития человека. Репрограммирование соматических клеток человека в плюрипотентное состояние, сходное с эмбриональными клетками, с последующей их дифференцировкой в клетки различных органов и тканей позволяет разрабатывать клеточные препараты нового поколения для лечения широкого спектра заболеваний. Для получения индуцированных плюрипотентных клеток (ИПСК) культивируемые фибробласты из биоптата кожи человека были репрограммированы факторами Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc с использованием рекомбинантных вирусов Сендая в плюрипотентное состояние. Затем ИПСК под воздействием специальных условий

были дифференцированы в клетки ранней мезодермы, экспрессирующие маркеры BRY, Snail, TBX6, MIXL1. Далее посредством культивирования в стандартной среде эти клетки были дифференцированы в ММСК, способные к адгезии к пластиковой поверхности, экспансии в культуре, экспрессирующие поверхностные маркеры CD105, CD90 и CD73 и не экспрессирующие CD45, CD34 и HLA-DR, способные дифференцироваться в клетки жировой, костной и хрящевой ткани. Таким образом получены линии ММСК различных стадий развития человека. Разработка клеточных препаратов на основе постнатальных клеток человека включает в себя ряд технологических процедур: выделение клеток из биопсии, культивирование *in vitro*, контроль жизнеспособности, скрининг на наличие инфекционных агентов, долговременная криоконсервация, наращивание необходимого количества клеток. В случае ИПСК в эти процедуры дополнительно входят репрограммирование, дифференцирование и сортировка. Одним из обязательных элементов стандартизации клеточных препаратов является оценка медицинской безопасности клеточного препарата и паспортизация. Нами проведён сравнительный анализ подходов к паспортизации клеточных культур различного происхождения. Рассмотрены такие аспекты безопасности препаратов клеток, дифференцированных из ИПСК как токсичность, пирогенность, аллергенность, стерильность, отсутствие инфекционных агентов различной этиологии, отсутствие недифференцированных клеток и клеток с хромосомными аномалиями. Таким образом предложены технологические процедуры получения и контроля качества препаратов ММСК, дифференцированных из ИПСК.

ХИНОКСИКАИН – МЕСТНЫЙ АНЕСТЕТИК НОВОГО ТИПА

М.М. Румянцев, И.В. Михура, А.А. Формановский

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

В современной анестезиологии используется около 40 местных анестетиков – лекарственных препаратов, способных обр-атимо понижать или полностью выключать ощущение боли в ограниченной области различных тканей организма человека. Однако наряду с местноанестезирующим действием препараты этой группы могут оказывать резорбтивное действие с нежелательными последствиями, например – кардиодепрессивное действие, нарушения зрения, судороги и кому. Поиск новых эффективных и одновременно безопасных местных анестетиков остается актуальным. Показано, что ряд производных (4-оксихинолон-2)-3-карбоновой кислоты обладает высокой анальгетической активностью. Был предложен новый перспективный местный анестетик хиноксикаин – гидрохлорид диэтиламиноэтиламида 4-гидрокси-2-оксо-1-пропил-1,2-дигидрохинолин-3-карбоновой кислоты, обладающий исключительными местноанестетическими свойствами. Нами была успешно решена задача разработки препаративного метода синтеза хиноксикаина. Схема синтеза включает три последовательных стадии. Восстановительным аминированием с пропаналем метилового эфира антралиновой кислоты цинковой пылью в уксусной кислоте был получен метиловый эфир N-пропилантралиновой кислоты с выходом 98% (без выделения промежуточно образующегося основания Шиффа). Полученный эфир обрабатывали хлорангидридом моноэтилового эфира малоновой кислоты, синтезированным по разработанной нами схеме в три стадии из диэтилового эфира малоновой кислоты. N,N-(алкил)амид метилового эфира антралиновой кислоты после образования легко замыкается в производное хинолин-3-карбоновой кислоты. Без выделения его обрабатывали N,N-диэтиламиноэтиламином в этаноле. Выход полученного диэтиламиноэтиламида 4-гидрокси-2-оксо-1-пропил-1,2-дигидрохинолин-3-карбоновой кислоты относительно метилового эфира пропилантралиновой кислоты составил 81%. Также мы синтезировали три соли диэтиламиноэтиламида 4-гидрокси-2-оксо-1-пропил-1,2-дигидрохинолин-3-карбоновой кислоты: собственно хиноксикаин – его гидрохлорид, обладающий рядом существенных фармакологических недостатков; соответствующий метансульфонат, продемонстрировавший значительное улучшение фармацевтических свойств, и неизвестный ранее L-тарtrat, фармакологические свойства которого должны превосходить свойства известных солей.

ВЫДЕЛЕНИЕ, КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ КАРОТИНОИДОВ *CAPSICUM ANUUM* L.

Ю.А. Бойко, А.А. Шандра

Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

Окислительно-восстановительные процессы занимают одно из ведущих мест в развитии и течении воспаления. Это связано, как с прямым альтертирующим воздействием свободных радикалов и активных форм кислорода, так и потенциацией процессов образования ряда провоспалительных агентов, таких как простогландины, интерлейкины и др. Целью данного исследования являлось изучения влияния антиоксидантных веществ (каротиноидов) *Capsicum anuum* L., на некоторые особенности протекания экспериментального воспаления у крыс. Смесь каротиноидов получали из свежих плодов *Capsicum anuum* L. сорта украинский горький. Для количественного определения общего содержания, а также соотношений между красной и желтой фракциями каротиноидов использовали спектрофотометрический метод. На основе выделенной смеси каротиноидов готовили лекарственную форму следующего состава: 0,2% смеси каротиноидов, 99,8% мягкая основа (смесь вазелина и вазелинового масла). Противовоспалительную активность лекарственной формы исследовали на беспородных белых крысах-самцах массой 200–220 г. Экспериментальное хроническое воспаление вызывали путем введения полного адьюванта Фрейнда под плантарный апоневроз правой конечности. Измерение биохимических показателей крови – активности сывороточной холинэстеразы и общего количества серомукоидов в плазме крови осуществлялось с помощью коммерческих тест-систем для экспресс-анализа производства ТОВ НВП «Филисит-Диагностика» (Украина). Лечебное воздействие осуществлялось один раз в сутки, путем нанесения мази на область воспаления. Общее количество каротиноидов в плодах *Capsicum anuum* L. сорта украинский горький составило 2076 мкг на 1 г свежих плодов. Соотношение между желтыми и красными каротиноидными фракциями равнялось 2,25:1. Использование мази с экстрактом смеси каротиноидов при воспалительном процессе, вызванном введением адьюванта Фрейнда, позволило снизить активность холинэстеразы с 143,5 (3 день воспаления) до 53,1 мкмоль/с*л на 10 день лечения (142,8 мкмоль/с*л в группе контроля), а уровень серомукоидов с 1,62 ед. опт. пл. (3 день воспаления) до 0,48 ед. опт. пл. (1,62 ед. опт. пл. в группе контроля), что может свидетельствовать о снижении уровня оксидантных процессов в зоне воспаления.

ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПЭГИЛИРОВАННОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ L-АСПАРАГИНАЗЫ *ERWINIA CAROTOVORA*

Н.Н. Соколов¹, И.Д. Гроздова², Г.Ю. Ломакина², М.В. Покровская¹, В.С. Покровский¹, С.С. Александрова¹, О.В. Подобед¹, Д.В. Гришин¹, Ю.А. Гладилина¹, Н.С. Мелик-Нубаров²

¹НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

L-Аспарагиназа или L-аспарагин-амидогидролаза (КФ 3.5.1.1.) катализирует гидролиз L-аспарагина с образованием L-аспарагиновой кислоты и аммиака. Бактериальные L-аспарагиназы (*Escherichia coli* и *Erwinia chrysanthemi*) являются основными лекарственным препаратом в комбинированной химиотерапии лимфопротиферативных заболеваний и лимфом. В настоящее время химиотерапия L-аспарагиназой острой лимфобластной лейкемии у детей обеспечивают ремиссию заболевания у 80% больных. Однако относительно низкая стабильность нативных препаратов L-аспарагиназ, их иммунологическая несовместимость и алергогенность обуславливают поиск более эффективных лекарственных форм данного фермента. Одним из перспективных методов улучшения физико-химических и биомедицинских характеристик фармацевтически ценных белков является пегилирование. С этой целью нами синтезирован N-гидроксисукцинимидный эфир монометокси-ПЭГ-гемисукцината (mPEG-suc-NHS), легко ацилирующий аминогруппы в молекуле рекомбинантной L-аспарагиназы *Egw. carotovora*. Разработана методика модификации L-аспарагиназы полученным активированным производным ПЭГ. Оптимальным соотношением при модификации является 25-кратный молярный избыток ПЭГ по отношению к тетрамеру фермента. Показано, что модифицированная L-аспарагиназа наиболее эффективно выделяется из реакционной смеси с помощью гель-проникающей хроматографии на Sepharose CL-6B. Биоконъюгат, полученный в результате такой очистки, практически свободен от примеси несвязанного с белком ПЭГ и эндотоксинов, характеризуется достаточно высокой каталитической активностью и оказывает антипролиферативное действие на культурах клеток *in vitro*. На наш взгляд представляется перспективным использование метода модификации L-аспарагиназы активированным производным mPEG-suc-NHS для получения отечественного лекарственного препарата ПЭГ-аспарагиназы. Эта проблема является весьма актуальной, поскольку в России неэтилированная L-аспарагиназа не выпускается и в клинической онкологии используется импортная ПЭГ-аспарагиназа *E.coli* «Онкаспар» производства фирмы «Медак» (Германия). Работа выполнена при финансовой поддержке грантов МНТЦ №2828, РФФИ №14-04-00325а и РФФИ и Правительства Москвы №15-34-70020 «мол_а_мос».

ВЛИЯНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННОГО АНТИОКСИДАНТА SKQ1 НА АКТИВНОСТЬ АРГИНАЗЫ В ТКАНЯХ КРЫС

В.В. Нуков, А.А. Ананиян, Н.П. Милютин, В.А. Дзрян, А.А. Плотников, С.В. Яцук Кафедра биохимии и микробиологии, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Иванова, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Многочисленные исследования последних лет посвящены изучению роли аргиназы в механизмах развития экстремальных (гипоксия, гипотермия, гипероксия), физиологических (мышечное сокращение) и патологических (сердечно-сосудистые заболевания) инфаркт миокарда, пневмония, воспаление, цирроз печени и др.) состояний. Во многом такой интерес объясняется открытием фермента NO-синтазы (NOS). Обладая абсолютной субстратной специфичностью, оба фермента конкурируют за один и тот же субстрат – аргинин. В связи с этим, поиск регуляторов активности важного звена метаболизма аргиназа – NOS является весьма актуальным. В работе исследовали влияние SkQ1 – антиоксиданта митохондриально – направленного действия, синтезированного под руководством В.П. Скулачева, на активность аргиназы и содержание метаболитов NO• в тканях крыс. Препарат SkQ1 вводили в дозе 50 нм/кг в течение 5 суток в зашечные мешки беспородным крысам самцам *Rattus norvegicus* массой 180–200 г. Показано, что введение SkQ1 снижает активность аргиназы в тканях мозга, легких, почек и печени крыс на 71%, 80%, 62% и 38%, соответственно, по сравнению с контролем. Данный факт вполне объясним, поскольку SkQ1, подобно аргинину, специфическому субстрату аргиназы, имеет положительный заряд, и, следовательно, сродство к активному центру фермента, в котором преобладают радикалы отрицательно заряженных аминокислот, проявляя свойства конкурентного ингибитора. В этих же тканях крыс определяли содержание метаболитов NO•. Показано, что введение SkQ1 приводит к увеличению на 45%-46% концентрации метаболитов NO• – продуктов NOS-активности по сравнению с контролем только в почках и мозгу крыс. В печени и легких изменений данного показателя не обнаружено. Таким образом, SkQ1 – митохондриально-направленный антиоксидант является ингибитором аргиназы в тканях мозга, почек, легких и печени крыс и, возможно, реципрокным эффектором NOS, но лишь в тканях мозга и почек. В ряде работ доказан положительный эффект ингибиторов аргиназы при сердечно-сосудистых заболеваниях. Полученные результаты позволяют рассматривать SkQ1 в качестве возможного перспективного препарата коррекции широкого спектра патологий, имеют практическую значимость и могут быть использованы при разработке лекарственных средств на основе SkQ1.

ВЛИЯНИЕ СВОЙСТВ ПОВЕРХНОСТИ НИКЕЛИДА ТИТАНА, МОДИФИЦИРОВАННОЙ ИОНАМИ КРЕМНИЯ ИЛИ ТАНАЛА, НА ЭКСПРЕССИЮ БЕЛКА ЗЕКСИНА КЛЕТКАМИ, КУЛЬТИВИРУЕМЫМИ НА ПОВЕРХНОСТИ СПЛАВА А.Л. Матвеев¹, Л.В. Артемьева¹, С.Н. Мейснер^{2,3}, Л.Л. Мейснер^{2,3}, В.А. Матвеева¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск; ³Национальный исследовательский томский государственный университет, Томск, Россия

Материалы на основе титана традиционно рассматриваются как прочные и биосовместимые материалы. Однако используемые импланты имеют ограниченную интеграцию с тканями, малый срок службы и могут вызывать воспалительные реакции. Для повышения биосовместимости никелида титана необходимо ограничить вымывание никеля и повысить интеграцию имплантата с окружающими тканями. Модификацию поверхности никелида титана получали односторонней обработкой поверхности электрополированного сплава ионами кремния (образцы TiNi-Si) или тантала (образцы TiNi-Ta). Экспрессию белка зексина изучали на мезенхимальных стволовых клетках костного мозга крысы (МСК). Клетки культивировали 14 дней на поверхности образцов модифицированного никелида титана *in vitro*. Белок зексин и ядра в клетках идентифицировали методом флуоресцентной микроскопии, используя антитела, специфичные к белку зексину и краситель ядер Hoechst. Согласно, результатам метода лазерной сканирующей микроскопии, на поверхности образцов никелида титана через 14 дней культивирования обнаружены МСК костного мозга крысы. Физико-химические свойства поверхности образцов TiNi-Si,

TiNi-Ta не оказывали острого токсического действия на клетки, культивируемые на их поверхностях. Клетки заселяли поверхности всех образцов никелида титана независимо от варианта обработки поверхности. Показана внутридерная локализация белка зексина при культивировании МСК на поверхности TiNi-Si. При культивировании клеток на поверхности TiNi-Ta, белок зексин обнаружен в бляшках фокальной адгезии и цитозоле клеток. Различная локализация белка зексина, вероятно, связана с различиями в химическом составе и морфологии поверхностей никелида титана, модифицированного ионами кремния или тантала, и, вероятно, влияет на подвижность клеток. *Работа поддержана грантом Российского научного фонда №15-13-00023.*

МИКРОНИЗАЦИЯ ЛЕВОФЛОКСАЦИНА И МОКСИФЛОКСАЦИНА МЕТОДОМ СВЕРХКРИТИЧЕСКОГО АНТИСОЛЬВЕНТНОГО ОСАЖДЕНИЯ

К.В. Суховерков, К.А. Глазунова, А.М. Егоров, Е.В. Кудряшова *Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

В последние годы фторхинолоны все чаще применяются для лечения туберкулеза. Однако данные препараты не лишены побочных эффектов, выраженность которых можно снизить путем уменьшения терапевтической дозы лекарства. Одними из наиболее перспективных подходов к решению данной задачи являются микронизация и инкапсулирование лекарственной субстанции в полимерные микрочастицы. Наилучшим образом данная задача разрешается с использованием сверхкритических флюидных технологий (СКФ). В настоящей работе для разработки новых лекарственных форм моксифлоксацина (МФ) и левофлоксацина (ЛФ) был применен метод микронизации лекарственной субстанции в режиме сверхкритического анти-сольвентного осаждения (SAS). Показано, что в зависимости от условий проведения микронизации методом SAS (тип растворителя, концентрация микронизируемого компонента) МФ и ЛФ растворителе образуются частицы МФ и ЛФ различного размера (от 0.6 до 8 микрон) и различной морфологии (от многоугольных пластин до вытянутых параллелепипедов). Методами ИК, комбинационного рассеяния (КР) и кругового дихроизма (КД) спектроскопии показано, что микронизация МФ и ЛФ методом SAS с использованием различных типов растворителей не приводит к изменению химической структуры препаратов их рацемизации. Микронизация оказывает значительное влияние на скорость растворения лекарственных субстанций при физиологических значениях так, при pH 7,5 частицы МФ микронизированные из ДМСО и ДМФА растворяются на 20-30% быстрее по сравнению с исходным МФ. Для частиц ЛФ наибольшую скорость растворения демонстрируют препараты ЛФ микронизированные с использованием хлоруглеводородов. Показано, что при pH 7,5 скорость растворения всех микронизированных препаратов на 15-30% выше по сравнению с исходным ЛФ. Установлено, что растворимость формирующихся в процессе SAS микрочастиц зависит от их размера, морфологии и степени кристалличности. Полученные данные будут лежать в основе разработки новых лекарственных форм МФ и ЛФ для эффективного лечения резистентных форм туберкулеза. *Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, грант 15-13-00063.*

СТАНДАРТИЗАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ СУБСТАНЦИИ И МАЗИ “ЛИМОНИДИН”

А. Жусупова, Г. Жусупова, А. Гадецкая
КазНУ им. Аль-Фараби, Алматы, Казахстан

Стандартизация растительной субстанции “Лимонидин” была проведена в соответствии с нормативными требованиями Государственной Фармакопеи Республики Казахстан, гармонизированной с Европейской Фармакопеей.¹ Испытания включали: идентификацию субстанции, определение показателей ее качества и стандартизацию выделенных из нее основных групп биологически активных веществ. Биологически активный комплекс субстанции включает в себя: фенолокислоты, флавонолы и их гликозиды, конденсированные и гидролизующиеся дубильные вещества, некоторые из которых были выделены и идентифицированы впервые на основе ¹³C ЯМР спектроскопии.² Доклинические исследования субстанции показали ее антиоксидантную, противовоспалительную и гепатопротекторную активности, а также значительную антимутагенную активность. Полученная субстанция способствует снижению содержания молочной кислоты в опухолях и тканях опухоленосителей, усиливая таким образом иммунный статус организма. На основе субстанции была получена мазь под одноименным названием “Лимонидин”. Углубленные доклинические исследования и полный комплекс клинических испытаний последней показали ее антиэкссудативную, антипролиферативную, антимикробную и некролитическую активности. Отмечено, что наряду со стимулированием заживления поражений кожи и слизистых различного генеза исследуемая мазь не вызывает местнораздражающую и аллергическую реакции. Также не были отмечены кумулятивный и местный токсический эффекты. Мазь “Лимонидин” по своему противовоспалительному действию превосходит метилурациловую и бутадионовую мази, а также мазь календулы; по противовирусному действию она сопоставима с Бепантеном и Эпигеном; улучшает иммунный статус организма. На основе проведенных исследований субстанция и мазь “Лимонидин” были включены в реестр лекарственных препаратов, разрешенных для применения на территории Республики Казахстан; имеются охранные документы.

1. Государственная Фармакопея Республики Казахстан. – Алматы. - 2008. - Том 1. - 592 с.; 2009. - Том 2. - 804 с.; 2014. - Том 3. - 872 с.
2. Gadetskaya A.V., Zhushupova G.E., Tarawneh A.H., Guoyi Ma, Ross S.A., Cutler S.J. Therapeutic efficacy of phenolic compounds from *Limonium* in acute lymphoblastic leukemia. *Planta Med* 2015; 5 (81): PC3

ВЛИЯНИЕ 4-МЕТИЛБЕНЗОДИАЗЕПИНОНА-2 В СВЕРХМАЛЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ НА ПОВЕДЕНИЕ КРЫС В ТЕСТЕ ПОРСОЛТА В НОРМЕ И НА ФОНЕ БЛОКАДЫ D2 РЕЦЕПТОРОВ

И.В. Черетаев, Д.Р. Хусаинов, И.И. Коренюк

Таврическая академия, Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

4-метилбензодиазепин-2 является перспективным соединением, обладающим антидепрессантными свойствами в различных концентрациях. Цель исследования – изучить влияние сверхмалых концентраций 4-метилбензодиазепина-2 на поведение крыс в тесте Порсолта в норме и на фоне угнетения дофаминергической системы. Изучали поведение 80 крыс, разделённых на 8 групп по 10 особей. Контрольной группе за 30 мин до эксперимента вводили внутрибрюшинно физиологический раствор; трём экспериментальным – 4-метилбензодиазепин-2 в одной из сверхмалых концентраций (1, 0,01 и 0,1 пикомоль/л). Четырём другим группам в течение трёх дней предварительно вводили внутрибрюшинно галоперидол в дозе 2,5 мг/кг («Дарница», Украина) для блокады D2 рецепторов; затем трём из этих четырёх групп за 30 мин до тестирования

ния вводили внутривенно 4-метилбензодиазепина-2 в указанных концентрациях. По результатам теста Порсолта рассчитывали индекс депрессивности (ИД) – отношение времени пассивного плавания животных к времени активного. Статистическую обработку результатов проводили с помощью U-критерия Манна-Уитни.

ИД в контроле составил 1.25 ± 0.40 усл. ед., после введения галоперидола – 3.09 ± 0.62 усл. ед., а после инъекций 4-метилбензодиазепина-2 в сверхмалых концентрациях этот показатель составил – 0.97 ± 0.11 (1 пикомоль/л), 0.68 ± 0.13 (0.1 пикомоль/л) и 1.60 ± 0.34 усл. ед. (0.01 пикомоль/л) соответственно. Следовательно, 4-метилбензодиазепин-2 проявлял антидепрессантные свойства в концентрации 0.1 пикомоль/л (ИД в данной концентрации составлял менее 1.0 и достоверно отличался от контроля при $p \leq 0.05$) при функционировании дофаминергической системы в норме. После инъекций 4-метилбензодиазепина-2 на фоне блокады D2-рецепторов галоперидолом ИД достоверно изменялся ($p \leq 0.01$) и составил 3.93 ± 0.43 (1 пикомоль/л), 4.19 ± 0.21 (0.1 пикомоль/л) и 7.22 ± 0.85 усл. ед. (0.01 пикомоль/л) соответственно, т. е. данное соединение приобретало продепрессантные свойства. Это позволяет считать, что D2 рецепторы участвуют в реализации антидепрессантного эффекта 4-метилбензодиазепина-2 в концентрации 0.1 пикомоль/л. Необходимы дальнейшие исследования роли дофаминергической системы в психоактивных свойствах этого вещества. Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания № 2015/701 Минобрнауки России.

TARGETED TRANSPORT OF DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC DRUGS INTO THE BRAIN

V.P. Chekhonin^{1,2}, A.S. Potapov³, A.A. Kononov³ ¹Department of Medical Nanobiotechnologies, Medical Biological Faculty, N. I. Pirogov Russian National Research Medical University; ²V.P. Serbsky Federal Medical Research Center of Psychiatry and Narcology, Ministry of Health of the Russian Federation; ³Burdenko Neurosurgical Institute, Moscow, Russia

Targeted transport of antitumor drugs and genetic material to target cells is a key problem in the chemotherapy of malignant neoplasms, including high-grade gliomas. A promising solution to it appears to be the use of vector nanoparticles and nanocontainers, which is the essence of the nanobiotechnological approach.

Traditional approaches to chemotherapy remain ineffective in the case of aggressive tumors of the central nervous system. In this context, new strategies of the targeted delivery of diagnostic and antitumor drugs are actively being studied. This work presents the research results for vector nanocontainer systems based on anti-Cx43 and anti-GFAP monoclonal antibodies for the therapy of experimental C6 glioma. The focus has been on the creation of a C6 glioma model in rats, the synthesis of vector immunoliposome preparations, and the study of the binding of C6 glioma cells with monoclonal anti-Cx43 and anti-GFAP antibodies *in vivo* after intravenous infusion. Studies using the immunofluorescence method and intravital MRI have demonstrated the possibility to visualize the perigloma space with the obtained nanocontainer systems, which makes it possible to employ such systems for the targeted delivery of diagnostic and therapeutic agents to the perigloma zone of high-grade gliomas.

THE POST-TRAUMATIC SYRING MANAGEMENT AND FUNCTIONAL IMPROVEMENT POST CHRONIC SPINAL CORD INJURY WITH VARYING NUMBERS OF MESENCHYMAL STEM CELLS

Chao Zhang¹⁻⁴, V.P. Baklaushv², A.Y. Morozova³, M.A. Abakumov², I.L. Gubsky², P.A. Melnikov², A.N. Gabashvily², Xiao Tian⁵, Guowen Wang¹, Shiqing Feng⁴, V. P. Chekhonin^{2,3}

¹Department of Bone and Soft Tissue Tumors, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin, China; ²Department of Medicinal Nanobiotechnology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia; ³Department of Basic and Applied Neurobiology, Federal Medical Research Center for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russia; ⁴Department of Orthopedics, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin, China; ⁵Department of Immunology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin, China

Spinal cord injury (SCI) is a traumatic injury to the spinal cord which is not a consequence of the disease. Our previous epidemiological research suggested the annual incidence in China reached 23.7 cases per million people. The global annual incidence was recently reported range from 9.2 to 246 cases per million. Stem cell transplantation has become a widely accepted treatment for overcoming SCI. The first description of Mesenchymal stem cells (MSCs) occurred in 1991. MSCs have gradually become one of the most used in research and surgery. Many issues need to be addressed before MSCs transplantation transformation progresses to formal clinical use, including the optimal transplantation timing, the most effective transplantation method and the optimal number of stem cells. After looking into the current studies and clinical trials, we found that the number of the employed MSCs are not uniform. The number of cells used ranged from 4×10^5 to 1×10^6 in the basic studies, and 7×10^5 to 2×10^7 in the clinical trials.

In order to figure out the optimal number of MSCs for transplantation of the chronic SCI, we performed the present research. Using magnetic resonance imaging (MRI), diffusion tensor imaging (DTI), diffusion tensor tractography (DTT), immunohistochemistry, histological staining and behavior testing evaluations, we focused the effect of varying numbers of MSCs on reducing lesion cavity and post-traumatic syrinx formation, suppressing glial scar formation, enhancing neuronal fibers remodeling, promoting axonal regeneration and sprouting, improving vascularization, ameliorating the neuronal factors expression level, and function improvement. After comparison, the optimal number of MSCs for treating chronic SCI was decided.

WAY2DRUG – ПЛАТФОРМА ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ПОИСКА НОВЫХ ЛЕКАРСТВ

Д.С. Дружиловский¹, А.В. Рудик¹, Д.А. Филимонов¹, А.А. Лагунин^{1,2}, П.В. Погодин^{1,2}, Х.А. Муртазалиева^{1,2}, N. Sastry³, В.В. Поройков¹

¹НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия; ³Centre for Molecular Modeling, CSIR-Indian Institute of Chemical Technology, Hyderabad, India

Плейотропность действия большинства фармакологических веществ требует комплексной оценки их спектров биологической активности [1]. Экспериментальное тестирование многих миллионов соединений на тысячи видов биологической активности практически не реализуемо; рациональный подход основан на применении компьютерных методов оценки. Сопоставление качества прогноза биологической активности с помощью ряда веб-сервисов позволило прийти к выводу о существенно более высокой точности прогноза, обеспечиваемого PASS Online [2]. Для расширения функциональных возможностей нами разработана платформа Way2Drug [3], где наряду с PASS представлены программы прогноза: GUSAROnline (ост-

рая токсичность для крыс и взаимодействие с нежелательными мишенями), CLC-Pred (воздействие на опухолевые и неопухолевые клеточные линии), PASSTargets (взаимодействия с белковыми мишенями), RA (реакционных атомов), и др.

В настоящее время в рамках проекта РНФ-DST начата работа по интеграции нашей системы с веб-ресурсом по оценке свойств органических соединений [4]. В докладе будут представлены примеры использования платформы Way2Drug для репозиционирования лекарственных соединений и реализации проектов по поиску новых фармакологических веществ академическими исследователями. *Работа выполняется при поддержке гранта РНФ-DST № 16-45-02012-INT/RUS/RSF/12).*

1. Филимонов Д.А., Лагунин А.А., Глориезова Т.А., Рудик А.В., Дружиловский Д.С., Погодин П.В., Поройков В.В. Химия гетероциклических соединений, 2014, № 3, 483-499.
2. Дружиловский Д.С., Рудик А.В., Филимонов Д.А., Лагунин А.А., Глориезова Т.А., Поройков В.В. Известия Академии наук. Серия химическая, 2016, № 2, 384-393.
3. URL [http://way2drug.com/passonline]
4. URL [http://mpds.osdd.net/]

ТРАНСКРИПТОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА

М.И. Шадрин¹, А.Х. Алиева¹, Е.В. Филатова¹, А.В. Карабанов², Е.Ю. Федотова², Н.Ю. Абрамычева², А.В. Росинская³, С.Н. Иллариошкин², П.А. Сломинский¹ ¹Институт молекулярной генетики РАН; ²Научный центр неврологии, Москва; ³Приморская краевая больница № 1, Владивосток, Россия

Болезнь Паркинсона (БП) принадлежит к числу тяжелых неврологических патологий и является одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний человека. При БП выделяют семейную и спорадическую формы. Положительный семейный анамнез наблюдается у 10–15% больных. Но у большинства больных развитие заболевания носит спорадический характер и определяется сложным взаимодействием между генетической конституцией организма и факторами внешней среды. Несмотря на достигнутый прогресс в изучении генетических причин развития БП. В настоящее время до сих пор нет единой картины этиопатогенеза данного заболевания. Для выяснения молекулярно-генетических закономерностей, связанных с развитием патологического процесса при БП, ведется транскриптомный анализ на ранних стадиях заболевания в лимфоциты периферической крови больных, находящихся на ранних стадиях заболевания (1–2 по шкале Хен и Яра). Транскриптомный анализ проводится как с использованием полногеномных технологий (чипы и секвенирование РНК), так и изучения относительной экспрессии отдельных генов. В результате полнотранскриптомного анализа с использованием чипов выявлен ряд кластеров генов, связанных с различными метаболическими процессами. Для трех из них – функционирования митохондрий, убиквитин-зависимого протеолиза и иммунной системы – уже давно получены многочисленные доказательства их роли в патогенезе БП. Были также получены данные, подтверждающие недавно появившиеся сведения о важной роли везикулярного транспорта в развитии БП. Кроме того, был выявлен кластер генов активно, подвергающихся альтернативному сплайсингу. В это кластер главным образом вошли гены, так или иначе вовлеченные в функционирование клеточного транспорта. Получены так же первичные данные РНК секвенированию лимфоцитов монозиготных близнецов, дискордантных по наличию БП. Анализ изменения экспрессии отдельных генов показал, что некоторые микроРНК высоко чувствительны к проводимой терапии при БП, а также был выявлен новый ген ZNF746, относительный уровень мРНК которого повышен более чем в два раза в периферической крови пациентов с БП. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта (грант № 15-04-05606 А).*

СИНТЕТИЧЕСКИЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ ПЕПТИДЫ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ НЕЙРОТРОФИНОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ В МОЗГЕ КРЫС С 6-ГИДРОКСИДОФАМИН ИНДУЦИРОВАННЫМ ПАРКИНСОНИЗМОМ

Е.В. Филатова¹, М.И. Шадрин¹, Т.А. Коломин¹, А.В. Ставровская², С.Н. Иллариошкин², Н.Ф. Мясоедов¹, П.А. Сломинский¹

¹Институт молекулярной генетики РАН; ²Отдел исследований мозга Научного центра неврологии, Москва, Россия

Давно известно, что при болезни Паркинсона (БП), одного из самых распространенных многофакторных нейродегенеративных заболеваний человека, клинические признаки проявляются при гибели приблизительно 60% дофаминергических нейронов компактной части чёрной субстанции. Это свидетельствует о том, в мозге активно протекают различные компенсаторные процессы. В настоящее время всё более очевидным становится тот факт, что важную роль в формировании компенсаторных возможностей мозга могут играть регуляторные пептиды, и в первую очередь – нейропептиды, механизмы действия которых, всё ещё остаются недостаточно изученными. В связи с этим, нами впервые было проведено изучение механизмов действия и возможных нейропротекторных свойств регуляторных пептидов (DNSP-5, Семакса и нового гибридного пептида SD, созданного на основе DNSP-5 и Семакса) с использованием токсической модели БП. В ходе работы было проведено курсовое введение нейропептидов крысам с 6-ГДА-индуцированным паркинсонизмом (правостороннее введение токсина в чёрную субстанцию). В контрольную группу вошли животные с 6-ГДА-индуцированным паркинсонизмом, которым вводили воду. В результате впервые были проанализированы изменения транскрипции генов нейротрофинов (Artn, Bdnf, Gdnf, Ngf) и их рецепторов (Gfra1, Gfra2, Gfra3, Gfra4, Gfral, Ngfr, Ntrk1, Ntrk2) в чёрной субстанции, стриатуме, лобной коре, обонятельной луковице, гиппокампе и мозжечке мозга крыс под влиянием регуляторных пептидов DNSP-5, Семакса и SD. При этом были выявлены значимые изменения экспрессии разных генов в изученных тканях мозга, как на стороне введения токсина, так и на интактной стороне. Таким образом, можно предположить, что регуляторные пептиды (DNSP-5, Семакс и SD) влияют на работу эндогенной системы нейротрофинов и могут формировать компенсаторные возможности мозга. *Работа поддержана грантом РФФИ № 15-34-20862.*

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ БИОГЕНЕЗ, В ТКАНЯХ МОЗГА МЫШЕЙ С МФТП-ИНДУЦИРОВАННЫМИ МОДЕЛЯМИ РАННИХ СТАДИЙ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

А.Х. Алиева¹, М.М. Руденко¹, А.А. Колачева², М.В. Угрюмов², П.А. Сломинский¹, М.И. Шадрин¹

¹Институт молекулярной генетики РАН; ²Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Болезнь Паркинсона (БП) является сложным системным заболеванием и обусловлена нарушением функционирования различных нейромедиаторных систем с выраженным преобладанием недостаточности дофаминергической системы. При этом БП затрагивает практически все отделы нервной системы, что обуславливает сложную и гетерогенную картину клини-

ческих проявлений данного заболевания. Предполагается, что одним из ключевых факторов развития БП является изменение биогенеза и функционирования митохондрий. На это, в первую очередь, указывает то, что ключевые роли при развитии БП, связанные с митохондриальным биогенезом играют белки, кодируемые генами PINK1 и PARK2. Однако изменение функционирования этих генов не описывают весь спектр нарушений, связанных с биогенезом митохондрий при развитии данной нейропатологии. В настоящее время существуют данные о том, что ряд других генов также может быть вовлечен на ранних стадиях в развитие данной патологии. Наиболее оптимальной моделью, воспроизводящей нарушения функционирования митохондрий, являются токсические модели ранних стадий БП у мышей с использованием МФТП. Нами был проведен анализ экспрессии генов Zfp746, Nrfl, Prragc1a, Mybbp1a и Park2, непосредственно связанных с функционированием митохондрий. Исследование проводилось использованием методов обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени. В ходе работы были проанализированы ткани коры, стриатума и черной субстанции мозга мышей с МФТП-индуцированными досимптомной и ранней симптомной стадиями БП. Выявленное нами изменение экспрессии изученных генов в очередной раз подтверждает то, что нарушение митохондриального биогенеза может играть важную роль в патогенезе БП. Наши данные указывают на то, что изменение биогенеза митохондрий может вносить существенный вклад в развитие патологии при БП на самых ранних ее этапах. Так, например, нами было обнаружено выраженное увеличение экспрессии гена Nrfl во всех изученных структурах мозга на досимптомной стадии БП. Это может указывать на то, что данный ген вовлекается в компенсаторные механизмы путем участия в нормализации митохондриального биогенеза. *Работа проводилась при поддержке гранта РФФИ № 16-34-00200.*

ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В НЕВРОЛОГИИ И НЕЙРОФАРМАКОЛОГИИ

И.А. Гривенников¹, Е.В. Новосадова¹, Е.С. Мануилова¹, Е.Л. Арсеньева¹, М.А. Грефенштейн¹, А.М. Зыкова¹, В.В. Симонова³, Л.Г. Хаспекоев³, О.С. Лебедева², М.А. Лагарькова², С.Н. Иллариошкин³, В.З. Тарантул¹, Н.Ф. Мясоедов¹ ¹Институт молекулярной генетики РАН, ²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, ³Научный центр неврологии РАМН, Москва, Россия

Заболевания нервной системы, такие как болезни Альцгеймера, Паркинсона, Гентингтона, инсульты, различные психические патологии являются в настоящее время наиболее распространенными во всем мире. Все эти заболевания связаны с дисфункцией или гибелью различных типов клеток, как в центральной, так и в периферической нервной системе. Лечение данных недугов различными лекарственными препаратами зачастую не приводит к полному выздоровлению, оно лишь замедляет развитие заболевания или частично компенсирует его симптомы, и связано это с тем, что никакие лекарства не могут вернуть к жизни погибшие клетки человеческого мозга. Одним из перспективных подходов к замене больных или восполнению утраченных клеток, как при заболеваниях нервной системы, так и при старении организма является клеточная терапия. Результаты последних исследований открывают новые возможности в области клеточной терапии и исследовании молекулярных и клеточных механизмов патологических процессов. Речь идет о репрограммировании соматических клеток человека в плюрипотентные стволовые (ИПС) клетки, с дальнейшей их дифференцировкой в клетки нервной системы различных типов, а также, в перспективе, с трансплантацией таких клеток пациентам, страдающим различными нейродегенеративными заболеваниями. Таким образом, ИПС клетки могут служить практически идеальным источником материала для индивидуализированной клеточной терапии. Кроме того, пациент-специфические ИПС клетки представляют собой уникальную модель для изучения молекулярных и клеточных аспектов заболеваний нервной системы человека и основу для создания высокопроизводительных тест-систем для скрининга потенциальных лекарственных препаратов с нейротропной (нейропротекторной) активностью. *Данная работа была поддержана грантами: Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий», Российского научного фонда (№ 14-15-01047) и РФФИ (№ 14-08-01089).*

РЕЦЕПТОРЫ TRP КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ С БОЛЬШИМ ПРАКТИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ

С.А. Козлов Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Рецепторы семейства TRP (Transient Receptor Potential) – это неселективные катионные каналы, пропускающие ионы натрия, магния и кальция сквозь клеточную мембрану в ответ на довольно широкий набор химических и физических сигналов. Рецепторы лишены потенциальностивыделительного домена и поэтому не особо чувствительны к изменению мембранного потенциала. Вместо этого TRP рецепторы вовлечены в распознавание огромного количества небольших молекул (хемочувствительность), уровня pH и температуры. С их помощью регулируются важные физиологические процессы в организме, например, такие как: фоторецепция, восприятие феромонов, ощущения вкуса, боли, химических агентов, механорецепция, поддержание тонуса гладких мышц, регуляция кровяного давления. Столь обширная вовлеченность в жизнедеятельность давно поставила TRP рецепторы в ряд наиболее изучаемых молекул в биохимии. Поиск селективных ингибиторов/активаторов/потенциаторов этих каналов направлен, в том числе, и на практическое применение в обозримом будущем таких лигандов в медицине и ветеринарии. Среди 28 известных TRP каналов млекопитающих в лаб. нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН в экспериментах *in vitro* изучаются наиболее интенсивно пока только 6 типов. Это человеческие каналы TRPV3, TRPV4, TRPM8; крысиные каналы TRPV1, TRPA1 и мышинный канал TRPV2. Для части рецепторов перспективные лиганды уже найдены и охарактеризованы, для остальных рецепторов осуществляется интенсивный поиск среди компонентов природных ядов животных и экстрактов лекарственных растений. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №14-24-00118).*

НЕЙРОТОКСИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ НА ПОТОМСТВО

А.В. Арутюнян¹, Л.С. Козина², Ю.П. Милюткина¹, Г.О. Керкешко¹, А.В. Корневский¹, И.В. Залозная¹ ¹НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта; ²Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, Россия

При использовании модели экспериментальной пренатальной гипергомоцистеинемии (ПГГЦ), вызванной метиониновой нагрузкой крыс при беременности, было установлено повышение уровня содержания гомоцистеина не только в крови самок

крыс, но и их потомства. Это сопровождалось снижением веса родившихся крысят и их когнитивных способностей, которые оценивались в водном тесте Морриса. Установлено, что ПГГЦ приводит к десенсибилизации NMDA-рецепторов гранулярных клеток мозжечка, причем токсический эффект гомоцистеина и гомоцистеиновой кислоты на нейроны в этих условиях может реализоваться также через метаболитные глутаматные рецепторы. При введении беременным самкам на фоне метиониновой нагрузки мелатонина или стабилизирующего уровень его содержания трипептида пинеалона (Glu-Asp-Arg), наряду с улучшением способности потомства к обучению, наблюдается снижение уровня активных форм кислорода и количества мертвых клеток в популяции нейронов, выделенных из мозжечка крысят, развивавшихся в условиях ПГГЦ, что подтверждает наличие у этого пептида нейропротекторных свойств и согласуется с ранее полученными нами данными *in vitro* о регуляции им внутриклеточных процессов. При изучении гипоталамической регуляции эстральных циклов у самок крыс, перенесших ПГГЦ, установлено изменение содержания катехоламинов в областях гипоталамуса, ответственных за формирование преовуляторного пика гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ): снижение уровня норадреналина (НА) в медиальной преоптической области (МПО) и повышение уровня дофамина (ДА) в срединном возвышении с аркуатными ядрами (СВ-Арк). При введении мелатонина выраженность отмеченных изменений снижалась, что может быть связано с нейропротекторным действием этого гормона, обусловленным его антиоксидантными свойствами. НА является позитивным регулятором синтеза ГнРГ, а ДА рассматривается как ингибитор секреции ГнРГ в портальную вену гипофиза. Можно полагать, что ПГГЦ путем снижения уровня НА в МПО и повышения уровня ДА в СВ-Арк вызывает подавление синтеза и секреции ГнРГ, а мелатонин может оказывать нейропротекторное действие, ингибируя эти процессы. Полученные данные позволяют рассматривать ПГГЦ в качестве фактора, одним из проявлений нейротоксичности которого является также нарушение гипоталамической регуляции репродуктивной функции у потомства.

ВЛИЯНИЕ МЕЛАНКОРТИНОВ НА ГЕДОНИСТИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ КРЫС В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ

Д.Д. Марков, О.В. Долотов, Л.С. Иноземцева, И.А. Гривенников *Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия*

Воспалительный ответ, влияя на функционирование нейроэндокринной системы организма, приводит к изменению ряда физиологических параметров и поведения. Такие изменения имеют много общего с клинической картиной депрессии. Имунная гипотеза возникновения депрессии является одной из основных, наряду с моноаминовой, нейротрофиновой и нейроэндокринной. Этиология и патофизиология депрессии остаются малоизученными, а терапевтические препараты низкоэффективными. Меланокортины, в связи со способностью проявлять противовоспалительные эффекты, регулировать функционирование ГГНС, а также модулировать уровень нейротрансмиттеров и нейротрофинов, являются потенциальными кандидатами на роль терапевтических препаратов с антидепрессантными свойствами. Целью настоящей работы являлось изучение способности меланокортинов модулировать функционирование ГГНС, оказывать противовоспалительные эффекты, а также влиять на выраженность одного из ключевых симптомов депрессии – ангедонии в условиях системного воспаления, вызванного внутрибрюшинным введением липополисахарида (ЛПС). В результате работы, нами обнаружено увеличение уровней TNF- α и кортикостерона в сыворотке крови животных через 90 мин после введения ЛПС, при этом меланокортины не оказывали влияния на уровень TNF- α и кортикостерона. Однако, через 5,5 ч после введения ЛПС, уровень кортикостерона и TNF- α в группе АКТГ4-10/ЛПС был существенно ниже по сравнению с группой ЛПС. Антагонист меланокортиновых рецепторов (MC3R/MC4R) SHU9119 обращал данный эффект. В ходе работы нами обнаружено ослабление, при введении меланокортинов, снижения предпочтения раствора сахарозы, индуцированного введением ЛПС. Меланокортины не влияли на вызванное ЛПС снижение потребления корма и массы тела животных и экспрессию мРНК медиаторов воспаления в гипофизе и гипоталамусе. Полученные данные указывают на способность периферически введенных меланокортинов модулировать влияние системного воспаления на активацию ГГНС и гедонистическое поведение животных. Это в свою очередь свидетельствует о перспективности дальнейшего исследования потенциала меланокортиновых пептидов с целью разработки на их основе фармакологических препаратов для терапии патологических состояний ЦНС. *Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (13-04-01690) и РНФ (16-15-10199).*

ИССЛЕДОВАНИЕ СОВМЕСТНОГО ДЕЙСТВИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *E. COLI* И ЭКЗАЙТОТОКСИЧЕСКИХ ДОЗ ГЛУТАМАТА НА НЕЙРОНЫ В КУЛЬТУРЕ

А.М. Сурин, З.В. Бакаева, И.А. Красильникова, И.И. Бабкина, О.Ю. Лисина, И.В. Чеботарь, В.Г. Пинелис

Научный центр здоровья детей МЗ РФ; НИИ общей патологии и патофизиологии; Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова; Московский технологический университет, Москва, Россия

Инфекции центральной нервной системы относятся к наиболее тяжелым формам заболеваний в силу неврологических осложнений с длительными последствиями и высокой смертностью. Фрагменты клеточной стенки и экзотоксины бактерий вызывают чрезмерную продукцию провоспалительных и апоптотических сигнальных молекул, приводящих к повреждению и гибели клеток мозга. С другой стороны, показано, что при инсультах, черепно-мозговой травме и некоторых нейродегенеративных заболеваниях развивается гиперстимуляция ионотропных глутаматных рецепторов (глутаматная эксайтотоксичность), которая сопровождается экспрессией воспалительных и проапоптотических факторов, участвующих в механизме действия бактериальных токсинов. В настоящей работе исследовано влияние бактериального эндотоксина (липолисахарида *E. coli*, ЛПС), нейротоксических доз глутамата и сочетанное действие этих факторов на изменения внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) и выживаемость клеток в культивируемых гранулярных нейронах из мозжечка крысы. ЛПС (0,1 и 1 мкг/мл) не влиял на уровень $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в покоящихся нейронах и не увеличивал доли нейронов, в которых глутамат (Glu, 100 мкМ) индуцировал отсроченную Ca^{2+} дисрегуляцию. Однако ЛПС значительно замедлял восстановление пониженного уровня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ после прекращения действия Glu. Деполяризация митохондрий в постглутаматный период показала, что замедление восстановления $[\text{Ca}^{2+}]_i$ связано с повышенным содержанием Ca^{2+} в матриксе митохондрий после совместного действия ЛПС и Glu. ЛПС (1 мкг/мл) и Glu снижали выживаемость культивируемых нейронов мозжечка соответственно на 20% и 60–70%. Сочетанное действие ЛПС и Glu дополнительно понижало долю выживших нейронов до 10–20% по сравнению с одним Glu. Таким образом, впервые показано, что бактериальный эндотоксин ЛПС может усиливать эксайтотоксиче-

ское действие Glu на культивируемые нейроны. Возможно, увеличение токсического действия высоких доз Glu обусловлено повышенным поглощением Ca^{2+} митохондриями в присутствии ЛПС. *Исследование поддержано грантами РФФИ 14-04-90450, 15-04-07885, 16-04-00792 и 16-04-01528.*

ИЗМЕНЕНИЕ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ПОВРЕЖДЕННОГО ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО НЕРВА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПЛЕНОК БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ С ДОБАВЛЕНИЕМ РЕСВЕРАТРОЛА

С.И. Пиняев, М.В. Исакина, В.В. Ревин, А.А. Морозова, Ю.П. Спирина, Е.А. Дуленова

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, Саранск, Россия

В последнее время имеется тенденция к увеличению количества повреждений периферических нервов в связи с ростом производственного и бытового травматизма, а так же дорожно-транспортных происшествий. Неудовлетворительные результаты лечения травматических поражений периферической нервной системы, недостаточность точных данных о механизмах восстановления структуры и функций нервов после их повреждения определяют актуальность проблемы. В последние десятилетия ведется поиск различных биологически активных веществ, способствующих нейропротекции и стимуляции регенерации поврежденной нервной ткани. Ресвератрол широко известен своими антиоксидантными и противовоспалительными свойствами, он также обладает нейропротекторным эффектом в облегчении эксайтотоксичности, улучшает патологические и поведенческие результаты в различных видах травм ЦНС, включая инсульт, черепно-мозговая травма, а также повреждения спинного мозга. Механизм ресвератрол-индуцированной нейропротекции изучен не до конца. В ходе исследования нами было установлено, что при повреждении седалищного нерва жирнокислотный (ЖК) состав фосфолипидных фракций меняется: наблюдается увеличение коэффициента насыщенности во фракциях фосфатидилхолина, фосфатидилинозитола, фосфатидилсерина, сфингомиелина, а также его снижение во фракции фосфатидилэтаноламина. С увеличением послеоперационных сроков наблюдается восстановление ЖК состава, однако соотношение насыщенные/ненасыщенные ЖК все еще существенно отличается от контрольных значений. Использование ресвератрола при повреждении соматических нервов приводит к стабилизации ЖК состава липидных фракций на протяжении всего эксперимента. Следует отметить, что ресвератрол в концентрации 1 мМ в составе пленки с бактериальной целлюлозой (БЦ) обладал более выраженным действием по сравнению с концентрацией 10 мкМ во всех фракциях фосфолипидов. С помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния было выявлено, что ресвератрол в концентрации 1 мМ в составе пленки с БЦ приводит к увеличению упорядоченности жирных кислот, которые являются показателем вязкости мембраны и характеризуют функциональное состояние мембран нервного волокна. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о восстановлении функционирования поврежденного нервного проводника.

НАПРАВЛЕННАЯ ЭЛИМИНАЦИЯ МИЕЛИН-РЕАКТИВНЫХ В КЛЕТОК С ПРИМЕНЕНИЕМ ИММУНОТОКСИНОВ – ЛИГАНДОВ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ

А.В. Степанов^{1,2}, А.А. Белогуров^{1,2} *¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;*

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Рассеянный склероз (РС) – это хроническое нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы аутоиммунной природы, при котором основными аутоантигенами являются белки миелиновой оболочки нервных волокон. В Российской Федерации насчитывается более 200 000 человек, больных рассеянным склерозом. Последние исследования обнаруживают все большую роль В-клеточного звена в развитии и патогенезе РС. Аутореактивные В-клетки не только продуцируют аутоантитела, но также секретируют провоспалительные цитокины и эффективно презентуют специфические аутоантигены Т-клеткам. Современные подходы к терапии РС, включающие введение рекомбинантных антител и других низкомолекулярных агентов, специфически действующих на компоненты иммунной системы, являются крайне затратными для бюджетов развитых стран, а с учетом необходимости длительного лечения ставят под угрозу всю систему реабилитации. Более того, уровни инвалидизации пациентов не дают основания для позитивного прогноза в социальной сфере.

Терапия, направленная на селективную элиминацию патологических аутореактивных В-клеток, потенциально может стать универсальным подходом для лечения целого ряда аутоиммунных заболеваний. В данной работе нами был создан рекомбинантный иммунотоксин на основе константного фрагмента антитела, слитного с иммунодоминантным эпитопом основного белка миелина. В экспериментах, проведенных на животной модели рассеянного склероза – мышах линии SJL/J с индуцированным экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (ЕАЕ), нами было показано, что созданный рекомбинантный иммунотоксин способен направленнно элиминировать популяцию патологических лимфоцитов *in vivo*. Предложенная концепция может лечь в основу дальнейшего развития препаратов для специфической терапии рассеянного склероза и ряда других аутоиммунных заболеваний. *Исследования были проведены в рамках проекта Минобрнауки России № RFMEFI60714X0061.*

ВВЕДЕНИЕ ПЕПТИДОВ ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА, ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ В МАННОЗИЛИРОВАННЫЕ ЛИПОСОМЫ, НОРМАЛИЗУЕТ УРОВЕНЬ ФНО α , ИЛ-2 И ХЕММОАКТРАКТАНТОВ CCL2 И CCL4 В КРОВИ БОЛЬНЫХ РАССЕЯНЫМ СКЛЕРОЗОМ

А. Шмидт¹, Я. Ломакин^{1,2}, А. Белогуров^{1,2} *¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;*

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Рассеянный склероз (РС) – аутоиммунное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся воспалением в центральной нервной системе вследствие разрушения миелиновой оболочки нервных волокон при активном участии Т- и В-клеток. Ранее в нашей лаборатории было показано эффективное подавление развития экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (*experimental autoimmune encephalomyelitis*, ЕАЕ) – экспериментальной модели РС – при введении иммунодоминантных пептидов основного белка миелина (*myelin basic protein*, MBP), заключенных в маннозилированные липосомы (*Xenys*). В рамках успешно завершенной I-IIа фазы клинических испытаний препарата было проведено исследование профиля экспрессии цитокинов в сыворотке крови пациентов с РС, получавших *Xenys*. Полученные данные показывают, что уровни MCP-1/CCL2 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1/C-C motif ligand 2*), MIP-1/CCL4 (*Macrophage Inflammatory*

Protein 1/C-C motif ligand 4), IL-7 и IL-2 в крови статистически значимо понизились ко времени завершения исследования. В свою очередь уровень фактора некроза опухоли альфа (TNF- α), напротив, заметно повысился. Важно отметить, что после введения препарата Хемус уровни исследуемых цитокинов возвращаются к показателям, характерными для условно-здоровых доноров. Выводы, полученные на основе этих данных, являются важной составляющей разработки рекомендаций по клиническому использованию Хемус, а также синопсиса дальнейших клинических испытаний препарата. Исследования были проведены в рамках проекта Минобрнауки России №RFMEFI60714X0061.

РОЛЬ MEK И ERK МИТОГЕНАКТИВИРУЕМЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ЯДЕРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ PPAR α , - β , - γ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ОТВЕТЕ В ПЕРВИЧНЫХ АСТРОЦИТАХ КРЫС

Д.В. Чистяков, А.А. Астахова, М.Г. Сергеева

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В настоящее время перекрестком, регулирующим пересечение метаболизма и воспаления, считают факторы транскрипции, из которых ведущую роль отводят трем изоформам ядерных рецепторов PPAR α , - β , - γ (рецепторы активаторов пролиферации пероксисом). Показано, что PPAR играют важную роль в регуляции воспалительного ответа в мозгу на клеточном уровне. Однако в настоящее время основное внимание в исследованиях уделяется изучению PPAR как мишеней лекарственных средств – агонистов этих рецепторов, в то время как регуляция самих рецепторов PPAR изучена относительно мало. Понимание молекулярных механизмов регуляции этих рецепторов может дать ключ к управлению воспалительными процессами ЦНС.

Поэтому в данном исследовании была поставлена цель изучить процессы регуляции PPAR α , - β , - γ при развитии воспалительного ответа и изучить возможность модулировать активность этих изоформ для изменения характера и направления клеточного ответа. В качестве модуляторов экспрессии PPAR рассматривались ингибиторы ERK и MEK митоген активируемых протеинкиназ, которые предлагаются как перспективные противовоспалительные средства. Моделирование воспалительного ответа в глиальных клетках мозга проводилось на первичных клетках астроцитов крысы. При оценке влияния ингибиторов MAPK на активность и экспрессию PPAR α , - β , - γ в астроцитах клетки прединкубировались 30 минут с тестируемым ингибитором, и затем клетки либо инкубировались без какой-либо обработки либо обрабатывались LPS в течении 4х часов. Уровень экспрессии мРНК PPAR α , PPAR β и PPAR γ измерялся с помощью ПЦР в реальном времени, уровень белка в клетках измерялся с методом иммуноблоттинга. ДКН-связывающая активность определялась методом ИФА в нативных и ЛПС-стимулированных клетках. Нами было получено, что при стимуляции клеток ЛПС не смотря на схожесть изотипов PPAR мРНК PPAR β модулируется ERK и MEK MAPK, экспрессия PPAR α не меняется при ингибировании рассматриваемых MAPK, а мРНК PPAR γ находится под контролем ERK, но не MEK каскада MAPK.

Полученные результаты могут представлять интерес при комбинированном применении синтетических агонистов PPAR и ингибиторов MAPK. Например, сочетание росиглитазона и ERK ингибитора может свести к минимуму снижение экспрессии PPAR γ и усилить противовоспалительное действие агонистов PPAR γ . Такие подходы позволяют снизить действующие концентрации лекарственных средств и уменьшить их токсические воздействия. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-01085 мол_а*.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МЕЛАТОНИНА В ГЛАЗАХ ЯПОНСКОГО ПЕРЕПЕЛА *COTURNIX JAPONICA*

П.П. Зак¹, Н.Н. Трофимова¹, А.Е. Донцов¹, А.Н. Нижник², Е.С. Сименел², Д.А. Белов², Т.С. Гурьева³, А.А. Дадашева³

*¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ²Клиника новых медицинских технологий «АрхиМед», ³ГНЦ Институт ме-
ди-ко-биологических проблем РАН, Москва, Россия*

Исследовано распределение мелатонина в глазах и плазме крови курочек-несушек японского перепела *Coturnix japonica*. В настоящее время во многих лабораториях мира это экспериментальное животное, характерное повышенным метаболическим обменом, прорабатывается как перспективная модель ускоренного старения. Данная работа по исследованию содержания мелатонина в тканях глаза поставлена в связи с известной концепцией ряда авторов о том, что мелатонин является одним значимых геропротекторов организма. Измерения содержания мелатонина проводили наиболее современным методом тандемной хромато-масс-спектрометрии на экстрактах гомогенатов свежeweделенных глазных тканей и в сыворотке крови. Было показано, что среднее содержание мелатонина в сыворотке крови данного животного в ночное время составляет около 300 пг/мл и в дневное время около 10 пг/мл. Эти величины примерно в два раза выше известных для человека. В тоже время оказалось, что в глазах японского перепела содержание мелатонина значительно выше, чем в сыворотке крови, а именно, в ночное время около 7000 пг/мг сыр. веса и в дневное время примерно 1250 пг/мг сыр.веса. В процентном отношении внутриглазной мелатонин был распределен следующим образом: сетчатка 85%, ретиальный пигментный эпителий около 10%, стекловидное тело и собственная сосудистая оболочка примерно по 2–3%. Высокие уровни содержания мелатонина в глазах птиц ранее описаны другими авторами, однако данные о том, что глазной мелатонин сконцентрирован преимущественно в сетчатке, являются новыми. Полученные результаты свидетельствуют о существовании в сетчатке мощной мелатониновой системы, обслуживающей ее собственные нужды. Наиболее вероятным представляется участие мелатонина в противодействии процессам окислительного стресса, крайне выраженным в сетчатке глаза и ее пигментном эпителии. *Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 14-04-01072 и № 15-29-03865.*

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ СЕМАКС И АЛЬФА-МЕЛАНОЦИТСТИМУЛИРУЮЩЕГО ГОРМОНА НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ НЕЙРОНОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Е.В. Новосадова, Е.С. Мануилова, Е.Л. Арсеньева, М.А. Грефенштейн, А.М. Зыкова, И.А. Гривенников

Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

В настоящее время в мире десятки миллионов людей страдают от таких неизлечимых нейродегенеративных заболеваний как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона. Медикаментозное лечение при данных формах патологии либо неэффективно, либо позволяет лишь компенсировать отдельные симптомы болезни, не влияя на течение процесса.

Для изучения молекулярных основ развития данных заболеваний, а также для оценки влияния различных химических веществ на жизнеспособность клеток в настоящее время используют индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) пациентов, страдающих нейродегенеративными заболеваниями. Анализируя и суммируя данные по полученным ИПСК от пациентов не только с разными нейродегенеративными заболеваниями (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, хорей Гентингтона), но даже в рамках одного заболевания, например, хорей Гентингтона (с разным числом САГ-повторов), можно сделать вывод о значительном варьировании в физиологических процессах, в чувствительности к различным повреждающим агентам и к воздействию лекарственных препаратов. Довольно часто изменения, характерные для определенных заболеваний, проявляются по мере дифференцирования ИПСК. Было исследовано влияние пептидов семакс и альфа-МСГ на выживаемость нейронов, полученных из ИПСК пациентов с болезнью Паркинсона (БП) при окислительном стрессе. В работе использовали ИПСК, полученные от трех пациентов с наследственными формами БП, обусловленными мутациями в генах PARK2, PARK8 и двойной мутацией в PARK8 и GBA, а также 2 линии от неврологически здоровых доноров. После дифференцировки ИПСК в нейроны был индуцирован окислительный стресс, вызванный добавлением 100–200 мкМ перекиси водорода. Показано, что количество выживших нейронов при добавлении пептидов в концентрациях 10^{-7} и 10^{-9} М было на 10–15% больше, чем в контроле. Таким образом, мы показали, что независимо от мутаций, приводящих к БП, наблюдается нейропротекторное действие исследуемых пептидов. *Данная работа была поддержана грантом Министерства образования и науки (ГК № 14.604.21.0115, идентификатор: RFMEFI60414X0115).*

ЭФФЕКТ КАТЕХОЛАМИНОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ КИНАЗНЫХ КАСКАДОВ В КЛЕТКАХ НЕЙРОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ SH-SY5Y

Н.Ю. Роговская, Я.А. Дубровский, В.Н. Бабаков *НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА, Санкт-Петербург, Россия*

Культура клеток нейробластомы человека линии SH-SY5Y широко используется в экспериментальной нейробиологии для моделирования нейрональной дифференцировки, метаболизма, нейродегенеративных заболеваний, изучения нейротоксичности и эффективности нейропротекторов. Клетки SH-SY5Y обладают многими характеристиками дофаминергических нейронов и поэтому используются для создания моделей в изучении болезни Паркинсона и других заболеваний. Подобно всем нейротрансмиттерам, катехоламины влияют на функционирование нейронов через активацию внутриклеточных сигнальных киназных каскадов. В работе исследовали эффект дофамина (DA), адреналина (E) и норадреналина (NE) на функциональное состояние ключевых внутриклеточных сигнальных киназных путей в клетках SH-SY5Y. Клетки культивировали в 24-луночных планшетах, дифференцировали ретиноевой кислотой, и инкубировали с катехоламинами в концентрациях 100 нМ, 1 и 10 мкМ. После 30 минутной инкубации получали клеточные лизаты, в которых определяли активные фосфорилированные формы ключевых белков киназных путей с помощью многопараметрической иммунофлуоресцентной технологии Luminescence xMAP с использованием наборов Milliplex Multi-Pathway 9-Plex kit, MAPK/SAPK Signaling 10-Plex Kit, Human Early Apoptosis 7-Plex Kit (Merck/Millipore). E и NE (в концентрации 10 нМ) снижают уровень фосфорилирования следующих белков по сравнению с контролем после 30 мин инкубации Akt (Ser473), BAD (Ser112), Bcl-2 (Ser70), MEK1 (Ser222). DA, E и NE (1–10 мкМ) подавляют фосфорилирование CREB (pS133), ERK (pT185/pY187), p70 S6K (pT412), STAT5A/B (pY694/699). DA (1 мкМ) и E (10 мкМ) подавляют фосфорилирование STAT1 (Tyr707). DA (1 мкМ) подавляет фосфорилирование NFκB (pS536). NE (10 мкМ) приводит к активации каспазы 8 (Asp384), и каспазы 9 (Asp315). DA (100 нМ) активирует фосфорилирование CREB (pS133). NE и DA (100 нМ) активируют фосфорилирование STAT3 (pS727), MSK1 (Ser212). DA, E и NE (1–10 нМ) активируют фосфорилирование ATF2 (Thr71), HSP27 (Ser78), p53 (Ser46), JNK (Thr183/Tyr185), STAT5A/B (pY694/699). Полученные результаты позволяют лучше понять различия в молекулярных внутриклеточных событиях после действия катехоламинов в различных концентрациях, а также определить мишени в киназных каскадах для поиска соединений, обладающих нейропротективным действием.

ДИНАМИКА УРОВНЯ α-КЕТОГЛУТАРАМАТА В ТКАНЯХ ЖИВОТНЫХ С ИНДУЦИРОВАННОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИЕЙ

Е.И. Шурубор, Б.Ф. Красников, Н.Н. Гесслер, Е.П. Исакова, Ю.И. Дерябина

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Одной из причин тяжелых нейродегенеративных расстройств является гипераммониемия как следствие нарушения метаболизации глутамата в мозге. Ключевыми ферментами, обеспечивающими его обмен, являются глутаминтрансаминазы (ГТ), катализирующие реакцию переаминирования глутамата, в ходе которой он превращается в нейротоксический продукт α-кетоглутарамат (αКГМ). αКГМ гидролизует до α-кетоглутарата и аммония с помощью ферментов, известных как ω-амидазы. В основе работы лежит исследование уровня αКГМ в тканях и биологических жидкостях экспериментальных животных, подвергнутых тиоацетамид (ТАА)-индуцированному нарушению функций печени. В качестве экспериментальной модели использовали белых лабораторных крыс линии Wistar (самки, вес 120–140 г), подвергнутых хроническому отравлению гепатотропным ядом ТАА (0,5 г/л) в течение 20 недель эксперимента. Каждые 2 недели производили отбор биологических образцов для последующей оценки уровня αКГМ методом HPLC-анализа. Результаты показали, что в группе подопытных животных по мере развития печеночной патологии отмечалось уменьшение уровня αКГМ. Наиболее значительное снижение (на 250%) регистрировалось в тканях почек (0,12 нмоль/мг сухого веса против 0,29 нмоль/мг сухого веса в контрольной группе). В тканях печени и мозга крыс уровень αКГМ в экспериментальной группе был снижен незначительно. Абсолютные значения αКГМ варьировали в тканях печени крыс в диапазоне 0,72–0,78 нмоль/мг и в тканях мозга в диапазоне 0,24–0,23 нмоль/мг. Содержание αКГМ в плазме крови экспериментальной группы крыс снижалось относительно контроля более чем в 2 раза. уровни αКГМ, ω-амидаза и ГТ-К, поддерживают баланс в метаболизме глутамата, причем промежуточным метаболитами здесь являются αКГМ и α-кетоглутарат (αКГ). Результаты показали, что уровень αКГМ снижался в экспериментальной группе относительно контроля примерно в 3 раза, тогда как содержание αКГ – только в 2 раза, однако общий тренд изменения уровней метаболитов в тканях почек оставался однонаправленным. Делается предположение об использовании αКГМ как маркера тяжести гепатоэнцефалического синдрома. *Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования науки РФ, соглашение № 14.60421.0116 (уникальный идентификатор RFMEFI60414X0116).*

НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МЕЖПОЛУШАРНОЙ АСИММЕТРИИ (БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ИММУННОЙ ЗАЩИТЫ В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ)

В.А. Садова, Е.И. Львовская, Д.Б. Сумная *Уральский государственный университет физической культуры, Челябинск, Россия*

Целью работы являлось изучение динамики изменения содержания цитокинов в крови и ликворе у больных в остром периоде черепно-мозговой травмы (ЧМТ) при право- и левополушарной локализации повреждений при благоприятном и осложненном течении для определения роли межполушарной асимметрии в биохимических механизмах иммунной защиты. Материалы и методы В условиях нейрохирургического центра обследованы больные в остром периоде ЧМТ: 256 с благоприятным течением и 128 с осложнениями воспалительного характера – 98 пневмоний и 30 менингитов. Группа сравнения 20 здоровых. Количественное определение IL-1 β и IL-6 в сыворотке крови и ликворе осуществлялось методикой твердофазного хемотропного иммуноанализа. Результаты. Выявлено, что проявления синдрома межполушарной асимметрии выражаются в различной динамике цитокинового ответа при право- и левополушарной локализации травматического очага. У больных с левополушарной локализацией очагов отмечено незначительное и более позднее повышение IL- β в крови и ликворе, на фоне более выраженного синдрома вторичного иммунодефицита с большим количеством внутричерепных и внечерепных осложнений воспалительного характера. Для правополушарной локализации очагов характерно меньшее общее количество воспалительных осложнений, вероятно, это связано с адекватным нарастанием IL- β в крови и ликворе, с развернутым и выраженным острофазовым ответом в 1-2 сутки заболевания. При данной локализации менее выражен вторичный иммунодефицит, но преобладают аутоиммунные процессы и на фоне общего меньшего числа осложнений воспалительного характера более часто развиваются внутричерепные осложнения. IL-6 крови и ликворе повышался с первых часов после травмы и сохранялся повышенным до 3 недель после ЧМТ; Увеличение показателей IL-1 β и IL-6 в исследуемых средах в сотни раз отмечалось при воспалительных осложнениях (посттравматических менингитах, энцефалитах, пневмониях). Диагностическое и прогностическое значение может иметь параллельное исследование значений цитокинов в крови и ликворе для определения локализации воспалительного осложнения. На основании выявленных изменений был предложен «Способ прогнозирования присоединения воспалительных осложнений в остром периоде черепно-мозговой травмы и способ их профилактики» (Патент РФ на изобретение № 2214602).

РЕГУЛЯЦИЯ РОСИГЛИТАЗОМ ГЕНОВ COX-2 И IL-10 ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ОТВЕТЕ В ПЕРВИЧНЫХ АСТРОЦИТАХ КРЫС

Е.В. Панкевич, Д.В. Чистяков, А.А. Астахова, М.Г. Сергеева

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Росиглитазон (RG) – селективный агонист рецептора PPAR γ , лекарственное средство для лечения диабета II типа, которое предлагается в качестве перспективного регулятора нейродегенеративных заболеваний с выраженной воспалительной компонентой. Ранее в нашей лаборатории было показано, что RG дополнительно усиливает экспрессию мРНК циклооксигеназы 2 (COX-2) и уровня продукта COX-2 простагландина E2 (PGE2) в первичных астроцитах мозга крыс, стимулированных воспалительным агентом липополисахаридом (LPS), действующим через активацию толл-подобных рецепторов. Поскольку в настоящее время активации COX-2 в клетках мозга приписывается как про-, так и противовоспалительное действие, остается неясной способность RG позитивно влиять на развитие и разрешение воспалительного ответа в астроцитах. Поэтому целью данного исследования являлось сравнение регуляции RG экспрессии агента с двойственной функцией в воспалительном ответе COX-2 и противовоспалительного агента – цитокина IL-10 – в первичных астроцитах крыс. Клетки инкубировали в течение 30 минут с RG (10 мкМ), затем стимулировали LPS (100 нг/мл) в течение 4 часов. Стимуляция астроцитов LPS вызывает увеличение экспрессии COX-2, IL-10 на уровне мРНК и белка. RG усиливает LPS-индуцированную экспрессию как COX-2, так и IL-10 на уровне мРНК. Кроме того, RG в условиях воспаления также усиливает выброс астроцитами сигнальных молекул PGE2 и IL-10. Ингибитор p38 MAPK (SB203580, 10 мкМ) препятствует усилению экспрессии COX-2 и IL-10 росиглитазоном в LPS-стимулированных астроцитах, что позволяет предположить действие RG через регуляцию p38 MAPK. Было предположено, что эффект RG связан с возможностью модуляции скорости деградации мРНК. Получено, что прединкубация клеток с RG стабилизируют мРНК COX-2 и IL-10 в LPS-стимулированных астроцитах. Таким образом, нами впервые показано, что одним из механизмов действия RG в астроцитах является регуляция скорости деградации мРНК при стимуляции толл-подобных рецепторов, что может сдвигать клеточный ответ в сторону образования цитокинов, стимулирующих разрешение воспалительного ответа.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-01085 мол_а.

СОДЕРЖАНИЕ ПОЛИАМИНОВ И АКТИВНОСТЬ СПЕРМИНОКСИДАЗЫ В КРОВИ БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ

М.Г. Маклецова, Т.Н. Федорова, М.Ю. Максимова, С.Л. Стволинский, О.И. Куликова

Научный центр неврологии, Москва, Россия

Изучение молекулярных механизмов гибели нейронов при ишемии головного мозга и разработка нейропротекторной терапии являются актуальной проблемой современной нейробиологии. В опытах на животных показано, что при фокальной ишемии головного мозга содержание полиаминов в очаге резко снижается в результате активации ферментов их распада, что приводит к образованию реакционноспособных альдегидов и активных форм кислорода. Значительное увеличение содержания альдегида акролеина вследствие распада полиаминов в зоне инсульта рассматривают как возможный механизм гибели нейронов. В то же время известно, что полиамины обладают нейропротекторным эффектом и снижение их содержания в этих условиях может ограничивать защитное действие. Цель работы – изучение активности сперминоксидазы и содержания свободных и связанных форм полиаминов в плазме и эритроцитах крови больных в остром периоде ишемического инсульта. Обследовано 27 больных в первые 48 часов после развития инсульта. Контрольную группу составили 25 здоровых лиц. Определение содержания свободных и связанных форм полиаминов проводили методом ВЭЖХ. Показано, что в плазме крови больных, по сравнению с контрольной группой, в 2 раза увеличивалась активность сперминоксидазы, вызывающей окисление спермина с образованием конечного продукта - акролеина. В плазме крови и эритроцитах больных отмечалось увеличе-

ние содержания свободных форм полиаминов относительно контроля: путресцина – на 96% и 32%, спермидина – на 131% и 130%, спермина – на 32% и 205%, соответственно. При этом содержание связанных форм полиаминов в плазме крови и эритроцитах больных снижалось: спермидина – на 48% и 50%, спермина – на 36% и 68%, путресцина в эритроцитах – на 38% по сравнению контролем. Таким образом, у пациентов, обследованных в ранние сроки развития ишемического инсульта, наблюдалось значительное увеличение свободных полиаминов в плазме и эритроцитах крови на фоне снижения связанных форм. В свете новой гипотезы о роли полиаминов в регуляции глией нейрональной активности (Скачков С.Н. и др. 2014–2016) можно говорить об адаптивном эффекте увеличения содержания свободных форм полиаминов. Полученные данные указывают на целесообразность включения антиоксидантных препаратов в комплексную терапию ишемического инсульта для нейтрализации альдегидов.

ПРИРОДНЫЙ ДИПЕПТИД КАРНОЗИН – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ НЕЙРОПРОТЕКТОР И КОРРЕКТОР КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ МОЗГА

Т.Н. Федорова, С.Л. Стволинский, Д.С. Бережной, А.А. Девятков, А.В. Лопачев, С.А. Гаврилова, М.М. Морозова, М.Ю. Максимова, С.Н. Иллариошкин *Научный центр неврологии; Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Окислительный стресс (ОС) является одним из ведущих патогенетических факторов нейродегенеративных и сосудистых заболеваний головного мозга, приводящих к повреждению клеточной структуры нервной ткани, развитию неврологического дефицита и снижению когнитивных функций мозга. Протекторами клеток и тканей от ОС служат природные и синтетические антиоксиданты, однако в настоящее время спектр препаратов антиоксидантного действия с доказанной эффективностью, применяемых в комплексном лечении и профилактике заболеваний центральной нервной системы, ограничен. В связи с этим разработка препаратов нейропротекторного действия остается актуальной задачей. Перспективным соединением является природный антиоксидант – нейротрипептид карнозин (β-аланил-L-гистидин). На моделях гипоксии/ишемии головного мозга и паркинсонизма показано, что карнозин препятствует развитию окислительных повреждений в ткани мозга, усиливая эффективность эндогенной антиоксидантной системы. Его нейропротекторное действие проявлялось в уменьшении зоны ишемического повреждения мозга крыс в условиях моделирования необратимой фокальной ишемии, что сопровождалось повышением содержания антиапоптотического белка Bcl-2 и увеличением фосфорилирования киназы Erk 1/2 в прилегающей зоне. На модели МРТГ-индуцированного паркинсонизма у мышей SAMP1 с ускоренным темпом старения карнозин предотвращал развитие ригидности, снижение двигательной и исследовательской активности, модулировал активность супероксиддисмутазы и моноаминоксидазы-B в мозге. Потенцирующее действие карнозина на обучение и память крыс выявилось при выработке условных рефлексов активного и пассивного избегания и сопровождалось коррекцией эндогенной системы антиоксидантной защиты. В пилотных клинических исследованиях введение карнозина в базисную терапию пациентов с хронической ишемией мозга и болезнью Паркинсона повышало эффективность лечения, что проявлялось устойчивым снижением неврологической симптоматики, улучшением когнитивных функций мозга на фоне восстановления антиоксидантного статуса пациентов. Проводимые исследования направлены на разработку новых перспективных препаратов нейропротекторного действия на основе карнозина, способных преодолевать гематоэнцефалический барьер и проявлять заданные свойства при их адресной доставке в мозг.

ВЛИЯНИЕ СОПУТСТВУЮЩИХ МУТАЦИЙ НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИИ БЕТА-ЛАКТАМАЗ ТЕМ-ТИПА

А.М. Егоров, В.Г. Григоренко, М.Ю. Рубцова, И.В. Упоров
Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Бета-лактамазы ТЕМ-типа являются пенициллиназами и цефалоспориноазами и обуславливают устойчивость грамотрицательных бактерий к бета-лактамам антибиотикам. Они относятся к бета-лактамазам, наиболее часто продуцируемых вызывающими внутригоспитальные инфекции бактериями. В настоящее время семейство бета-лактамаз ТЕМ-типа включает 205 ферментов, которые являются мутантными формами бета-лактамазы ТЕМ-1. К настоящему времени мутации описаны в 92 положениях аминокислотной цепи. Несмотря на интенсивные исследования бета-лактамаз ТЕМ типа, установлена роль не более 10–12 % мутаций. Практически все они относятся к так называемым «ключевым» мутациям. Их разделяют на две группы: мутации для расширения спектра субстратной специфичности и мутации, приводящие к устойчивости к ингибиторам бета-лактаманной природы.

Помимо функциональных ключевых мутаций последовательности бета-лактамаз содержат мутации остатков аминокислот, расположенные вдали от каталитического центра и центра связывания фермента, механизм влияния которых не установлен и поэтому в литературе они получили название «сопутствующих». В литературе установлена стабилизирующая роль замены M182T. Нами проведен анализ мутаций по частоте встречаемости у бета-лактамаз с разными фенотипами, сочетаемости с ключевыми и другими сопутствующими мутациями. Для экспериментального исследования выбрана замена Q39K, которая встречается у разных фенотипов бета-лактамаз, связанных с расширением субстратной специфичности (25 ферментов), устойчивостью к ингибиторам (5 ферментов), ферментов смешанного типа (2 фермента). Исследование рекомбинантных форм бета-лактамазы ТЕМ-1 и ее мутантов, содержащих замену Q39K в сочетании с другими мутациями, показало ее дестабилизирующую роль. Методом компьютерного моделирования была выявлена система водородных связей от глутамина 39 до границ активного центра фермента и объяснено изменение термостабильности белка при замене этого остатка на лизин. Работа выполнялась при финансовой поддержке РНФ (Проект № 15-14-00014).

ЛИМФОЦИТАРНЫЙ ФОСФАТАЗОАССОЦИИРОВАННЫЙ ФОСФОПРОТЕИН (LPAP) – ТРАНСМЕМБРАННЫЙ БЕЛОК С НЕИЗВЕСТНОЙ ФУНКЦИЕЙ

А.В. Филатов¹, Н.А. Круглова², Т.Д. Мешкова², М.Г. Завьялова³, А.Т. Копылов³, Д.В. Мазуров¹

¹ГНЦ Институт иммунологии ФМБА, ²Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

³НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Важным регулятором иммунных реакций лимфоцитов является фосфатаза CD45, которая контролирует степень фосфорилирования целого ряда сигнальных молекул. Тем не менее каким образом регулируется активность самой фосфатазы

CD45 остается неизвестным. На роль регулятора CD45 претендует небольшой трансмембранный белок - лимфоцитарный фосфатазоассоциированный фосфопротейн (LPAR), однако точная функция этого белка продолжает оставаться неизвестной. Имеются основания полагать, что молекула LPAR участвует в сигналинге при активации лимфоцитов. Во-первых, LPAR образует межмолекулярный комплекс с фосфатазой CD45, рецептором CD4 и киназой Lck. Во-вторых, LPAR является фосфорилированным белком, причем степень его фосфорилирования меняется при активации клетки. Молекула LPAR интересна также тем, что она не принадлежит ни к одному известному семейству белков.

В настоящей работе была поставлена задача идентифицировать сайты фосфорилирования LPAR, установить условия, в которых они фосфорилируются, и в конечном счете определить специфические киназы и фосфатазы, которые определяют статус фосфорилирования LPAR. Решение этих задач является необходимым этапом в выяснении функции молекулы LPAR. С помощью биоинформационного анализа было определено, что фосфорилированию могут подвергаться 8 сериновых, 1 треониновый и 2 тирозиновых аминокислотных остатка. Двумерный электрофорез показал, что в лимфоцитах наблюдается по меньшей мере 6 фосформов белка LPAR, которые представляют собой набор моно-, ди- и трифосфорилированных форм LPAR. Направленным мутагенезом был получен ряд точечных и делеционных мутантов LPAR, которые были стабильно трансфицированы в Т-клеточную линию СЕМ. Для того чтобы избежать сложностей, связанных с наличием в клетках СЕМ эндогенного белка LPAR, предварительно с помощью системы CRISPR/Cas9 был получен нокаутный вариант СЕМ-LPAR-KO, который в дальнейшем использовался для трансфекции. Сайты фосфорилирования, определенные с помощью мутагенеза, были подтверждены хромато-масс-спектрометрическим анализом (LC-MS/MS). Проведенный ингибиторный анализ позволяет сделать выводы о возможных киназах и фосфатазах, контролирующих статус фосфорилирования LPAR. Полученные данные указывают на участие LPAR в механизмах активации лимфоцитов.

ДИНАМИКА РЕПЕРТУАРА ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ВАКЦИНАЦИИ

Ю.Б. Лебедев *Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

Одним из наиболее универсальных показателей состояния системы адаптивного иммунитета организма является количественная и функциональная вариабельность клонального состава периферических Т-лимфоцитов. Клональная дифференцировка тимусных предшественников, индуцируемая соматической V(D)J рекомбинацией генов Т-клеточного рецептора (ТкР), и клональная селекция наивных Т-лимфоцитов при каждом иммунном ответе организма, формируют многомиллионный пул Т-клонов, составляющих репертуар периферических Т-лимфоцитов. Исследования процессов формирования и развития репертуара ТкР стало возможным в последние годы, благодаря новым технологиям секвенирования всей совокупности зрелых генов ТкР. Оригинальная технология, сочетающая массированное секвенирование кДНК с биоинформатической реконструкцией репертуаров ТкР, использована нами для определения динамики Т-клеточного иммунитета человека при противовирусной вакцинации. В выборку обследуемых вошли 4 пары монозиготных близнецов и одна семейная группа. Вакцинацию проводили живой аттенуированной вакциной YF-17D, культуральной инактивированной вакциной Энцевир и тривалентной инактивированной вакциной Influxak против вирусов желтой лихорадки, клещевого энцефалита и гриппа. 3х месячное обследование вакцинируемого проводили с еженедельным взятием образцов венозной крови, которые фракционировали на полные фракции и отдельные субпопуляции Т-лимфоцитов, включая CD4⁺, CD8⁺, наивные, активированные и клетки памяти. По результатам секвенирования библиотек кДНК для всех временных точек и фракций реконструированы полные репертуары ТкР, исчерпывающее перекрестное сравнение которых проводили с целью идентификации Т-лимфоцитарных клонов, формирующихся при вакцинации. По результатам глубокого сравнительного анализа репертуаров ТкР обнаружена выраженная индивидуальная реакция иммунной системы обследуемых на противовирусную вакцинацию. Идентифицированы и охарактеризованы обширные пулы лимфоцитарных клонов как специфически активируемых, так и снижающих свою представленность в индивидуальных репертуарах ТкР. Выявлены группы высоко гомологичных ТкР, характерных для вновь формирующихся клонов Т-клеток памяти. Обсуждается вклад генетических факторов в развитие иммунного ответа на противовирусные вакцины. *Исследование поддержано грантом РНФ 15-15-00178.*

ПЕПТИДЫ-КАТЕЛИЦИДИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ СИСТЕМЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА И ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПРОТОТИПЫ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

О.В. Шамова^{1,2}, А.Ю. Артамонов¹, П.М. Копейкин¹, С.В. Баландин³, П.В. Пантелеев³, В.А. Юхнев¹, М.С. Жаркова¹, В.Н. Кокряков^{1,2}, Д.С. Орлов^{1,2}, Т.В. Овчинникова³

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; ²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург; ³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Кателицидины – антимикробные пептиды (АМП) системы врожденного иммунитета, содержащиеся в лейкоцитах, клетках барьерных эпителиев и играющие важную роль в противодействии инфекции, а также участвующие в осуществлении разнообразных защитных реакций. Семейство кателицидинов включает АМП разных структур, объединенных в одну группу на основе сходства молекул белков-предшественников. Для ряда пептидов этого семейства, в том числе кателицидина человека LL-37, пролин-богатого АМП PR-39, индолицидина, показан спектр свойств (иммуномодулирующая, ранозаживляющая активность и др.), которые позволяют рассматривать АМП семейства кателицидинов как перспективные прототипы новых лекарственных средств, сочетающих высокую антимикробную, а также иммуномодулирующую активность. Актуальность данного направления исследований обусловлена растущей резистентностью микроорганизмов к применяемым в медицине антибиотикам и наличием многочисленных факторов, приводящих к угнетению функций иммунной системы. Нами исследованы биологические свойства структурно различных АМП из семейства кателицидинов: протегрина 1, имеющего конформацию бета-шпильки, и пролин-богатых линейных АМП бактенецинов (ChBac5, ChBac3.4, miniChBac7.5N). Показано, что каждый из исследованных АМП обладает спектром эффектов, но выраженность свойств пептида зависит от его структуры – для одних характерна более высокая антимикробная активность, другие проявляют цитотоксические эффекты в отношении опухолевых клеток, третьи лишены токсичности, но стимулируют пролиферацию клеток и ускоряют процесс заживления ран у экспериментальных животных. Для выяснения, какие особенности структуры важны для проявления того или иного вида активности исследуемых кателицидинов, в частности АМП группы бактенецинов, созданы их структурные аналоги и

исследованы особенности их биологической активности, включая изменение селективности по отношению к бактериям или малигнизированным клеткам по сравнению с нормальными клетками человека. Полученные данные подтверждают концепцию о многофункциональности кателицидинов и их важной роли в обеспечении защитных функций организма, а также намечают пути для их практического применения в медицине. *Работа поддержана грантом ФЦП. Соглашение с Минобрнауки России №14.604.21.0104 от 05.08.2014 г. RFMEFI60414X0104.*

ЛИПОФИЛЬНЫЕ КАТИОНЫ КАК ИНГИБИТОРЫ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ

Д.А. Кнорре, Е. Беседина, К.В. Галкина, Ю.Е. Караваева, С.С. Соколов, Е.А. Смирнова, О.В. Маркова, Ф.Ф. Северин

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Множественная лекарственная устойчивость патогенных грибов во многих случаях обусловлена повышенной активностью плейотропных ABC-переносчиков, локализованных в цитоплазматической мембране. Эти переносчики способны выкачивать из клетки разные по своей химической природе соединения за счет энергии гидролиза АТФ. Липофильные катионы являются субстратами подобных переносчиков и активно выбрасываются ими из клетки. С другой стороны, липофильные катионы с высоким значением коэффициента распределения октанол/вода ($\log P$) должны эффективно абсорбироваться мембранами клетки и это, в свою очередь, делает выкачивание подобных соединений малоэффективным. Мы предположили, что, варьируя длину боковой группы у алкилированных липофильных катионов, можно подобрать такую молекулу, которая сделает работу ABC-переносчиков по выкачиванию этой молекулы из клетки неэффективной, а так же будет препятствовать выкачиванию других субстратов за счет конкурентного ингибирования ABC-переносчиков. В качестве модельного объекта мы использовали пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Методом генетического скрининга мы показали, что ключевую роль в устойчивости клеток дрожжей к высоким концентрациям липофильного катиона – додецилтрифенилфосфония (C12TPP) является транскрипционный фактор PDR3, активирующий работу плейотропного переносчика Pdr5p. Pdr5p также играл ключевую роль в выкачивании алкилированных родаминов (C2R1, C4R1, C8R1 и C12R1), в то время как другие плейотропные ABC-переносчики выкачивали только некоторые из протестированных соединений. Мы обнаружили, что C8R1 многократно увеличивает токсичность стандартных антимикотиков (клотримазол, миконазол), в то время как другие производные родамина 19 (C2R1, C4R1 и C12R1) значительно менее эффективны. Наши данные указывают на возможность использования алкилированных липофильных катионов для увеличения эффективности действия стандартных антимикотиков против грибов с повышенной активностью плейотропных ABC-переносчиков. *Работа поддержана грантом Российского научного фонда 14-14-00181.*

НОВЫЕ АСПЕКТЫ АКТИВАЦИИ TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 4 В КОСТНОМОЗГОВЫХ МАКРОФАГАХ МЫШИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫМИ ЛИГАНДАМИ НА РЕЦЕПТОРЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

К.В. Корнеев^{1,2}, Е.Н. Свириева^{1,2}, А.Н. Кондакова³, А.А. Круглов¹, М.С. Друцкая¹, С.А. Недоспасов^{1,2}, Ю.А. Книрель³, Д.В. Купраш^{1,2}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН; ²Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ³Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

Изучена корреляция химической структуры липида А с биологической активностью липополисахарида (ЛПС) – агониста рецептора врожденного иммунитета, Toll-подобного рецептора 4 (TLR4). Биологическую активность ЛПС из различных грамотрицательных бактерий определяли путем измерения продукции провоспалительных цитокинов TNF и IL6 после активации различными ЛПС первичных макрофагов, выделенных из костного мозга C57BL/6 мышей и мышей, дефицитных по гену Tlr4. Были определены структурно-функциональные взаимосвязи между химическим строением липида А и биологической активностью ЛПС. Наибольшей биологической активностью обладают ЛПС с гексаацильной формой липида А, в то время как пента- и тетраацильные формы при одинаковых длинах ацильных цепей показывают сниженную активность. ЛПС с относительно более длинными ацильными цепями (C14) в составе липида А имеют большую активность, чем ЛПС с более короткими ацильными цепями (C10-C12), при одинаковой степени ацилирования. Уровень активности ЛПС с более длинными ацильными цепями (C16-C22) ограничивается прежде всего длиной этих ацильных групп, а не степенью ацилирования липида А. При одинаковом качественном и количественном составе ацильных групп ЛПС с фосфатными группами в составе липида А, экранированными катионными заместителями (4-амино-4-дезоксарабинозой, фосфоэтаноламином), имеют более низкую биологическую активность, чем ЛПС с незамещенными фосфатными группами. Также исследована интерференция внутриклеточных сигнальных путей от Toll-подобных рецепторов. Для моделирования бактериально-вирусной коинфекции *in vitro* макрофаги активировали в различных комбинациях агонистами TLR4 и TLR7, которые активируют путь врожденного иммунитета, свойственный бактериальной и вирусной инфекции соответственно. При добавлении агониста TLR7 происходило снижение продукции TNF и IL6 макрофагами в ответ на последующую активацию ЛПС, чего не наблюдалось при обратном последовательном или совместном добавлении. Наиболее сильный эффект иммуносупрессии проявился при моделировании распространенного случая, когда на фоне вирусного заболевания в организме развивается бактериальная инфекция, например, при развитии пневмонии или отита на фоне гриппа.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-01087 мол_а.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА, НАПРАВЛЕННЫЕ К АНТИГЕННЫМ ФРАГМЕНТАМ ПОЛИСАХАРИДОВ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ МИКОПАТОГЕНОВ - БЕТА-ГЛЮКАНУ И ГАЛАКТОМАННАНУ

Н.В. Тикунова, А.Л. Матвеев, Я.А. Хлусевич, Л.А. Кухаренко, И.К. Байков

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

В последние годы у пациентов с ослабленным иммунитетом стали часто регистрироваться грибковые инфекции. Появление штаммов, устойчивых к разработанным антимикотикам, сделало актуальным разработку антигрибковых терапевтических средств нового поколения. Среди патогенных грибов наиболее часто встречаются *Candida albicans* и *Aspergillus* spp. Показано, что антитела против маннана и глюканов, присутствующих в клеточной стенке *C.albicans* могут обладать протективными свойствами. Антитела против полисахаридов клеточной стенки *Aspergillus* spp. к настоящему времени отсутствуют. В связи с этим целью работы являлось получение моноклональных антител мыши (МКА) против синтетических фрагментов

полисахаридов клеточной стенки микопатогенов – бета-глюкана и галактоманнана. Для получения МКА взрослые мыши линии BALB/c были иммунизированы соответственно конъюгатами синтетического бета-глюкана и галактоманнана с бычьим сывороточным альбумином, с использованием адъюванта Фрейнда (антигены синтезированы в ИОХ РАН). Иммунизацию проводили 4 раза с интервалом в 2–4 недели. Эффективность иммунизации контролировали, тестируя сыворотку мышей с помощью ELISA. В качестве антигена использовали соответственно конъюгаты бета-глюкана и галактоманнана с биотинном. Через 3 дня после последней иммунизации клетки из селезенки и лимфоузлов иммунизированных мышей гибридовали с миеломной линией SP2/0. Для отбора целевых гибридом клеток после гибридизации культивировали на селективной среде, содержащей HAT-добавку. После анализа культуральной жидкости на наличие требуемых моноклональных антител с помощью ELISA отдельные клоны были получены методом предельных разведений. Всего получено 5 гибридомных линий клеток, продуцирующих специфические моноклональные антитела против бета-глюкана и 8 линий, продуцирующих антитела против синтетического галактоманнана. Эти гибридомные линии интраперитонеально ввели мышам для получения соответствующих асцитных жидкостей. После хроматографической очистки МКА их сродство к соответствующим антигенам было измерено методом поверхностного плазмонного резонанса. Для дальнейших исследований были отобраны 2 МКА против бета-глюкана и 4 МКА против галактоманнана, продемонстрировавших существенно большую аффинность. *Работа финансировалась по проекту РНФ 16-14-00083.*

НОВЫЙ ИНГИБИТОР МЕТАЛЛО-БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ NDM-1 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ ПАНРЕЗИСТЕНТНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

И.П. Андреева¹, В.Г. Григоренко¹, М.Ю. Рубцова¹, А.М. Егоров¹, А.И. Лев², Н.К. Фурсова², И.А. Дятлов²

¹Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия ²ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Оболensk, Россия

Антибиотикорезистентность бактериальных патогенов – одна из важнейших проблем здравоохранения во всем мире. В последние годы эта проблема стала еще более угрожающей в связи с распространением панрезистентных микроорганизмов. Для ее решения активно развиваются исследования по созданию новых антибактериальных препаратов, включающих ингибиторы факторов резистентности. Основную роль в развитии резистентности к бета-лактамам антибиотикам играют ферменты бета-лактамазы. Среди них металло-бета-лактамазы, относящиеся к молекулярному классу В, характеризуются наибольшей скоростью роста. Эти ферменты содержат один или два атома цинка в активном центре. В 2009 г. была обнаружена металло-бета-лактамаза NDM-1, обладающая высокой каталитической активностью и способностью гидролизовать все бета-лактамы антибиотиков. К настоящему времени описано уже 16 вариантов этого фермента, выделенных в различных географических регионах мира. Нами исследован новый инновационный препарат AM 2015-1, обладающий активностью против металло-бета-лактамаз. Выявлено снижение скорости гидролиза антибиотика меропенема рекомбинантным ферментом NDM-1 в присутствии ингибитора и установлен механизм конкурентного обратимого ингибирования фермента. Значения констант ингибирования в 2–20 раз лучше этих показателей у ингибиторов карбапенемаз, описанных в литературе. Диск-диффузионным методом продемонстрировано, что ширина зоны задержки роста бактериального газона штаммов-продуцентов карбапенемазы NDM 1 *K. pneumoniae* 409 и *K. pneumoniae* 410 меропенемом и имипенемом существенно увеличивается в присутствии соединения AM 2015-1. Было отмечено «уширение» зоны задержки роста в области перекрытия фронтов диффузии карбапенема и ингибитора, характерное для ингибирования фермента. Аналогичный антикарбапенемазный эффект отмечен в отношении штаммов, продуцирующих металло-бета-лактамазу VIM-2 и «сериную» карбапенемазу OXA-48. Методом микроразведений в планшете показано, что минимальные подавляющие концентрации меропенема и имипенема для штаммов *K. pneumoniae*, продуцирующих карбапенемазы, в присутствии соединения AM 2015-1 в концентрации 2М уменьшаются в 4 раза, что соизмеримо с ингибиторным эффектом ЭДТА в концентрации 0,5 М. *Работа выполнялась при финансовой поддержке РФФИ (15-54-74007).*

НОВЫЙ ЛИПИД-ТРАНСПОРТИРУЮЩИЙ БЕЛОК ИЗ СЕМЯН ГОРОХА *PISUM SATIVUM* L. КАК ПИЩЕВОЙ АЛЛЕРГЕН

И.В. Богданов, Т.В. Овчинникова *Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

Растительные липид-транспортирующие белки (LTP) составляют один из наиболее клинически значимых классов пищевых аллергенов. Устойчивая к термической обработке и действию пищеварительных ферментов структура LTP позволяет им достигать кишечника в иммуногенной форме и вызывать сенсибилизацию иммунной системы. Широкая перекрестная реактивность этих белков обуславливает развитие аллергических реакций разной степени тяжести на различные растительные пищевые продукты, пыльцу растений и латекс. Ранее в семенах гороха посевного *Pisum sativum* L. нами было обнаружено подсемейство из трёх новых липид-транспортирующих белков, названных Ps-LTP1-3. Установлены структуры кДНК, кодирующих их белки-предшественники и соответствующие им полные аминокислотные последовательности. Для выяснения возможных биологических функций данных белков методом ПЦР в режиме реального времени изучена экспрессия генов трёх обнаруженных изоформ в различных органах взрослого растения и на разных стадиях его онтогенетического развития. На основании анализа профилей дифференциальной экспрессии генов данных белков высказаны предположения, что биологическая роль Ps-LTP1 заключается в мобилизации запасных липидов семян во время их набухания и прорастания, в то время как другие две изоформы предположительно участвуют в биологических процессах, характерных для растения в целом, например, в транспорте липидов, биосинтезе кутина, защите от фитопатогенов и т.п. Показано, что Ps-LTP1 обладает способностью связывать специфические IgE из сывороток пациентов с пищевой аллергией на бобовые культуры. Установлено, что Ps-LTP1 является новым пищевым аллергеном гороха. Данный белок внесён нами в базу данных по аллергенам (www.allergen.org) Международного союза иммунологических обществ (UIS) под аббревиатурой Pis s 3. Так, горох является четвертым после арахиса, стручковой фасоли и чечевицы бобовым растением, из которого выделены LTP, охарактеризованные как новые аллергены. Вместе с тем, обнаруженный нами Ps-LTP1 является третьим после вицилина и конвицилина пищевым аллергеном гороха посевного *Pisum sativum*. Данный аллерген обладает выраженной устойчивостью к нагреванию и протеолизу в условиях, моделирующих переваривание пищи в ЖКТ. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).*

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТЕЧНЫХ БЕЛКОВ *S. MARCESCENS* SM6

Л.Е. Матросова, Ю.В. Данилова, И.В. Хияс, Т.В. Ширшикова, М.Р. Шарипова, Л.М. Богомольная

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, Россия

Особенную актуальность в медицинской и ветеринарной практике представляет проблема резистентности патогенных микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Антибиотикоустойчивость бактерий значительно снижает эффективность лечебных мероприятий и усугубляет течение инфекционного процесса. Среди механизмов устойчивости к антибиотикам важная роль принадлежит эффлюкс-системам, участвующих в активном транспорте антибиотиков из бактериальных клеток. Недавние исследования показали, что эффлюкс-системы не только повышают устойчивость некоторых бактерий к антибиотикам, но и защищают от токсического действия активных форм кислорода. Целью данной работы явилась оценка роли экстраклеточных белков граммотрицательных бактерий *Serratia marcescens* SM6 от токсического действия активных форм кислорода. Результаты исследования показали, что в условиях оксидативного стресса клетки мутантного штамма *S. marcescens* ΔmacAB теряют жизнеспособность в первые часы культивирования. Данный эффект отсутствовал при совместном культивировании мутантного штамма с диким типом. Антиоксидантный эффект супернатанта дикого типа также был выявлен в процессе культивирования *S. marcescens* ΔmacAB. Для идентификации метаболитов, обладающих защитным эффектом, были получены низко- и высокомолекулярные фракции супернатанта дикого типа. Наибольшей антиоксидантной защитой клеток *S. marcescens* ΔmacAB обладали фракции, содержащие метаболиты с молекулярной массой менее 3 кДа и от 3–10 кДа. Дальнейший анализ фракций методом масс-спектрометрии позволит идентифицировать метаболиты, вовлеченные в процесс антиоксидантной защиты и транспортируемые из клеток через эффлюкс систему MacAB. * Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров" и поддержана грантом Российского научного фонда РНФ 16-14-10200.

РЕГУЛЯЦИЯ ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-33, ВОВЛЕЧЕННОГО В РАЗВИТИЕ ИММУННЫХ ПАТОЛОГИЙ В БАРЬЕРНЫХ ТКАНЯХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

А.М. Муратова *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Москва, Россия*

Цитокин интерлейкин 33 (ИЛ-33), относящийся к семейству ИЛ-1, играет важную роль в хроническом воспалении и аллергических процессах, участвует в запуске иммунного ответа воспалительного, а также цитотоксического типа. Конститутивная экспрессия гена IL33 в фибробластах, клетках эндотелия и эпителии барьерных тканей обеспечивает эффективную защиту организма от инвазии таких патогенов, как макропаразиты и вирусы. Несмотря на очевидную важность данного цитокина для функционирования иммунной системы, о регуляции экспрессии гена IL33 практически ничего неизвестно. Для изучения особенностей регуляции экспрессии гена IL33 на первом этапе с помощью методов биоинформатики мы идентифицировали предположительные регуляторные элементы этого гена, а также однонуклеотидные полиморфизмы в этих областях. Полиморфизмы rs7037276 и rs4742170, ассоциированные с подверженностью ишемическим приступам и с фенотипом умеренного хрипа при астме, соответственно, мы проанализировали с использованием ресурса PERFECTOS-APE. Оказалось, что определенные аллельные варианты rs7037276 и rs4742170, вероятно, негативно регулируют связывание с геном IL33 рецептора глюкокортикоидов (GCR) и рецептора прогестерона (PRGR). Эти белки иногда выступают в качестве транскрипционных факторов или активаторов. Те же полиморфные варианты негативно влияют на возможность связывания фактора SOX4, участвующего в регуляции морфогенеза аорты, желудочков и клапанов сердца. На втором этапе работы мы используем систему с геном-репортером для изучения влияния различных вариантов данных полиморфизмов на функциональную активность предполагаемых регуляторных областей гена IL33 в линии клеток NCIN196 (мелкоклеточная карцинома легких), которая (по данным ресурса CCLE) экспрессирует ген IL33.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ОДИНОЧНОЙ АМИНОКИСЛОТНОЙ ЗАМЕНЫ Q39K НА СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ КЛАССА А ТЕМ-1

В.Г. Григоренко, И.П. Андреева, М.Ю. Рубцова, И.В. Упоров, А.М. Егоров

Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Распространение антибиотикорезистентности в настоящее время, безусловно, связано с антропогенными факторами. Угрозам, связанным с распространением мульти- и пан-резистентных бактерий был посвящен специальный доклад ВОЗ [Antimicrobial Resistance Global Report on surveillance 2014]. Однако явление резистентности бактерий имеет более глубокие корни и намного старше эры использования антибиотиков человеком и отражает борьбу видов за ареол обитания и источники энергии. Наличие широкого полиморфизма у супер-семейства β-лактамаз, по-видимому, играет существенную роль в адаптации и выживании микроорганизмов в изменяющихся внешних условиях. Настоящая работа посвящена изучению механизмов резистентности, обусловленных продукцией бета-лактамаз ТЕМ типа, которые относятся к наиболее распространенному молекулярному классу А и являются наиболее часто мутируемыми из всех описанных типов. У белков данного типа имеется восемь так называемых «ключевых» мутаций, которые приводят к расширению спектра субстратной специфичности (фенотип 2be) и устойчивости к ингибиторам (клавулановая кислота и др.) (фенотип 2br). Нами проведен анализ неключевых, так называемых «сопутствующих» мутаций, роль которых не установлена. Показано, что подавляющая часть «сопутствующих» мутаций затрагивает аминокислотные остатки, расположенные на значительном удалении от активного центра фермента, часть из них является поверхностными. Более подробно был проанализирован остаток глутамина 39, который является наиболее часто мутируемым. В настоящей работе впервые были получены рекомбинантные формы β-лактамаз ТЕМ-1 типа, отличающихся одиночными аминокислотными заменами: Gln39Lys, Met69Val, Glu104Lys, Arg164Ser, Arg244Ser, Arg244Cys, Gln39Lys+Glu104Lys, Gln39Lys+Arg244Ser, Gln39Lys+Arg244Cys, Gln39Lys+Met69Val, Gln39Lys+Arg164Ser. Изучено индивидуальное влияние соответствующих мутаций на каталитические свойства и термостабильность ферментов. Изучение взаимного влияния сочетания таких мутаций на структуру и стабильность ферментов представляет большой интерес и имеет фундаментальное и практическое значение; позволит получить новые знания о природе полиморфизма, а также найти новые способы преодоления резистентности микроорганизмов к антибиотикам. Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (Проект № 15-14-00014).

**ЭФФЛЮКС СИСТЕМА MACAB – ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ МИШЕНЬ ПРИ АНТИБИОТИКОТЕРАПИИ
SERRATIA MARCESCENS SM6**

Т.В. Ширшикова, И.В. Хияс, Л.Е. Матросова, М.Р. Шарипова, Л.М. Богомольная

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, Россия

В последние несколько десятилетий устойчивость бактерий к антибиотикам переросла в проблему всего человечества. В отличие от многих патогенов бактерия *Serratia marcescens* обычно обитает вне организма человека. Тем не менее, была показана способность *S. marcescens* вызывать широкий спектр заболеваний – менингит, инфекции мочеполовой системы, болезни дыхательных путей, эндокардит и сепсис. Лечение таких инфекций затруднено из-за устойчивости *S. marcescens* к большинству классов антибиотиков. Наиболее быстрым способом возникновения антибиотикоустойчивости у грамотрицательных микроорганизмов является активация эффлюкс систем – белковых комплексов, осуществляющих активный экспорт антибиотиков из клетки. Целью исследования явилось изучение роли эффлюкс системы MacAB в защите клеток от антибактериальных препаратов. В настоящее время в клетках *S. marcescens* обнаружено 6 эффлюкс систем. Проведенный биоинформационный анализ геномной последовательности *S. marcescens* позволил выявить новую эффлюкс систему ABC-типа. Эта система не изучена у представителей рода *Serratia*, но гомологична MacAB системе *E. coli*, защищающей клетки от эритромицина и других антибиотиков класса макролидов. Используя методы ПЦР и системы рекомбинации фага λ -ред, был получен мутантный штамм *S. marcescens* SM6 с делецией генов macAB. По данным литературы, штаммы *S. marcescens* имеют переходную устойчивость к аминогликозидам. Мы показали, что мутантный штамм стал чувствительным к аминогликозидам I и II поколения (неомицину, канамицину и гентамицину). Таким образом, нами найдена новая мишень для разработки антимикробных препаратов, которые могут помочь увеличить эффективность антибиотикотерапии. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров" и поддержана грантом Российского научного фонда РНФ 16-14-10200.

АЛЛЕЛЬ ГЕНА H2-AB1 ОПРЕДЕЛЯЕТ УРОВЕНЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* У МЫШЕЙ

М.В. Коротецкая, А.С. Апт, Н.Н. Логунова Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

Многочисленные исследования показали, что уровень восприимчивости к туберкулезу (ТБ) и тяжесть течения заболевания во многом определяются генетическими особенностями хозяина. В использованной нами модели туберкулеза на мышах при сканировании всего генома в хромосомах 3, 9, а также в непосредственной близости от комплекса H2 в хромосоме 17, были картированы три локуса количественных признаков (QTL), участвующих в контроле инфекции. В ходе нашего исследования, мы получили панель новых конгенных, рекомбинантных по МНС линий мышей, у которых различные небольшие участки хромосомы 17 от чувствительной линии I/St (H2j) перенесены на генетическую основу резистентной линии C57BL/6 (B6) (H2b). Это позволило сузить интервал QTL до отрезка 33,77–34,34 Мб, содержащего всего 36 кодирующих белок генов. Клонирование и секвенирование аллельных вариантов этих генов, происходящих от H2j, показали большие полиморфные отличия по сравнению с гаплотипом H2b. У двух рекомбинантных линий мышей, B6.I-249.1.15.100 и B6.I-249.1.15.139, рекомбинация произошла в разных участках одного и того же гена – H2-Ab1 (β -цепь гетеродимерной молекулы H2-A II класса), что привело к полиморфным отличиям в β 1-домене β -цепи у этих двух линий мышей. Различия в этой части гена H2-Ab1 определяли изменение фенотипа при туберкулезной инфекции. Чувствительная линия мышей B6.I-249.1.15.100 характеризуется меньшей продолжительностью жизни, более быстрой потерей массы тела, более высоким уровнем размножения микобактерий в легких и более тяжелой гистопатологией легких по сравнению с более резистентной линией B6.I-249.1.15.139. Было показано, что Т-клетки CD4⁺ распознают микобактериальные антигены исключительно в контексте молекулы II класса H2-A, а уровень IFN γ -продуцирующих Т-клеток CD4⁺ в легких был значительно выше у резистентной линии B6.I-249.1.15.139. Таким образом, мы впервые показали, что классический ген H2-Ab1 класса II участвует в борьбе с туберкулезом. Молекулярное моделирование продукта H2-Aj показало, что замены аминокислот в β -цепи приводят к изменению пептид-связывающей части молекулы МНС. Кроме того, уникальные замены в α - и β -цепях молекулы H2-Aj могут влиять на его взаимодействие с рецептором Т-клеток.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ 5'-КОНЦЕВОЙ ОБЛАСТИ ПСЕВДОГЕНА *PTENP1* У ПАЦИЕНТОК С ГИПЕРПЛАЗИЕЙ И РАКОМ ЭНДОМЕТРИЯ

Т.Ф. Коваленко¹, И.А. Лапина², К.В. Морозова², Л.А. Озолина², Л.И. Патрушев¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия

Мутации в гене опухолевого супрессора PTEN наиболее часто выявляются при раке тела матки (эндометрия). Метилирование промотора гена *PTEN* обнаружено при целом ряде онкологических заболеваний. При раке эндометрия данное эпигенетическое нарушение не было выявлено. Однако статус метилирования значительной части промотора этого гена при указанном заболевании остается неисследованным. Недавно было показано, что процессированный псевдоген *PTENP1* является позитивным регулятором экспрессии гена *PTEN*. Следовательно, можно предположить, что метилирование его 5'-концевой области приведет к подавлению экспрессии гена *PTEN*, что, в свою очередь, будет способствовать малигнизации клеток. При гиперпластических процессах и раке эндометрия анализ статуса метилирования псевдогена *PTENP1* ранее не проводился. Известно, что статус метилирования целого ряда участков генома может изменяться по мере старения организма.

Целью данной работы явился анализ статуса метилирования не исследованных ранее участков промотора гена *PTEN*, а также 5'-концевой области псевдогена *PTENP1* при раке и гиперплазиях эндометрия. В работе были использованы образцы тканей 57 больных раком эндометрия (основная группа, средний возраст – 61,9 $\pm$ 7,8 лет) и 43 пациентки с гиперплазией эндометрия (группа сравнения, средний возраст – 52,1 $\pm$ 6,5 лет). Кроме того, исследовали периферическую венозную кровь 25 больных раком эндометрия. Контрольная группа включала ткани 43 пациенток без гистологических изменений эндометрия, обследовавшихся в связи с подозрением на предраковое состояние и рак эндометрия: 24 женщины в возрасте от 17 до 34 лет

(средний возраст – 24,2±4,8 лет) и 19 пациенток в возрасте от 45 до 65 лет (средний возраст – 52,5±6,0 лет). Геномную ДНК выделяли при помощи стандартных процедур. Статус метилирования гена *PTEN* и псевдогена *PTENP1* исследовали методом метилчувствительной ПЦР. Нами было показано, что промотор гена *PTEN* не метилирован при гиперплазиях и раке эндометрия, а также в тканях морфологически неизмененного эндометрия. В то же время, метилирование псевдогена *PTENP1* было выявлено у 39 из 57 (68,4%) больных раком эндометрия и у 32 из 43 (74,4%) пациенток с гиперплазиями эндометрия. В случае морфологически неизменной ткани эндометрия, взятой у пациенток в возрасте от 17 до 34 лет, метилирование *PTENP1* было обнаружено в одном из 24 образцов (4,2%). Метилирование *PTENP1* было также выявлено у 11 из 19 женщин в возрасте от 45 до 65 лет (57,8%). Ни в одном образце ДНК, выделенной из крови больных раком эндометрия, метилирование *PTENP1* не было обнаружено. Полученные данные позволяют предположить, что метилирование псевдогена *PTENP1* носит соматический характер и может служить маркером возрастных изменений тканей эндометрия. *Работа поддержана грантом РФФИ 14-08-00801.*

РАЗЛИЧНЫЕ МОДАЛЬНОСТИ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ В ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО БЕЛКА ЛАКТАПТИНА: ОТ АПОПТОЗА ДО АУТОФАГИИ

О.А. Коваль^{1,2}, Е.В. Кулигина¹, А.В. Ткаченко¹, Д.В. Семенов¹, О.А. Троицкая^{1,2}, Г.В. Кочнева^{1,3}, А.Ю. Юнусова¹, В.А. Рихтер¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²Новосибирский государственный университет, Новосибирск; ³ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», пос. Кольцово, Россия

Разработка белковых противоопухолевых препаратов является перспективным направлением молекулярной биологии, позволяющим снижать токсичность и повышать таргетность терапии. Ранее было показано, что протеолитический фрагмент каппа-казеина человека лактаптин индуцирует апоптоз клеток различных опухолевых линий и тормозит рост ряда опухолей, трансплантированных на мышей. Не смотря на то, что гибель опухолевых клеток под действием лактаптина была продемонстрирована с применением различных молекулярно-биологических методов, было показано, что апоптоз не являлся единственно возможным исходом, и установление вклада альтернативных активируемых лактаптином путей клеточной гибели/выживания было задачей исследования. Исследование изменения уровня молекулярных маркеров аутофагии (LC3, Atg5, p62, beclin1) в клетках, обработанных лактаптином, показало, что лактаптин индуцирует аутофагию, и образование аутофагосом было подтверждено методом электронной микроскопии. Для выявления про- или антиапоптотической направленности лактаптин-индуцируемой аутофагии мы использовали ряд ингибиторов (хлорокин (CQ), 3-метиладенин и Ku55933) и индукторов аутофагии (рапамицин, спермидин). Мы показали, что только применение лактаптина в комбинации с ингибиторами аутофагии CQ и Ku55933 ведет к повышению цитотоксичности в синергетическом режиме, т.е. аналог лактаптина вызывает аутофагию, направленную на выживание раковой клетки, а ингибирование этого процесса позволяет усилить цитотоксичность лактаптина. Альтернативой классическому апоптозу в борьбе с раковыми клетками в последнее время рассматривают иммуногенный апоптоз. Мы показали, что инкубация опухолевых клеток с аналогом лактаптина RL2 сопровождается изменениями, характерными для иммуногенной клеточной гибели: экспозицией калретикулина на внешней плазматической мембране клетки, выходом АТФ во внеклеточное пространство и снижением уровня HMGB1. Для усиления противоопухолевого потенциала лактаптина, ген лактаптина также был клонирован в геном вируса осповакцины одновременно с геном GM-CSF человека, и было показано, что такой двойной рекомбинант вызывал повышенную активацию каспаз 3 и 7 и обладал большей противоопухолевой активностью *in vivo*, чем вирус, кодирующий только GM-CSF. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-04-01232.*

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ДЕНДРИТНО-КЛЕТОЧНЫЕ ВАКЦИНЫ, НАГРУЖЕННЫЕ СУММАРНОЙ ОПУХОЛЕВОЙ РНК В КОМПЛЕКСАХ С МАННОЗИЛИРОВАННЫМИ ЛИПОСОМАМИ

О.В. Марков¹, Н.Л. Миронова¹, Е.В. Шмендель², М.А. Маслов², М.А. Зенкова¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²Институт тонких химических технологий, Московский технологический университет, Москва, Россия

Дендритные клетки (ДК) являются уникальными иммунокомпетентными клетками, способными запускать противоопухолевые иммунные ответы. Однако до сих пор не решена проблема эффективной доставки опухолевых антигенов (ОАГ) в ДК для достижения высокого уровня презентации ОАГ эффекторным Т-лимфоцитам. С этой целью для доставки опухолевой РНК в ДК мыши использовали маннозилированные липосомы (МЛ), направленные на маннозные рецепторы, экспрессирующиеся на поверхности ДК. МЛ состояли из катионного липида 2X3 (1,26-бис(холест-5-ен-3β-илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорид), липида-хелпера DOPE (1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин) и 2,5, 5 или 10% маннозилированных липоконъюгатов на основе D-маннозы и дитетрадецилглицерина. Было показано, что МЛ высокоэффективно доставляют РНК в ДК мыши. Наиболее эффективным трансфектантом являлись МЛ, содержащие 10% маннозилированных липоконъюгатов с диэтилсваратным линкером 3-[6-(α-D-маннопиранозилокси)гексил]амино-4-{6-[гас-2,3-ди(тетрадецилокси)проп-1-илоксикарбамоил]гексил}аминоциклобут-3-ен-1,2-дион, которые осуществляли доставку РНК в 50% клеток, что было значительно выше трансфекционной активности коммерчески доступного трансфектанта Lipofectamine 2000. ДК вакцины, нагруженные комплексами МЛ с суммарной РНК клеток меланомы В16 мыши (РНК-В16), обладали высоким антиметастатическим потенциалом и приводили к снижению количества легочных метастазов в пять-шесть раз относительно контрольной группы животных, не получавшей лечения. Системное введение комплексов МЛ с РНК-В16 мышам-носителям меланомы В16 приводило к формированию высокоэффективных цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), которые снижали клеточный индекс меланомы *in vitro* с такой же эффективностью (в 2,8 раза), как и ЦТЛ, полученные при введении животным ДК вакцин, нагруженных *ex vivo* комплексами такого же состава. Таким образом, была показана перспективность использования системного введения комплексов МЛ с опухолевой РНК для активации противоопухолевых ЦТЛ. *Работа выполнена при финансовой поддержке НШ-7623.2016.4, РФФИ 13-04-40181-Н, ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям на 2014-2020 годы» (соглашение №14.607.21.0043, уникальный идентификатор RFMEFI60714X0043), Стипендии Президента СП-4766.2016.4.*

РАСТЕНИЕ КАК БИОФАБРИКА АНТИРАКОВЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: АНТИТЕЛО СПЕЦИФИЧНОЕ К ДОМЕНУ ДИМЕРИЗАЦИИ ОНКОБЕЛКОВ HER2/HER3 ПОВЫШАЕТ СПОСОБНОСТЬ ФИТОТРАСТУЗУМАБА ИНГИБИРОВАТЬ РОСТ ОПУХОЛИ

Е.В. Шешукова¹, Т.В. Комарова^{1,2}, В.С. Косоруков^{1,3}, Ю.Л. Дорохов^{1,2}

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН; ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова;

³Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, Москва, Россия

Растение – древний источник лекарства для человека, однако только развитие биотехнологии позволило всерьез рассматривать его как фабрику терапевтических белков, включая антитела [1]. Растительная клетка имеет сходные с животной клеткой механизмы экспрессии белка и его посттрансляционной модификации (гликозилирование, фосфорилирование), поэтому пригодна для продукции антираковых антител человека [1]. Ранее нами с использованием вирусных векторов, доставляемых в растительную клетку агробактерией, было создано рекомбинантное антитело (фитотрастузумаб, ФТ) к онкобелку HER2/neu, биоподобное трастузумабу (герцептин) [2]. Однако появление устойчивых к лечению трастузумабом форм рака молочной железы требует создания фитоантитела, способного узнавать другой, отличный от сайта узнавания ФТ, участок экзоточной части онкобелка HER2/neu. В настоящее время мы разработали систему продукции в растении биоподобного пертузумабу [3] антитела (фитопертузумаб, ФП), препятствующего образованию гетеродимеров HER2/HER3. Анализ аффинности ФП показал его способность специфически узнавать онкобелок HER2/neu *in vitro* и на поверхности HER2-позитивных опухолевых клеток. Полученные данные согласуются с результатами терапии антителами ФТ и ФП мышей Balb/c Nude с перевитой опухолью молочной железы человека SK-BR-3. Исследование роста подкожных ксенографтов выявило значительное терапевтическое действие антител. Причем эффективность совместного использования ФТ и ФП в два раза выше, чем одного ФТ. Мы заключили, что сочетанное применение ФТ и ФП может дать по крайней мере двукратный терапевтический выигрыш. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 16-14-00002 и грантов РФФИ 16-34-00062 мол_а, 14-04-00109_а, 15-34-20014_мол_а_вед, 16-34-60002_мол_а_дк.

1. Komarova et al., 2010. Exp. Rev. Vaccines 9 (8), 859-876.

2. Komarova et al., 2011. PLoS One 6(3), e17541.

3. Harbeck et al., 2013. Breast Care 8, 49–55.

К ВОПРОСУ О БИОХИМИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМАХ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ ГЛЮКОНАТОВ 3d-МЕТАЛЛОВ

О.А. Князева¹, И.Г. Конкина², С.А. Усачев¹

¹Башкирский государственный медицинский университет; ²Институт органической химии УНЦ РАН, Уфа, Россия

Неуклонная тенденция к росту заболеваемости злокачественными новообразованиями обуславливает поиск соединений, обладающих как иммуностимулирующими, так и противоопухолевыми свойствами. Синтезированные нами соединения 3d-элементов – Mn(II), Co(II), Fe(II), Cu(II), Zn(II) с глюконовой кислотой оказывали иммуномодулирующее действие, которое проявлялось в существенном увеличении уровня IgG и их комплексов с C1q (от 75% и более) относительно группы нелеченных животных с индуцированным путем внутрибрюшинного введения циклофосфана иммунодефицитом. В экспериментах на мышах BALB/c с привитой миеломой Sp 2/0 Ag14 были доказаны их противоопухолевые свойства, проявлявшиеся в торможении развития асцита, увеличении продолжительности жизни животных, а также коррекции профиля спонтанного гидролиза C3 компонента комплемента в процессе инкубации сыворотки крови онкобольных с подтвержденными диагнозами рака молочной железы, ходжкинских и неходжкинских лимфом в сравнении с группой здоровых доноров.

Исследование фагоцитарной и метаболической активности нейтрофилов в крови мышей показало значительное, статистически значимое увеличение их способности к фагоцитозу под действием глюконатов металлов: от 47,4% до 138,9%. Наиболее значимое повышение ферментативной активности и потребления кислорода (по показателям спонтанного и индуцированного НСТ-тестов) происходило под влиянием глюконатов марганца и меди: на 44% и 35,5%, 44% и 35% соответственно. Под влиянием других глюконатов данные показатели также увеличивались: цинка на 32% и 32,2%, железа – 12% и 25,4%, кобальта – 20% и 19,4%. Показатель индекса стимуляции повышался в случае глюконата меди на 76,9%, марганца – 69,2%, цинка – 61,5%, железа – 53,8% и кобальта – 46,1%. В то же время, при применении глюконата кальция, наблюдались неизменность или незначительный рост как фагоцитарной, так и метаболической активности нейтрофилов, что указывало на независимость активности глюконатов 3d-металлов от солеобразующего компонента.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что координационные соединения 3d-металлов с глюконовой кислотой проявляют иммуностимулирующее и противоопухолевое действие, восстанавливают метаболическую систему фагоцитоза и могут представлять интерес как корректоры иммунитета, в том числе при процессах канцерогенеза.

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ПРОТЕАСОМ В ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЯХ

И.В. Кондакова, Л.В. Спирина, Е.Е. Шашова, Е.С. Колегова, Э.В. Иванова Томский НИИ онкологии, Томск, Россия

Опухолевые клетки характеризуются высоким уровнем метаболизма, связанным с неконтролируемой пролиферацией и нарушением регуляции многих клеточных процессов. Быстрый обмен белков обеспечивается их деградацией протеолитическими системами, которые играют ключевую роль в сохранности клеточного протеома. Среди внутриклеточных протеаз ведущую роль играют протеасомы – комплексные АТР-зависимые механоферменты, обладающие химотрипсин-, каспаза- и трипсинподобными активностями. В работе изучена химотрипсинподобная активность и субъединичный состав протеасом, а также связь этих показателей с опухолевой прогрессией в различных злокачественных новообразованиях. В исследовании вошли злокачественные опухоли молочной железы, легкого, желудка, толстой кишки, яичников, эндометрия, гортани, почки. Показано увеличение химотрипсинподобной активности протеасом во всех злокачественных опухолях по сравнению с неизмененными тканями, за исключением рака почки. Обнаружена тканевая специфичность содержания общего пула протеасом, которое снижалось во всех исследуемых опухолях по сравнению с прилегающей тканью, кроме рака почки и рака молочной железы. Зарегистрированное повышение содержания субъединиц активаторных комплексов, вероятно, приводит к росту активности протеасом в опухолевых клетках. Также в тканях большинства опухолей возрастает содержание иммунных

протеасом с субъединицами LMP7 и LMP2. Значительное повышение количества этих субъединиц при снижении общего числа протеасом говорит об изменении функционирования протеасомной системы при злокачественной трансформации и, вероятно, играет важную роль в развитии опухолей. Получены результаты, которые показывают значительное изменение химотрипсинподобной активности и субъединичного состава протеасом в злокачественных новообразованиях в зависимости от распространенности первичных опухолей и их метастазирования. Вовлеченность протеасом в опухолевую прогрессию может быть связана с регуляцией содержания многочисленных клеточных белков, что приводит к их инактивации или активации. В представленной работе показаны корреляционные связи и нелинейные зависимости активности протеасом с содержанием ростовых факторов, их рецепторов, транскрипционных факторов, адгезивных и локомоторных белков в тканях злокачественных новообразований.

ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫЕ АНТИГЕНЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

Р.Г. Киямова^{1,2}, О.И. Костянец², К.В. Гавриш², В.В. Филоненко²

¹Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета, Казань, Россия; ²Отдел сигнальных систем клетки Института молекулярной биологии и генетики НАНУ, Киев, Украина

С пониманием гетерогенной природы злокачественных новообразований, в основе которых лежит генетическое разнообразие как следствие нестабильности генома, возникает необходимость поиска новых молекулярных маркеров для возможного их использования в диагностике и терапии онкологических заболеваний. Поскольку иммунная система является сенсором молекулярных нарушений в опухолевой клетке, аутоантитела из сыворотки крови онкологических больных могут быть использованы для идентификации новых молекулярных маркеров злокачественных новообразований. Для идентификации антигенов рака толстой кишки (РТК), рака щитовидной железы (РЩЖ) и медуллярной карциномы молочной железы (МКМЖ) был использован метод SEREX (Serological analysis of recombinant cDNA expression libraries), а именно иммуоскрининг опухолевых кДНК-библиотек сыворотками тех же пациентов, что позволило нам идентифицировать 81 аутологичный антиген. Характеристика их иммунореактивности с сыворотками больных разными типами рака позволила выявить среди них 32 потенциальных ОАА. Анализ 18 ОАА, в частности, оценка иммунореактивности с помощью иммуоферментного анализа сыворотками пациентов с РМЖ разных гистологических типов, изучение локализации и профиля экспрессии в опухолях молочной железы с учетом их гистологических и молекулярно-биологических особенностей позволил выявить несколько потенциальных диагностических, прогностических и предиктивных маркеров РМЖ. Среди них особого внимания заслуживает комбинация (сигнатура) 6 антигенов для определения антител в крови больных РМЖ, которая позволяет дифференцировать здоровых и больных женщин с чувствительностью 70% и специфичностью 91%. Эта комбинация антигенов представляет собой прототип малоинвазивной тест-системы для оценки риска возникновения РМЖ у обследуемых женщин. Идентифицированные нами антигены могут быть использованы не только для создания на их основе диагностических и терапевтических препаратов, но и для изучения и понимания механизмов злокачественной трансформации, опухолевой прогрессии и противоопухолевого иммунного ответа.

РОЛЬ ИЗОФОРМ ТИОРЕДОКСИНА, ГЛУТАРЕДОКСИНА И ПЕРОКСИРЕДОКСИНА В РЕДОКС-ЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССАХ ФОРМИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Е.В. Калинина, Н.Н. Чернов, М.Д. Новичкова, Н. К. Нурмурадов *Российский университет дружбы народов, Москва, Россия*

Редокс-зависимые процессы в значительной степени определяют функциональную активность многих белков и, как следствие, редокс-зависимую регуляцию важнейших в жизнедеятельности клеток функций, таких как пролиферация, дифференцировка, апоптоз. В этой связи большое внимание привлекает изучение тиол-дисульфидной регуляции, осуществляемой редокс-зависимыми белками – тиоредаксином, глутаредаксином, пероксиредоксином. Представленные в данной работе результаты демонстрируют изменения в экспрессии генов изоформ тиоредаксина, глутаредаксина, пероксиредоксина при формировании резистентности клеток аденокарциномы яичника человека SKOV-3 и аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 к цисплатину (цис-диаминдихлорплатина, CDDP). В результате формирования лекарственной устойчивости опухолевых клеток к CDDP наблюдается рост экспрессии генов изоформ тиоредаксина – TRX1, TRX2 и тиоредаксинредуктазы – TRXR1, TRXR2, играющих существенную роль в системе антиоксидантной защиты и в передаче редокс-зависимого сигнала. Значительное повышение уровня экспрессии генов цитозольной и митохондриальной изоформ глутаредаксина – GLRX1 и GLRX2 обнаружено в обоих типах резистентных клеток, что является результатом развития высокого уровня антиоксидантной защиты при формировании резистентности опухолевых клеток к прооксидантному эффекту CDDP, когда начинают активироваться процессы восстановления дисульфидов и смешанных дисульфидов. Во всех типах резистентных клеток установлен рост экспрессии гена изоформы пероксиредоксина Prx6, которая защищает клетки от действия радикалов, H₂O₂, гидропероксидов жирных кислот и фосфолипидов, что способствует усилению клеточной антиоксидантной защиты. Полученные данные свидетельствуют также о большой роли изоформ Prx1, Prx2 и Prx3 в редокс-зависимых механизмах развития устойчивости исследуемых линий клеток к CDDP. Таким образом, обнаруженный эффект скоординированного роста экспрессии генов TRX1, TRX2, TRXR1, TRXR2, GLRX1, GLRX2, PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX6 свидетельствует о важном вкладе этих белков в редокс-зависимые процессы в механизме формирования лекарственной устойчивости опухолевых клеток к CDDP.

МЕТОД ОЦЕНКИ ПАРАПРОТЕИНЕМИИ ПО ИНДЕКСУ М-ГРАДИЕНТА

К.А. Ефетов, Е.В. Паршкова *Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия*

Парапротеинемические гемобластозы – злокачественные опухоли из клеток В-лимфоцитарного ряда, синтезирующие и секретирующие парапротеины (ПП) – моноклональные иммуноглобулины или их цепи. Множественная миелома – наиболее частый парапротеинемический гемобластоз, входящий в список 25 самых распространенных онкологических заболеваний России. На окрашенной электрофореграмме белков сыворотки крови ПП обнаруживаются в виде интенсивного пятна с четкими границами, называемого М-градиентом. Уровень продукции ПП практически всегда отражает массу опухоли. Под-

тверждение моноклональности М-градиента и его типирование производят методом иммунофиксации. Недостатком данного метода является использование дорогостоящих реактивов и импортного оборудования. Нерациональным является и расход антисывороток при повторных иммунофиксациях (после подтверждения моноклонального характера секрета и типирования ПП). В рамках всероссийской программы импортозамещения нами предлагается метод, позволяющий отслеживать количественную динамику парапротеинемии с помощью разработанной компьютерной программы и нового критерия – индекса М-градиента. После электрофореза биологической жидкости в агаровом геле и окрашивания белковых фракций получают цифровое изображение электрофореграммы с помощью обычного сканирования. Затем программа производит выделение области парапротеинового пятна и определяет индекс М-градиента, учитывая площадь пятна и интенсивность окраски всех пикселей, входящих в него. При исследовании нескольких образцов крови (мочи) пациента, взятых в разное время в процессе лечения, можно контролировать уровень продукции ПП и, соответственно, оценивать чувствительность опухоли к терапии. Контроль «ответа» опухоли на терапию делает возможным своевременную коррекцию лечения, что повышает его эффективность и улучшает прогноз. Алгоритм расчета М-градиента защищен авторским свидетельством, отдельные промежуточные результаты внедрены в работу клиник Республики Крым.

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ В ОНКОДИАГНОСТИКЕ: ПОИСК ЭФФЕКТИВНЫХ МАРКЕРОВ В ФОРМАТЕ «ЖИДКОЙ БИОПСИИ»

Е.Ю. Рыкова¹, Е.С. Морозкин^{1,2}, И.А. Запороженченко^{1,2}, А.А. Бондарь¹, А.А. Пономарева³, Н.В. Чердынцева³, В.В. Власов¹, П.П. Лактионов^{1,2} ¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²НИИ патологии кровообращения им. Е.Н. Мешалкина, Новосибирск; ³Томский НИИ онкологии, Томск Россия

Для успешного лечения рака нужны методы, пригодные для скринингового обследования населения, ранней диагностики, оценки эффективности терапии, выявления рецидивов. Перспективной является разработка методов «жидкой биопсии» – анализа «опухолевых» ДНК и РНК, циркулирующих в крови (цирНК). Однако выявление онкоспецифических НК осложняется их низким содержанием в цирНК, фрагментацией цирНК, особенностями метилирования ДНК здоровых тканей. Анализ цирНК здоровых доноров и больных раком предстательной железы (РПЖ), раком легкого (РЛ) проводили при помощи массового параллельного секвенирования и микроэрежа на основе количественной ПЦР. Эффективность тестов повышали путем специфического обогащения НК, использования цирНК, связанных с поверхностью клеток крови (скп-цирНК). Определяли мутации ДНК, статус метилирования ДНК, микроРНК (миРНК). Проведено таргетное секвенирование после бисульфитной модификации 3-х генов в цирДНК крови больных РПЖ на платформе MiSeq (Illumina). Показано, что диагностика РПЖ может быть основана на определении: (1) уровня метилирования отдельных CpG-динуклеотидов и паттернов метилирования отдельных молекул цирДНК, (2) корреляции статуса метилирования CpG-динуклеотидов в составе отдельных молекул цирДНК. Проведено таргетное секвенирование цирДНК крови больных РЛ на платформе MiSeq (Illumina) с использованием разработанной панели маркеров чувствительности к ингибиторам тирозин-киназ (TKI). Минимальная частота достоверно детектированных соматических мутаций составила 0.1%. Чувствительность и специфичность метода составила 89% и 100%. Экспрессия 176-ти миРНК в крови больных РЛ исследована на платформе miRCURY LNA miRNA qPCR Panels Serum/Plasma (Exiqon, Дания). Выбраны 7 маркерных миРНК, диагностическая чувствительность и специфичность панели miR-19b и miR-183 для РЛ составила 93% и 94%. Показана эффективность высокопроизводительных технологий анализа цирНК для поиска диагностических и тераностических маркеров рака. Проводится верификация выявленных маркеров при помощи методов массового анализа и количественной ПЦР на расширенных группах пациентов. *Работа поддержана грантом РФФИ №14-04-01881, грантом №2014-208 по программе П.ИП фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий».*

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО НАЗНАЧЕНИЯ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ БОЛЬНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Н.В. Литвяков^{1,2}, П.В. Казанцева¹, М.М. Цыганов^{1,2}, М.К. Ибрагимова^{1,2}, Е.М. Слонимская¹, Н.В. Чердынцева^{1,2}

¹Томский НИИ онкологии; ²Национальный исследовательский томский государственный университет, Томск, Россия

Цель: разработать и клинически валидировать технологию персонализированного назначения неоадьювантной химиотерапии (НХТ) больным РМЖ, для повышения ее эффективности. Материалы и методы. На ретроспективном этапе было обследовано 68 больных РМЖ, которым проводили НХТ. С ДНК из биопсийных образцов до лечения проводили микроматричный анализ CNV (Copy Number Variation) на чипах CytoScan™ HD Array Affymetrix (USA). Проспективную группу составили 37 пациентов с люминальным В РМЖ, которым НХТ персонализировано назначалась по результатам микроматричного анализа биопсийного материала до лечения. Группу исторического контроля составили 71 больная люминальный В РМЖ, им назначали НХТ по клиническим показателям. Результаты. На первом этапе были идентифицированы маркеры ожидаемой эффективности НХТ, которые дали возможность определять целесообразность ее проведения, а также маркеры на отдельные химиопрепараты для назначения схемы НХТ. Было показано, что при делеции хотя бы одного из локусов генов ABC-транспортеров (ABCB5-3q27, ABCG2-4q22.1, ABCB3-6p21.32, ABCB1-7q21.1, ABCC1-16p11.2) отмечалась 85-100% эффективность НХТ [Litviakov N.V. et al., Oncotarget 2016]. Больные с CNV локусов 1q43, 11q22.1 – 23.3 или 18p11.21 отвечали на НХТ, а у пациентов с нормальным состоянием этих локусов отсутствовал ответ на НХТ ($p=0,000005$) [Литвяков Н.В. и др. 2014]. Амплификация локуса гена TOP2A-17q21.2 обуславливала ответ на антрациклины [Казанцева П.В. и др. 2016]. Делеция локуса гена TUBB3-16q24.3 определяла ответ на таксотер у 67% пациентов. При делеции локуса BRCA1-17q21.31 (у 37% больных) больные хорошо отвечали на схему химиотерапии САХ (75%), но не на таксотер. На основе этих молекулярных маркеров была разработана 2-х уровневая технология персонализированного назначения НХТ. При ее клинической валидации на первом этапе определяли целесообразность проведения НХТ по оригинальным маркерам ожидаемой эффективности. Схему НХТ также подбирали индивидуально. По результатам клинической валидации НХТ была показана 26/37 больных (70%). Эффективность НХТ в группе с персонализированным назначением составила 86% (23/26), против 52% (37/71) в группе контроля ($p=0,0018$ по критерию Фишера).

Работа поддержана грантом РФФИ 15-04-03091 и программой повышения конкурентоспособности ТГУ.

РОЛЬ БЕЛКОВ-КОШАПЕРОНОВ В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ**И.В. Гужова, М.А. Шевцов, Д.А. Мешалкина, Е.Ю. Комарова, Б.А. Маргулис** *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

Повышенный уровень экспрессии молекулярных шаперонов является свойством опухолевых клеток и коррелирует с неблагоприятным прогнозом для большинства видов рака. Главной функцией шаперон Hsp70 (heat shock protein, белок теплового шока) является обеспечение корректной конформации клеточных белков, а его кошапероны, представители семейства J-белков, Hdj1 и Hdj2, помогают ему играть эту роль. В опухолевой клетке повышение уровня Hsp70 приводит к тому, что последняя становится защищенной от любых стрессовых факторов, в том числе от действия противоопухолевых препаратов. Однако, высокий уровень Hsp70 можно использовать для активации противоопухолевого иммунитета, если стимулировать его высвобождение в микроокружение опухоли или на клеточную поверхность (Shevtsov et al., 2014; Abkin et al., 2016). В настоящем исследовании мы демонстрируем, что подавление экспрессии Hsp70, Hdj1 или Hdj2 в клетках высокозлокачественной глиомы крыс С6 с помощью специфических малых интерферирующих РНК ведет к значительным изменениям в физиологии опухолевых клеток. Подавление уровня Hsp70 вызывало замедление роста клеток в культуре и развитие опухолей у крыс, что способствовало увеличению продолжительности жизни животных-опухоленосителей. Подавление экспрессии Hdj2, напротив, привело к усилению агрессивности опухолевых клеток. Будучи введенными в мозг лабораторных животных, эти клетки формировали множественные метастазы, а в культуре демонстрировали такие признаки злокачественности, как повышенная миграционная способность и усиленная инвазивность. Более того, понижение уровня экспрессии Hdj2 в клетках глиомы привело к тому, что стимуляция выхода шаперона из клетки была неэффективна, а шаперонная терапия крыс, несущих опухоль глиомы С6, не дала результатов. Наши данные свидетельствуют, что кошаперон Hdj2 играет существенную роль в процессе опухолевого роста и метастазировании.

МЕТИЛИРОВАНИЕ LINE-1 РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ В ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ДНК КРОВИ ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО**И.В. Гайнетдинов¹, К.Ю. Капицкая¹, Е.Ю. Рыкова^{2,3}, А.А. Пономарева^{4,5}, Н.В. Чердынцева^{4,6}, В.В. Власов², П.П. Лактионов^{2,7}, Т.Л. Ажикина¹** *¹Институт биорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ³Новосибирский государственный технический университет, Новосибирск; ⁴Томский НИИ онкологии, Томск; ⁵Томский политехнический университет, Томск; ⁶Томский государственный университет, Томск; ⁷НИИ патологии кровообращения им. Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия*

Выявление эпигенетических ДНК-маркеров, циркулирующих в крови (цирДНК), перспективно для развития диагностики и терапии рака. Профиль метилирования цирДНК оценивали с использованием подхода, основанного на выделении гиперметилированных фрагментов при помощи ДНК-метил-связывающего белка (Methylated CpG Island Recovery Assay, MIRA). В работе определена значимость для диагностики рака легкого (РЛ) уровня метилирования LINE-1 ретротранспозонов в цирДНК крови методом MIRA в комбинации с количественной ПЦР. Фракцию, связанную с поверхностью клеток крови (скп-цирДНК), получали последовательной обработкой клеток фосфатным буфером с ЭДТА и раствором трипсина из крови здоровых доноров (n=47) и больных раком легкого (РЛ) (n=59) до лечения. Таргетное секвенирование CpG-содержащих фрагментов 5'-UTR LINE-1 семейства ретротранспозонов в составе скп-цирДНК проводили на платформе Illumina HiSeq 2000. Секвенирование целевых фрагментов показало присутствие в составе скп-цирДНК всех LINE-1 подсемейств (L1Ns, L1PA2-4). Соотношение L1 подсемейств у больных РЛ (n=3) не отличалось от здоровых доноров (n=3) в скп-цирДНК до обогащения методом MIRA. После проведения MIRA у здоровых доноров повысилось содержание L1Ns фрагментов в метилированной фракции скп-цирДНК на 4-12%, у больных РЛ оно понизилось на 1-8%. Следовательно, при РЛ в цирДНК происходит значимое снижение уровня метилирования для подсемейства L1Ns, но не для подсемейств L1PA 2-4. Для верификации данных определяли индекс метилирования фрагментов L1Ns методом количественной ПЦР после MIRA-обогащения в скп-цирДНК крови больных РЛ и здоровых доноров. Выявлено статистически значимое снижение уровня метилирования фрагментов L1Ns подсемейства в скп-цирДНК крови у больных РЛ по сравнению со здоровыми донорами (критерий Манна-Уитни, p=0.0012). ROC-кривая (AUC=0.69) показывает перспективность анализа уровня метилирования L1Ns в скп-цирДНК для диагностики РЛ. Полученные результаты говорят о том, что фракция скп-цирДНК является информативным источником материала для диагностики рака с использованием метода MIRA-обогащения. Работа поддержана грантом № 2014-208 по программе П.1П фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий».

ПОИСК ПРОГНОСТИЧЕСКИХ БИОМАРКЕРОВ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА**А.Ю. Цидулко¹, Г.М. Казанская², Д.В. Костромская², Р.С. Киселев², В.В. Кобозев², А.М. Волков², А.С. Гайтан³, С.В. Айдагулова⁴, А.Л. Кривошапкин^{2,3}, Т.Ю. Прудникова¹, Э.В. Григорьева¹** *¹Институт молекулярной биологии и биофизики, Новосибирск; ²Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. Е.Н. Мешалкина МЗ РФ, Новосибирск; ³Европейский медицинский центр, Москва; ⁴Новосибирский государственный медицинский университет МЗ РФ, Новосибирск, Россия*

В последние годы достигнут значительный прогресс в понимании молекулярных механизмов и лечении различных видов рака, однако глиобластома остается типом опухоли с наиболее неблагоприятным прогнозом. В силу высокой молекулярной гетерогенности глиобластом, выбор стратегии их лечения до сих пор остается сложным и его эффективность напрямую скажется на качестве и продолжительности жизни пациентов. В связи с этим огромные усилия направлены на изучение молекулярных механизмов возникновения этого заболевания и определение перспективных биомаркеров прогноза течения заболевания и выбора оптимальной стратегии лечения. В данной работе был проведен сравнительный анализ прогностической значимости потенциальных биомаркеров опухолей головного мозга Ki-67 (уровень пролиферативной активности опухолевых клеток) и протеогликанов CD44 (рецептор гиалуроновой кислоты, маркер стволовых клеток) и CSPG4/NG2 (маркер олигодендроцитов). В работе были использованы образцы опухолей головного мозга человека различных градаций, экспрессия целевых генов была изучена методами ОТ-ПЦР и иммуногистохимического анализа (ИГХ), клиническая информация включала в себя проведенное лечение, наличие рецидивов и продолжительность жизни после постановки диагноза. Было показано, что хотя уровень экспрессии маркера пролиферативной активности опухолевых клеток Ki-67 значительно повышен в клинических образцах глиобластом, он не ассоциирован с прогнозом течения заболевания (p=0,4104). Экспрессия про-

теогликанов CD44 и CSPG4/NG2, ассоциированных в других типах опухолей со стволовыми клетками, в образцах глиобластом показывает высокий уровень корреляции (коэффициент Пирсона 0,954), однако при этом только CSPG4/NG2 достоверно ассоциирован с прогнозом течения заболевания ($p=0,0043$). Высокий уровень экспрессии CSPG4/NG2 (определенный как методом ОТ-ПЦР, так и ИГХ) в глиобластоме является молекулярным признаком агрессивного течения заболевания и возможной устойчивости опухоли к радиотерапии, что позволит оптимизировать стратегию лечения таких пациентов. Таким образом, полученные результаты позволяют предложить CSPG4/NG2 в качестве потенциального прогностического биомаркера при лечении опухолей головного мозга человека. *Работа выполнена при поддержке Российского фонда научных исследований (грант РФФИ № 14-04-01283).*

ВЗАИМОСВЯЗЬ УРОВНЯ ГЕМОПРОТЕИНОВ КРОВИ С ЕЕ ЭЛЕМЕНТНЫМ ГОМЕОСТАЗОМ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ПРИ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Е.И. Ерлыкина¹, Л.М. Обухова¹, И.А. Медяник², К.С. Яшин², Ю.С. Градыкина¹, В.Г. Пименов³, И.И. Евдокимов³, А.Б. Языкова¹

¹Нижегородская государственная медицинская академия МЗ РФ; ²Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр МЗ РФ; ³Институт химии высококислотных веществ им. Г.Г. Десятых РАН, Нижний Новгород, Россия

Цель работы – исследование свободнорадикальной активности, активности каталазы, уровня миоглобина крови и ее элементного гомеостаза при новообразованиях головного мозга. Исследована кровь 11 пациентов со злокачественными и 9 с доброкачественными новообразованиями головного мозга, 15 здоровых людей. Оценивали свободнорадикальную активность, активность каталазы эритроцитов, уровень миоглобина и отдельных элементов в крови. Протеомный анализ проводили по базам данных IntAct, STRING, BioGrid, SwissProt.

Свободнорадикальная активность плазмы крови возрастала (на 389%) в большей степени при злокачественных новообразованиях, чем при доброкачественных (на 120%). Активность каталазы при злокачественных новообразованиях головного мозга увеличивалась более, чем в 8 раз, при доброкачественных – в 3 раза. Причем выявленные изменения возрастали пропорционально размерам опухоли. Активность каталазы в клетках опухоли выше, чем в нормальных астроцитах (Smith et al, 2007). Уровень миоглобина демонстрировал тенденцию к повышению (33,6–76,8 нг/мл). По данным базы данных STRING и G. Minotti с соавторами (1999) показана взаимосвязь между каталазой и миоглобином человека. Наблюдался рост уровня кальция, магния и железа, уровень меди, напротив, снижался. Подобная тенденция изменения элементного гомеостаза характерна и для солидных опухолей (Ерлыкина и др., 2015). Содержания цинка при опухолях головного мозга повышалось от 3 до 10 раз, причем солидные опухоли, наоборот, характеризуются снижением этого микроэлемента в крови. Поглощение цинка клетками глиом в 3–10 раз выше, чем нормальными (Takeda et al, 2001). Корреляционный анализ выявил достоверную зависимость между свободнорадикальной активностью и уровнем Mg ($r=0,381$), Zn ($r=-0,660$), Cu ($r=0,573$). Подобная взаимосвязь, по-видимому, обусловлена ролью этих микроэлементов в работе антиоксидантных ферментов.

Существует взаимосвязь между дисрегуляцией работы гемопротеинов крови, свободнорадикальной активностью и нарушением элементного гомеостаза при новообразованиях головного мозга. Параметры свободнорадикальной и антиоксидантной активности крови могут быть использованы для дифференциальной диагностики

ПРОИЗВОДНОЕ ВИТАМИНА В₆ ИЗМЕНЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ ОНКОМАРКЕРОВ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

О.В. Бондарь, Е.Р. Шахмаева, А.Г. Иксанова, Ю.Г. Штырлин

Казанский (Приволжский) федеральный университет, НОЦ фармацевтики, Казань, Россия

В настоящем исследовании протестировано влияние новосинтезированного производного витамина В₆ – регулятора метаболических путей клеток человека, на экспрессию ключевых онкомаркеров в опухолевых клетках. Клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 длительное время (49 дней) культивировали в присутствии исследуемого соединения. Ежедневно определенное количество клеток отбирали для анализа, в лизатах клеток определяли содержание ключевых онкомаркеров (p53, c-Myc, hTERT, LDH-A, ICAM-1, E-cadherin, VEGFR-2) с помощью белкового иммуноблота. На вторую, третью и пятую неделю культивирования клеток с исследуемым препаратом наблюдали увеличение уровня экспрессии транскрипционного фактора c-Myc, который с одной стороны является активатором роста и пролиферации клеток, а с другой может стимулировать апоптоз. Мы полагаем, что в результате воздействия на клетку исследуемого соединения в первые две недели культивирования происходит активация экспрессии стрессовых белков, а на третью неделю активируется пролиферация клеток. В первую неделю культивирования клеток с препаратом также наблюдали увеличение уровня экспрессии проапоптотического транскрипционного фактора p53. На пятую неделю, однако, произошло значимое уменьшение уровня экспрессии p53, что свидетельствует об ингибировании апоптоза. На начальных этапах культивирования клеток с производным витамина В₆ (третья и четвертая недели) происходит значимая активация экспрессии теломеразы hTERT, которая катализирует удлинение теломерной ДНК в активно делящихся стволовых и иммортализованных клетках. В последующие периоды экспрессия hTERT значимо уменьшается, что более характерно для нормальных дифференцированных клеток. Начиная с четвертой-пятой недели культивирования клеток с препаратом увеличивается экспрессия белков адгезии и межклеточных контактов – E-кадгерина и ICAM-1. Клетки более активно прикрепляются к субстрату и формируют более плотные межклеточные контакты и, следовательно, становятся менее способными к инвазии и метастазированию. Таким образом, в ходе исследования была выявлена способность производного витамина В₆ при длительной инкубации в течение 4–5 недель снижать уровень экспрессии белков адгезии, межклеточных контактов и теломеразы при сохранении активной клеточной пролиферации клеток MCF-7.

РЕДОКС-ЗАВИСИМАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ГЛУТАТИОН-ЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКОВ К ДОКСОРУБИЦИНУ

М.М. Башаров, Е.В. Калинина, Н.Н. Чернов, М.Д. Новичкова, Н.К. Нурмурадов

Российский университет дружбы народов, Медицинский институт, Кафедра биохимии им. Т.Т. Березова, Москва, Россия

Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) опухолевых клеток значительно снижает эффективность химиотерапии, имеет мультифакторную природу. В настоящее время известны различные механизмы развития МЛУ. Однако роль

свободных радикалов в развитии МЛУ остается малоизученной. Актуальное значение имеет изучение взаимосвязи формирования лекарственной устойчивости, состояния клеточного редокс-статуса и уровня свободнорадикальных процессов. Целью данной работы являлась оценка экспрессии генов изоформ GSH-зависимых ферментов: глутатионтрансферазы (GSTP1-1, GSTA4-4), глутатионпероксидазы (GPx1, GPx4) и глутаредоксина (Grx1, Grx2), при формировании резистентности опухолевых клеток к доксорубину, обладающему проокислительным действием. Исследование выполнено на клеточных линиях K562 эритролейкемии человека, MCF-7 карциномы молочной железы человека, SKOV-3 карциномы яичника человека: чувствительных и резистентных к доксорубину клетках. Содержание мРНК определяли методом ОТ-ПЦР. Уровень изоформ GST, GPx и Grx в клетке оценивали методом Вестерн-блоттинга. Содержание восстановленной и окисленной форм глутатиона оценивали спектрофотометрическими методами. Во всех сублиниях резистентных клеток обнаружен рост экспрессии генов GSH-зависимых ферментов: изоформ глутатионтрансферазы (GSTP1-1, GSTA4-4), глутатионпероксидазы (GPx1, GPx4) и глутаредоксина (Grx1, Grx2), играющих существенную роль в антиоксидантной защите клетки. Таким образом, рост экспрессии генов GSH-зависимых ферментов, по-видимому, можно оценивать как важный механизм в развитии адаптивного антиоксидантного ответа на проокислительное действие доксорубина.

ФОРМИРОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ИНДУКЦИИ ИММУНОГЕННОГО АПОПТОЗА РЕКОМБИНАНТНЫМ АНАЛОГОМ ЛАКТАПИНА

О.С. Троицкая, А.В. Ткаченко, Е.В. Кулигина, В.А. Рихтер, О.А. Коваль

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Для ряда химиопрепаратов, таких как доксорубин и оксалиплатин, показано, что апоптоз раковых клеток сопровождается испусканием определенной комбинации аларминов (DAMPs), которые узнаются клетками иммунной системы, инициируя долгосрочную противоопухолевую иммунную реакцию. Такой тип апоптоза был назван иммуногенным апоптозом, а основными аларминами являются калретикулин, экспонированный на внешней стороне плазматической мембраны клетки, и появление АТФ и ядерного белка HMGB1 во внеклеточном пространстве. Индукция такого типа клеточной гибели является преимуществом указанных противоопухолевых препаратов, направляющих иммунную защиту организма против раковых клеток. Поэтому поиск новых индукторов иммуногенной клеточной гибели является актуальной задачей. Лактапин, протеолитический фрагмент каппа-казеина человека, вызывает гибель раковых клеток в культуре по типу апоптоза и тормозит рост перевиваемых опухолей у экспериментальных животных. Целью работы являлось изучение возможности применения рекомбинантного аналога лактапина (RL2) в качестве индуктора иммуногенной гибели клеток. Методом проточной цитометрии показано, что при инкубации раковых клеток MCF-7, MDA-MB-231 и MX-7 с RL2 происходит увеличение популяции клеток, экспонирующих CRT на внешней мембране, характерное для иммуногенного апоптоза. Также показано RL2-зависимое увеличение уровня внеклеточного АТФ для клеток MDA-MB-231 и MX-7. Методом вестерн-блота было установлено, что в процессе инкубации с RL2 в клетках и MX-7 происходит уменьшение клеточного эндо-HMGB1. Таким образом, показано, что рекомбинантный аналог лактапина RL2 способен к индукции иммуногенного апоптоза *in vitro*. Интересно также было применить RL2 в качестве индуктора иммуногенной клеточной гибели для разработки метода противоопухолевой вакцинации. Клетки MX-7, с индуцированным в них препаратом RL2 апоптозом, трансплантировали мышам СЗН/Не. Выживаемость мышей, иммунизированных клетками, обработанными доксорубином в финальной точке эксперимента составила 100%, в случае обработки RL2 были живы 67% животных. В конечной точке эксперимента в группе RL2 из 75% мышей не было опухолей, для группы с доксорубином – у 50% животных не было опухолей. Таким образом, RL2 способен к индукции иммуногенного типа клеточной гибели *in vivo*.

ЭКСПРЕССИЯ HIF-1 α - И AhR-ЗАВИСИМЫХ ГЕНОВ В ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ МЕНИНГИОМАХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ

М.Л. Перепечева, Е.В. Воронцова, С.М. Пятов, А.Ю. Гришанова

НИИ молекулярной биологии и биофизики, Новосибирск, Россия

Гипоксия определяет многие аспекты развития, ангиогенеза и роста злокачественных опухолей, обеспечивая выживаемость злокачественных клеток, влияя на структуру ДНК, экспрессию генов, сигнальные пути; изменяя процессы апоптоза, ангиогенеза, гликолиза, контроль клеточного цикла. Точное соотношение между гипоксией и развитием опухоли пока неясно, еще менее понятна роль гипоксии в развитии и росте доброкачественных опухолей. Менингиомы, возникающие из клеток арахноидотелия, – самые распространенные доброкачественные внутричерепные опухоли. Доброкачественные менингиомы (Grade I по классификации ВОЗ – WHOGr1) составляют 90% всех менингиом. Центральную роль в механизме развития гипоксии играет индуцируемый гипоксией транскрипционный фактор HIF-1 α и регулируемые им сигнальные пути. HIF-1 α в ядре образует комплекс с белком ARNT, ядерным переносчиком арилгидрокарбонового рецептора (AhR), который может конкурировать за ARNT с HIF-1 α . Комплекс HIF-1 α -ARNT связывается с гипоксия-ответственными элементами HRE в промоторах генов, продукты которых опосредуют ангиогенез, метаболизм глюкозы, клеточную пролиферацию. Известно, что AhR участвует в молекулярных каскадах, которые приводят к торможению пролиферации, дифференцировки и апоптоза. Целью работы было исследование в клетках доброкачественных менингиом HIF-1 α - и AhR-зависимых сигнальных путей для выявления молекулярных основ прогрессирующего развития доброкачественных внутричерепных менингиом человека. Для этого методом ПЦР в реальном времени оценили уровень мРНК генов HIF-1 α , AhR, ARNT; генов-мишеней HIF-1 α : VEGF-A, GLUT1 и c-MYC. Метод кластерного анализа выявил группу менингиом с низким и высоким относительным уровнем мРНК HIF-1 α ($3,8 \pm 0,5$ и $25,3 \pm 10$). В группе с высоким HIF-1 α также были увеличены уровни мРНК ARNT (в 2,5 раза), c-MYC (в 11 раз) и GLUT1 (в 25 раз). Экспрессия генов AhR и VEGF-A в данных группах не различалась. Эти группы имели различное гистологическое строение. Группу с низким уровнем мРНК HIF-1 α составили менинготелиоматозные и фибробластические менингиомы, а в группе с высоким уровнем мРНК HIF-1 α представлены менингиомы смешанного строения. Работа поддержана грантом РФФИ № 16-04-00754.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ БЕЛКА PIWIL2 В ГЕРМИНОГЕННЫХ ОПУХОЛЯХ ЯИЧКА

С.А. Кондратьева, И.В. Гайнетдинов, Ю.В. Скворцова, Е.А. Стукачева, Т.Л. Ажикина

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Герминогенные опухоли яичка (testicular germ cell cancers, TGCCs) образуются в результате онкологической трансформации зародышевых клеток полового пути и подразделяются на семиному (SE) и несеминому (NS). SE характеризуется профилем экспрессии, схожим с зародышевыми герминальными клетками, а NS более дифференцирована. Причинами развития TGCC считаются нарушения в дифференцировке, миграции и созревании первичных половых клеток. Принимающие активное участие в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов белки семейства PIWI играют важную роль во множестве клеточных процессов, таких как защита генома от активности транспозонов во время сперматогенеза, поддержание стволовых клеток и стабилизация эпигенетического состояния. Дисрегуляция экспрессии некоторых белков этого семейства наблюдается в опухолевых тканях, в частности, нами обнаружены новые короткие изоформы белка PIWIL2, специфически экспрессирующиеся в герминогенных опухолях, тогда как полноразмерный PIWIL2 преимущественно экспрессируется в герминальных клетках. В данной работе помимо нормальных и опухолевых тканей были изучены прилегающие к TGCT ткани яичка, представляющие собой промежуточные стадии перехода к опухоли. Анализ экспрессии маркера герминальных клеток DDX4 показал, что сперматогенез продолжается в тканях, прилегающих к несеминоме, но не к семиноме. Аналогично, уровень экспрессии белков семейства PIWI и степень метилирования промоторной области ретротранспозонов L1 выше в тканях, прилегающих к несеминоме по сравнению с семиномой. Снижение уровня экспрессии PIWIL2 (нокдаун с использованием siRNA) в клеточной линии Tera1 приводит к гипометилированию и снижению уровня экспрессии L1, что указывает на функциональную связь между экспрессией PIWIL2 и метилированием промоторной области ретротранспозонов L1. Полученные результаты позволяют предположить участие PIWIL2 в образовании двух разных типов TGCT. *Работа поддержана Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и грантом РФФИ №16-34-01193_мол_а.*

ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩАЯ ФУНКЦИЯ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК КРОВИ И ЕЕ ВЗАИМОСВЯЗЬ С ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕПАРАНАЗЫ-1 ПРИ ЖЕЛУДОЧНОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

А.И. Аутеншлюс^{1,3}, С.А. Архипов³, С.В. Айдагулова³, Е.С. Михайлова¹, Н.А. Вараксин², А.В. Ванхальский¹

¹Институт молекулярной биологии и биофизики, Новосибирск; ²ЗАО «Вектор-Бест», п. Кольцово, Новосибирская область;

³Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия

В настоящее время многие авторы отмечают неоднозначную роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований, условно подразделяя их на «провоспалительные» и «противовоспалительные». Помимо цитокинов к факторам, способствующим опухолевой прогрессии, в последнее время относят гепараназу-1, которая рассматривается и как маркер, характеризующий злокачественность опухоли, и как фактор, участвующий в опухолевой прогрессии. Кроме того, гепараназу-1 играет важную роль в расщеплении углеводных молекул гепарансульфатов, высвобождая при этом депонированные ими цитокины и факторы роста, стимулирующие пролиферативную активность клеток опухоли и процессы опухолевого ангиогенеза. Целью исследования явилось изучение взаимосвязи между цитокин-продуцирующим потенциалом иммунокомпетентных клеток крови (ИКК) и экспрессией гепараназы-1 при аденомах и аденокарциномах желудка. Исследовали спонтанный и стимулированный поликлональными активаторами цитокинпродуцирующий потенциал ИКК периферической крови 32 больных с аденомами и 36 больных с аденокарциномами желудка, значения которого выражали с помощью индекса влияния поликлональных активаторов (ИБПА) на продукцию цитокинов. У больных с аденомами желудка показатели ИБПА на продукцию IL-1Ra, TNF- α , IL-18, IFN- γ превышали величины аналогичных показателей больных с аденокарциномами. Пределы вариабельности экспрессии гепараназы-1 в эпителии аденом составили интервал величин 0,27–3,00; в строме аденом – 2,27–11,48. Пределы вариабельности экспрессии гепараназы-1 в аденокарциномах (по % суммарно окрашенной площади) в значительной степени варьировал – от 1,79 до 14,26, что было обусловлено наличием больных с различными вариантами дифференцировки аденокарцином. Установлено, что величина показателя экспрессии гепараназы-1 находилась в прямой корреляционной связи с количеством регионарных лимфоузлов с метастазами. С помощью многомерного анализа была выявлена каноническая корреляция между величинами экспрессии гепараназы-1 в эпителии аденом и ИБПА на продукцию IL-2, IL-6 и IL-8, IL-18, IL-18BP, IL-8. Также выявлена каноническая корреляция между экспрессией гепараназы-1 в строме аденом и ИБПА на продукцию IL-1Ra, TNF- α , IL-18. Полученные данные свидетельствуют о существовании молекулярно-клеточных механизмов, опосредованных цитокинами и гепараназой-1, с общим вектором действия, обеспечивающим опухолевую прогрессию.

ОСОБЕННОСТИ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК (A549 И NCI-H322M) В УСЛОВИЯХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СТРЕССА

З.И. Абрамова, Ю.А. Топчу, С.Н. Абрамов *Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

Результаты исследований апоптотического аппарата и программ, используемых раковыми клетками с целью избежать апоптоза, получили признание в последнее десятилетие. Однако, наиболее значимые успехи достигнуты после изучения аутофагии. Активация апоптоза может сопровождаться усилением аутофагии, ведь в первую очередь аутофагия выступает как цитопротекторный механизм. Установлено, что аутофагия часто активируется в результате действия противоопухолевых средств, что может как ограничивать их эффективность, так и способствовать гибели клеток. Цель исследования – характеристика ПКГ опухолевых клеток в условиях физиологического стресса. Объектами исследования были три клеточных линии: HSF, A549 (wTP53) и NCI-H322M (mTP53, 8 экзон). Анализ дотплотов клеток линий A549 и NCI-H322M показал, что в клоне клеток A549 живые клетки (An-/PI-) к 12 суткам культивирования составили 62,9% против 37,3% клеток линии NCI-H322M. Для клеток линии NCI-H322M характерен более высокий процент клеток на стадии позднего апоптоза (55,3%, против 36,5% клеток линии A549), что позволило предположить вклад аутофагии в выживание клеток. Электронно-микроскопический анализ клеток линий A549 показал большое количество омегасом, которые в процессе культивирования клеток превращались в аутофагосомы и аутофаголизосомы. На микрофотографиях клеток линии NCI-H322M, которая имеет

точечную мутацию в 8 экзоне гена TP53, процесс аутофагии (в виде формирования везикулярных вакуолей) практически отмечен не был. Однако, клетки данной линии отвечают высокой апоптотической активностью. Анализ профиля экспрессии Bcl2-белка и mTOR-киназы методом иммуноблотинга с учетом морфологических показателей выявил, что для клеток линии A549 характерно снижение экспрессии анти-апоптотического белка Bcl-2 и повышение экспрессии киназы mTOR. Отсутствие индукции аутофагии в клетках линии NCI-H322M, можно объяснить нарушением транскрипционной функции p53 по отношению к гену Ras. Молекулярные механизмы, которые контролируют решение, запустить один или оба этих процесса в ответ на специфические стимулы, остаются в большей степени, неизвестными.

МЕХАНИЗМЫ ПРОАПОПТОТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ N-АЦИЛДОФАМИНОВ НА КЛЕТКИ ЛИНИИ ФЕОХРОМОЦИТОМЫ PC12

А.М. Ашба, М.Г. Акимов, Н.М. Грецкая, В.В. Безуглов

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН Москва, Россия

N-ацилдофамины – семейство эндогенных амидных производных жирных кислот, взаимодействующих с ключевыми белками каннабиноидной и ванилоидной систем. Ацилдофамины оказывают цитотоксическое действие на опухолевые клетки, однако его механизм неизвестен. Целью данного исследования было определение механизма цитотоксического действия природных N-ацилдофаминов на клетки феохромоцитомы PC12 и выявление возможности использовать N-ацилдофамины как новые цитотоксические и цитостатические препараты. Клетки растили в стандартной среде, рекомендованной ATCC. Оценку пролиферации и гибели клеток проводили с помощью МТТ-, LDH-тестов и набора CyQuant, для выяснения механизма цитотоксического действия ацилдофаминов был проведен ингибиторный анализ с использованием ингибиторов биологических мишеней данных соединений и киназ, потенциально вовлеченных в передачу внутриклеточного сигнала, для выяснения механизма клеточной гибели использовали флуоресцентный краситель AroTgase, измерение активности каспаз, анализ фрагментации ДНК, для подтверждения наличия NO-синтазы проводилась ОТ-ПЦР мРНК NO-синтазы, также проводилось измерение уровня внутриклеточного оксида азота посредством реакции Гриса и измерение уровня АФК. Полулетальные дозы NADA находились в диапазоне от 4 до 65 мкМ. Для производных NADA значения полулетальных доз, полученные в LDH-тесте превышали значения, полученные в МТТ-тесте. Возможное объяснение этих различий заключается в том, что данные вещества оказывают двухфазный эффект на клетки: в более низких концентрациях происходит остановка пролиферации (в особых случаях индукция дифференцировки), а повышение концентрации ацилдофаминов приводит к гибели клеток. Из используемых ингибиторов защитное действие оказывали аскорбат и N-ацетил-L-цистеин. Было выявлено, что клетки гибнут по пути апоптоза, причем апоптотический каскад развивается по каспаза-зависимому пути в результате индукции окислительного стресса опосредованного индукцией NO-синтазы. В зависимости от концентрации, NADA оказывали анти-пролиферативное и цитотоксическое действие. Цитотоксическое действие NADA зависело от структуры молекулы и требовало наличия незамещенной катехольной группы и оптимального расстояния между бензольным кольцом и остатком жирной кислоты. В случае использования данных соединений в качестве противоопухолевых препаратов целесообразно использовать более высокие концентрации веществ, для того чтобы они оказывали не только антрипролиферативный эффект, но и цитотоксический.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МИКРОЧИПЫ В ДИАГНОСТИКЕ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

О.Э. Лосев, В.Б. Бородулин, И.А. Утц, Е.Г. Чеботарева, Д.С. Джумагазиева, Е.В. Бобылева, Н.Ю. Русецкая, Н.А. Бельская

Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского МЗ РФ, Саратов, Россия

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) составляет в онкологической патологии в педиатрии до 75% гемобластозов. При определении класса лейкоза учитываются цитогенетические и молекулярно-биологические свойства опухолевых клеток, их морфологические свойства, а также уровень дифференцировки (классификация ВОЗ, 2011 г.). Иммунологические маркеры CD (кластеры дифференцировки) указывают на степень зрелости клеток, составляющих опухоль и выявляются на поверхности опухолевых клеток как по характеру экспрессии, так и по структуре. Морфология опухолевых клеток определяется по FAB-классификации. Цитохимическое и цитогенетическое выявление опухолевых клеток также применяется в лабораторной практике. В последнее время накоплено значительное количество информации о том, что генетический полиморфизм определяет наследственную предрасположенность к развитию гемобластозов, включая и острый лимфобластный лейкоз. Следует отметить, что ввиду вариабельности частот аллелей в различных популяциях, выявление взаимосвязи полиморфизма генов с риском развития лимфопролиферативных заболеваний, а, следовательно, и с эффективностью их лечения остается актуальной проблемой для каждой популяционной группы. Специфические хромосомные перестройки, приводящие к образованию химерных или слившихся генов, составляют генетическую основу ОЛЛ. Целью работы явилось выявление хромосомных aberrаций и их сопоставление с генетическим полиморфизмом у пациентов с ОЛЛ. В группу больных вошли 25 детей с первичным ОЛЛ. Препараты костного мозга анализировались с учетом Международной цитогенетической номенклатуры (Shaffer L.G., et al., 2009). Кроме этого, проводили обратную транскрипцию РНК, выделенную из лейкоцитов больных ОЛЛ с последующей мультиплексной амплификацией продуктов химерных генов и их гибридизацию на биочипе («ЛК- биочип», Москва). Были выбраны следующие хромосомные транслокации для ОЛЛ: t(12,21)TEL/AML1, t(9,22) p190 BCR/ABL, t(1,19) E2A/PBX1, MLL – t(4,11) MLL/AF4, t(9,11) MLL/AF9, t(11,19) MLL/ENL, t(6,11) MLL/AF6, t(10,11) MLL/AF10. Транслокация с участием гена MLL встречается у детей до года в 70–80% случаев ОЛЛ.

БИОСИНТЕЗ ХОЛЕСТЕРИНА КАК ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ ПРИ ЛЕЧЕНИИ МЕДУЛЛОБЛАСТОМЫ ТИПА SHH

Р.Э. Мурадинова, И.А. Астауров, З.И. Абрамова *Кафедра биохимии и биотехнологии, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

Сигнальный путь Sonic Hedgehog (Shh-путь) регулирует пролиферацию клеток во время эмбрионального развития организма. Аномальное усиление активации Shh-пути приводит к развитию многочисленных онкологических заболеваний человека, в том числе – медуллобластоме (МБ) – наиболее распространенной опухоли головного мозга у детей. Ранее нами было показано, что усиление активации Shh-пути в гранулярных нейрональных клетках-предшественниках мозжечка приводит к

развитию МБ. Существующие методы лечения МБ блокируют Shh-путь посредством ингибирования его эффектора - трансмембранного белка Smoothed (Smo). Такой подход является проблематичным, так как высокие дозы, необходимые для регрессии опухоли, приводят к развитию серьезных побочных эффектов и устойчивости к ингибиторам Smo. Недавние исследования показали, что необходимым условием активации Smo является присоединение холестерина к его внутриклеточному домену. Нами было показано, что холестерин, синтезированный клетками МБ, необходим для функционирования Shh-пути. Ингибирование Shh-пути посредством холестерина дефицита, как генетически, так и медикаментозно, приводит к резкому снижению пролиферации опухолевых клеток и снижению роста аллотрансплантата. Поскольку холестерин и традиционные антагонисты Smo действуют на различных сайтах белка Smo, мы предположили, что ингибирование обоих участков будет иметь синергетический эффект. Мы обнаружили, что комбинированная терапия ингибитора биосинтеза холестерина симвастатина и антагониста Smo GDC0449 приводит к снижению роста опухоли. Данная стратегия является многообещающим подходом для терапии МБ наряду с другими Shh-опосредованными онкологическими заболеваниями.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОНКОГЕННЫХ СВОЙСТВ ГЕНА TRIM14 И ЕГО МУТАНТНОЙ ФОРМЫ НА МОДЕЛИ ПСЕВДОНОРМАЛЬНЫХ КЛЕТОК RAT-2

З. Айед, В.В. Ненасева, Е.В. Новосадова, В.З. Тарантул *Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия*

Белки TRIM семейства вовлечены в широкий спектр биологических процессов, включающих регуляцию транскрипции, контроль клеточной пролиферации и дифференцировки, онкогенез и апоптоз. Ранее мы обнаружили, что один из TRIM белков – TRIM14 – является специфичным для ВИЧ-ассоциированных лимфом человека (Nenasheva et al., 2005) и ОБИ-ассоциированных лимфом обезьян (Tarantul et al., 2000). Кроме того, данные литературы указывают на повышенную экспрессию гена trim14, содержащего мутацию (P207L), в клетках глиобластомы (Parsons et al. 2008). Эти данные позволяют предположить, что нарушение функции гена может приводить к злокачественной трансформации клеток. В нашем исследовании мы тестировали наличие онкогенного потенциала гена trim14 и его мутантной формы (Mr) на псевдонормальных клетках Rat-2, которые под воздействием онкогенов образуют фокусы морфологической трансформации. Было показано, что в клетках Rat-2, трансфицированных как trim14, так и Mr, образование фокусов происходит в 2–3 раза чаще. Кроме того, в клетках Rat-2, трансфицированных нормальным и мутантным геном trim14, была понижена экспрессия ряда апоптотических генов (гены каспаз 3 и 9 и p53 для trim14, ген каспазы 9 для Mr). Анализ транскрипции генов, связанных, по нашим данным, с геном trim14 (Nenasheva et al., 2014), в фокусах трансформации, образовавшихся при трансфекции, показал, что экспрессия генов hbp, hlx, hsp90ab, junb и prg13 была повышена в обоих случаях по сравнению с контролем. Таким образом, мы показали наличие онкогенного потенциала как у нормального, так и у мутантного гена trim14. Гены hbp, hlx, hsp90ab, junb и prg13 так же, по-видимому, вовлечены в образовании фокусов трансформации при повышенной экспрессии гена trim14.

ЛОКАЛЬНЫЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОПИСТОРХОЗЕ

А.Г. Першина¹, В.В. Иванов¹, Л.В. Ефимова¹, О.Б. Шевелев², С.В. Вторушин¹, А.З. Сазонов¹, Л.М. Огородова¹

¹Сибирский государственный медицинский университет, Томск ²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

Описторхоз представляет серьезную медико-социальную проблему в России, где находится самый крупный мировой очаг инвазии *Opisthorchis felinus*. Паразит оказывает ряд локальных и системных негативных эффектов на организм. Однако описторхоз, особенно в хронической форме, часто имеет лишь неспецифические симптомы. Поэтому особую ценность приобретают неинвазивные методы исследования, направленные на выявление специфических маркеров заболевания и позволяющие оценить степень поражения печени. В работе исследовали информативность магнитно-резонансной томографии (МРТ) и спектроскопии (МРС) для неинвазивной диагностики локальных морфологических и биохимических изменений печени при описторхозе. Экспериментальный описторхоз воспроизводили на модели золотистых хомяков SPF-статуса. МРТ-изображения, 1H- и 31P- МР-спектры печени животных получали на томографе 11.7 T (Bruker, Biospec). Стадию фиброза окрашенных по Ван Гизону срезов оценивали по шкале METAVIR. Биохимический анализ крови проводили на анализаторе Labio 200. Содержание липидов в печени определяли методом тонкослойной хроматографии. Содержание АТФ в гомогенатах печени измеряли с использованием ATP Bioluminescence Assay Kit. У зараженных животных диагностировали фиброз печени 1-2 стадии. Заражение *O.felinus* сопровождалось повышением уровня аланинаминотрансферазы, гамма-глутамилтрансферазы и снижением общего белка в сыворотке крови. В печени зараженных животных содержание холестерина повышалось, тогда как содержание белка снижалось по сравнению с контролем. Уровень АТФ в печени зараженных и контрольных животных не отличался. На T2-взвешанных МРТ-изображениях печени инвазированных животных наблюдали гиперинтенсивный сигнала от расширенных желчных протоков. Анализ 31P МР-спектров печени показал повышение РМЕ. Коэффициент корреляции стадии фиброза с интенсивностью сигнала РМЕ составил 0.703, с содержанием холестерина в печени – 0.781 (p<0.01). Заражение *O. felinus* приводит к развитию фиброза печени, сопровождается нарушением белоксинтезирующей функции гепатоцитов, активацией регенеративных процессов и пролиферацией желчных протоков, энергетический статус ткани печени не изменяется. Степень повреждений печени при описторхозе может быть успешно оценена методами МРТ и МРС. *Поддержано РНФ №14-15-00247, РФФИ 15-04-05580 А*

ИНСУЛИН БЛОКИРУЕТ ГЛУТАМАТ-ВЫЗВАННУЮ НЕЙРОТОКСИЧНОСТЬ В КУЛЬТИРУЕМЫХ НЕЙРОНАХ МОЗЖЕЧКА

В.Г. Пинелис, А.М. Сурин, И.А. Красильникова, Д.В. Бояркин, И.А. Демин, З.В. Закаева, И.А. Помяткин

Научный центр здоровья детей МЗ РФ; «БиоХимМак», Москва, Россия

Установлено, что в механизмах повреждения и гибели нейронов мозга при инсульте, черепно-мозговой травме и некоторых нейродегенеративных заболеваниях ведущую роль играет гиперстимуляция ионотропных глутаматных рецепторов, вызывающая нарушения кальциевого гомеостаза и дисфункцию митохондрий нейронов и развития последующей гибели клеток. С другой стороны, имеются данные, что инсулин является ключевым сигнальным звеном между обеспеченностью нейронов глюкозой для образования субстратов дыхательной цепи митохондрий. Предполагается, что инсулин через активацию инсулиновых рецепторов нейронов мозга может защитить нейроны от глутаматной эксайтотоксичности. Однако механиз-

мы взаимоотношений между инсулиновыми и глутаматными рецепторами окончательно не установлены. Исследование выполнено на культурах гранулярных нейронов мозжечка крысы в возрасте 7–14 дней. Для оценки выживаемости использовали МТТ тест. Инсулин (100 нМ) в контрольных исследованиях на покоящихся нейронах не оказывал влияние на выживаемость нейронов. Глутамат (100 мкМ в безмагневой среде, содержащей 10 мкМ глицина) вызывал гибель 60–75% нейронов. Добавление инсулина в буферный раствор до, во время и после действия глутамата приводило к защите нейронов от токсического действия глутамата на 25–40%. Далее мы изучили дыхание митохондрий нейронов *in situ*, используя технологию Seahorse Bioscience, по измерению скорости поглощения кислорода клетками до и после добавления протонофора FCCP, который вызывает коллапс митохондриального потенциала и, тем самым, позволяет дыхательной цепи работать с максимальной скоростью, которая ограничена лишь обеспечением субстратами цикла Кребса. Добавление 100 мкМ глутамата в безмагневом растворе, содержащем 10 мкМ глицина приводило к стимуляции потребления митохондриями кислорода в результате увеличенного оборота АТФ, обусловленного изменениями внутриклеточного Ca^{2+} и Na^+ . Однако увеличение максимального дыхания, вызванного FCCP, в присутствии глутамата было уменьшено в результате значительного уменьшения уровня АТФ в индивидуальных нейронах (Сурин и соавт., 2014). Инсулин, добавленный к глутамату, достоверно увеличивал дыхание митохондрий, по сравнению с глутаматом, что позволило предположить, что митохондрии являются мишенью работы инсулинового рецептора и этот механизм лежит в основе защитного эффекта в нейронах при воздействии токсических доз глутамата. *Исследование поддержано грантами РФФИ 14-04-90450 и 15-04-07885.*

КАТАЛАЗНАЯ И СУПЕРОКСИДИСМУТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ АБЗИМОВ ПАЦИЕНТОВ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ **Н.М. Кротенко¹, Л.П. Смирнова², И.А. Меднова², Л.Е. Синянский¹, Н.В. Кротенко², С.А. Иванова²**

¹Сибирский государственный медицинский университет; ²НИИ психического здоровья, Томск, Россия

В данной работе изучались каталитически активные антитела – абзимы, обладающие оксидоредуктазной активностью, у пациентов с вторично-прогрессирующей формой рассеянного склероза (ВППС). РС – хроническое демиелинизирующее заболевание нервной системы, в формировании которого немаловажное место занимает окислительный стресс. Для выяснения возможной роли оксидоредуктазной активности АТ в патогенезе РС проведен анализ специфической каталазной (КАТ) и супероксиддисмутазной (СОД) активности IgG больных. Оксидоредуктазная активность IgG больных РС ранее не изучалась. В исследование вошли 20 пациентов с диагнозом ВППС (McDonald, 2010). Средний возраст пациентов с РС составил 31 год, средний возраст дебюта заболевания – 23 года. В качестве группы контроля использовалась группа здоровых лиц, соответствующих по полу и возрасту, в количестве 17 человек, не имеющих соматической патологии. С использованием жестких критериев установлено, что изучаемые активности являются собственным свойством антител. Выделение IgG производили методом аффинной хроматографии на колонках Protein-G-Sepharose. Гомогенность препаратов доказывалась с помощью градиентного 1D-SDS-PAGE. Определение КАТ и СОД IgG проводили спектрофотометрически. Впервые выявленные активности КАТ IgG у больных ВППС в 2 раза, а СОД IgG в 4 раза выше, чем у здоровых лиц. Кинетические параметры КАТ IgG составили: K_m , 36,6 (27,8–45,4) ммоль; V_{max} , 0,814 (0,707–0,921) ммоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{мин}$; а СОД IgG: K_m , 1,20 (1,66–1,78) мкмоль; V_{max} , 18,95 (18,8–19,1) мкмоль диформаза/мин. Кинетические параметры оксидоредуктазной активности IgG позволяют говорить о более высоком родстве абзимов к субстрату. Специфические ингибиторы КАТ (3-амино-1,2,4-триазол) и СОД (триэтиленгликоль) ингибируют каталитическую активность IgG как больных, так и здоровых лиц. Ингибиторный анализ показал, что в механизме действия классических ферментов и абзимов много общего, что можно объяснить присутствием определенных аминокислотных последовательностей в каталитическом участке активного центра IgG. Известно, что активность ферментов антиоксидантной защиты в клетках у больных РС снижена; поэтому можем полагать, что высокая каталитическая активность абзимов носит компенсаторный характер.

ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИЙ ТРИТЕРПЕНОИД СОЛОКСОЛОН МЕТИЛ ПОДАВЛЯЕТ РАННИЕ ЭТАПЫ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА ВИРУСА ГРИППА А И РАЗВИТИЕ ГРИППОЗНОЙ ПНЕВМОНИИ У МЫШЕЙ

А.В. Марков¹, Е.Б. Логашенко¹, О.В. Саломатина², Н.Ф. Салахутдинов², В.В. Власов¹, М.А. Зенкова¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Воржцова СО РАН, Новосибирск, Россия

Вirus гриппа А (ВГА) представляет собой наиболее частый возбудитель ОРВИ – по данным ВОЗ на его долю приходится от 3 до 5 млн случаев заболевания и до 500 000 смертей в год. В настоящее время к применению в мировой клинической практике одобрено лишь два класса противогриппозных препаратов – ингибиторы М2 белка (амантадин, ремантадин) и нейраминидазы (осельтамивир, занамивир). Вследствие высокой изменчивости вирусного генома, ВГА способен приобретать резистентность к действию данных препаратов. Таким образом, разработка новых высокоэффективных ингибиторов гриппозной инфекции является актуальной задачей. Нами была исследована противовирусная активность солоксолон метила (СМ) (метил 2-циано-3,12-диоксо-18βН-olean-9(11),1(2)-ден-30-оата, полусинтетического производного глицирретовой кислоты) в отношении вируса гриппа А/WSN/33 (H1N1). Было показано, что СМ дозозависимо подавляет репродукцию ВГА на клетках MDCK и A549, ингибируя вирусный цитопатический эффект, снижая вирусный титр в опыте в ~680 раз (1,5 мкМ СМ) по сравнению с контролем и значительно подавляя экспрессию вирусных белков NP и M2. Более детальное изучение механизма действия показало, что СМ ингибирует ранние этапы вирусной инфекции – прикрепление вирионов ВГА к клеточной мембране и их проникновение внутрь клеток, не влияя при этом на активность основных поверхностных гликопротеидов вируса гриппа – гемагглютинаина и нейраминидазы. Показано, что в инфицированных клетках СМ подавляет экспрессию воспалительных цитокинов ИЛ-6 и ФНО-α, гиперпродукция которых вызывает серьезные повреждения тканей и ассоциирована с тяжелым течением вирусной инфекции. На модели нелетальной гриппозной пневмонии мышей показано, что интраназальное введение СМ в дозе 5 мг/кг до и после инфицирования приводило к снижению среднего титра вируса в легких на 4 порядка и эффективно подавляло развитие постинфекционной пневмонии. Таким образом, СМ представляет собой перспективный противогриппозный агент комбинированного действия, способный подавлять гриппозную инфекцию и вызываемые ею осложнения. *Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 12-04-31254), Совета по грантам Президента Российской Федерации (стипендия СП-408.2012.4, грант № НШ-7623.2016.4) и Программой РАН «Молекулярная и клеточная биология» (грант № 6.1).*

КАЛЬЦИЕВАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ В НЕЙРОНАХ И АСТРОЦИТАХ ПРИ ФОТОИНДУЦИРУЕМОМ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

М.А. Негинская, Е.В. Бережная Академия биологии и биотехнологии, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – метод разрушения патологических клеток, который используется для лечения различных опухолей мозга. При фотодинамическом воздействии (ФД) в предварительно окрашенных фотосенсибилизатором клетках под воздействием лазерного излучения вырабатываются активные формы кислорода, что ведёт к окислительному стрессу и гибели клеток. Вследствие фотоиндуцированного окислительного стресса в процессе терапии повреждаются не только опухолевые, но и здоровые клетки. Механизм фотодинамического воздействия на здоровые нейроны и астроциты в настоящее время мало изучен. В данной работе было исследовано влияние окислительного стресса при ФД воздействии радахлорина на первичную культуру нейронов и астроцитов коры головного мозга крысы. Для регистрации изменений концентрации внутриклеточного кальция и скорости перекисного окисления липидов были использованы флуоресцентные зонды Fluo-4 и BODIPY C11 (581/591), соответственно. Было показано, что ФДТ в присутствии 200 нМ радахлорина увеличивает амплитуду и частоту кальциевых осцилляций в первичных нейронах. Установлено, что в реакции на ФД воздействие задействован внутриклеточный резерв кальция, т. к. этот эффект наблюдался также и в бескальциевой среде, но блокировался ингибитором SERCA тапсигаргином. Кальциевые осцилляции почти полностью отсутствовали при добавлении антиоксиданта тролокса и ингибитора фосфолипазы C U73122. Также было зарегистрировано, что ФД индуцированный окислительный стресс вызывает перекисное окисление липидов в первичных культурах нейронов и астроцитов. Таким образом, по-видимому, ФД воздействие радахлорина индуцирует перекисное окисление липидов в первичных нейронах, что вызывает активацию фосфолипазы C (PLC). Активация PLC влияет на выход кальция из эндоплазматического ретикулума, что приводит к повышению концентрации ионов кальция в цитозоле нейронов первичной культуры и запуску каскадов кальциевой сигнализации при ФД воздействии радахлорина. *Исследование поддержано грантами РФФИ № 14-04-32270 и № 16-34-01145.*

РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ВО ВНУТРИКЛЕТОЧНОМ НАКОПЛЕНИИ НЕЙТРАЛЬНЫХ ЛИПИДОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

Р.Г. Парнова, Е.М. Фок, В.Т. Бахтеева, Е.А. Лаврова

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Липополисахарид (ЛПС), компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий, является основным токсическим фактором, инициирующим протекание в клетках эукариот иммунных и воспалительных реакций в ответ на внедрение бактериальной инфекции. Известно, что в различных типах клеток действие ЛПС может сопровождаться внутриклеточной аккумуляцией триацилглицеринов (ТАГ), депонируемых в липидных гранулах, особых клеточных органеллах, играющих центральную роль в клеточном метаболизме липидов и обнаруживающих тесную функциональную связь с митохондриями. В процесс внутриклеточного накопления ТАГ при действии бактериального стимула вовлечены многообразные и чрезвычайно тканеспецифичные механизмы, среди которых – снижение экспрессии ферментов окисления жирных кислот и транскрипционных факторов PPAR α и PGC-1 α , усиление экспрессии специфичных белков PAF семейства, локализованных на поверхности липидных гранул и регулирующих липолиз ТАГ и др. Однако эти эффекты могут быть обусловлены существованием триггерного механизма в действии ЛПС, запускающего изменения экспрессии и активности белков, вовлеченных в липидный метаболизм. На изолированных эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки ранее нами было показано, что ЛПС вызывает дисфункцию митохондрий, оцениваемую по снижению скорости потребления кислорода и продукции АТФ. Используя ту же экспериментальную модель, в данной работе мы исследовали возможное участие митохондриальных активных форм кислорода (АФК) в ЛПС-индуцированном изменении липидного метаболизма. Для решения этой задачи использовался митохондриально-направленный антиоксидант MitoQ, а также α -токоферол. В эпителиальных клетках ЛПС повышал продукцию АФК, оцениваемую по флуоресценции ДХФ-ДА, снижал окисление жирных кислот, вызывал внутриклеточное накопление ТАГ и увеличивал число и размер внутриклеточных липидных гранул. Прединкубация клеток с митохондриально-направленным антиоксидантом MitoQ в концентрации 25 нМ устраняло данные эффекты ЛПС. Подобным действием не обладал α -токоферол. Полученные данные свидетельствуют о том, что усиление продукции митохондриальных АФК является одним из основных триггерных механизмов, приводящих к снижению окисления жирных кислот и внутриклеточному накоплению нейтральных липидов при действии бактериального патогена.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИШЕМИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ПОЧКИ У МОЛОДЫХ И СТАРЫХ ЖИВОТНЫХ

Е.Ю. Плотников, С.С. Янкаускас, Н.В. Андрианова, И.Б. Певзнер, Л.Д. Зорова, Д.Н. Силачев, Д.Б. Зоров

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Одним из самых эффективных методов развития толерантности к ишемии ткани является ишемическое preconditionирование (ИПК). Такое воздействие эффективно защищает сердце, мозг, почки и др. органы от повреждения при продолжительной ишемии, однако, зачастую неэффективно у старых индивидуумов. Понимание механизмов развития ишемической толерантности в молодом и старом возрасте может дать ключ к преодолению неэффективности ИПК при старении. Целью данной работы было исследовать влияние ИПК почки на тяжесть острой почечной недостаточности (ОПН) после ишемии/реперфузии (И/Р) у молодых и старых крыс, а также изучить механизмы лежащие в основе развития или потери ишемической толерантности ткани. И/Р почки моделировали путём пережатия сосудистого пучка почки на 40 минут с последующей реперфузией. ИПК заключалось в 4-х коротких циклах ишемии и реперфузии, непосредственно перед длительной 40-мин ишемией. Тяжесть ОПН оценивали по концентрации креатинина и мочевины в сыворотке крови. Также оценивали и функционирование митохондрий почки, уровень ацетилирования белков в почечных канальцах, активность лизосом, сигнализацию, связанную с аутофагией. Через 48 часов после И/Р уровень креатинина в сыворотке крови многократно увеличился как у молодых, так и у старых крыс. ИПК уменьшало уровень креатинина у молодых крыс, однако не оказывало влияния на тяжесть ОПН у старых животных. У молодых интактных животных наблюдали более низкий уровень ацетилирова-

ния, по сравнению со старыми. Процент канальцев с высоким уровнем ацетилирования возрастал через 40 минут после И/Р и у молодых, и у старых крыс. ИПК возвращало профиль ацетилирования к норме у молодых крыс, однако увеличивало уровень ацетилирования у старых крыс. После И/Р было выявлено увеличение количества лизосом в клетках почки, тогда как ИПК частично обращало эти изменения. У старых животных наблюдалось увеличение дезэнергизованных митохондрий, популяция которых увеличивалась после ИПК. Таким образом, нами впервые показано отсутствие эффекта ИПК у старых животных, ассоциированное с повышенным ацетилированием в ткани органа. Накопление в клетках почки старых животных нефункциональных митохондрий связано очевидно с нарушением процессов их аутофагосомной деградации. *Работа под-держана грантами РФФИ 14-04-00300, 14-04-00542 и 16-34-01314.*

ОТ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ, БИОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ К ОБОБЩАЮЩЕЙ ТЕОРИИ НОРМАЛЬНЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

В.П. Реутов¹, Е.Г. Сорокина²

¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН; ²Научный центр здоровья детей МЗ РФ, Москва, Россия

С 1946 г. средняя продолжительность жизни (СПЖ) в мире растет. Исключение составляют СССР и страны СНГ. Какие факторы в СССР/СНГ могли бы так отрицательно действовать на изменение СПЖ, которые способны были превзойти последствия атомных взрывов в Японии? В период с 1930 по 1960 гг. производство азотных удобрений в СССР выросло в 1500 раз. Не могли ли азотные удобрения оказать столь мощное влияние на среднюю продолжительность жизни в СССР? Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР были предложены меры, снижающие степень воздействия нитратов и нитритов на организм человека и животных, которые позволили повысить СПЖ в СССР на 3–5 лет в период с 1983 по 1990 гг. В дальнейшем оказалось, что за 50-летний период (1960–2010) этот эффект повышения СПЖ в СССР, России и странах СНГ был единственным и действовал (вначале в отдельных республиках (1980–1983), а потом и на всей территории СССР (1983–1990)) на протяжении 10 лет выполнения Программы снижения поступления нитратов и нитритов в организм человека (1980–1990). После отмены указанной выше Программы с 1992 по 2010 гг. произошло утроение числа случаев от сердечно-сосудистых заболеваний и удвоение – от онкозаболеваний. Согласно развиваемым представлениям в основе многочисленных заболеваний лежат нарушения в циклах оксида азота и супероксидного анион-радикала. Эти нарушения происходят на фоне ишемии/гипоксии, воспалительных процессов, когда наряду с кислородным дыханием начинает активироваться и эволюционно-древнее нитратно-нитритное дыхание. Нарушения в циклах оксида азота и супероксидного анион-радикала позволяют NO и O₂⁻ непосредственно взаимодействовать друг с другом, минуя ферментативные и неферментативные антиоксидантные системы, и образовывать диоксид азота (NO₂), пероксинитриты, которые после протонирования вновь распадаются с образованием весьма реакционно-способных NO₂ и OH-радикалов. Эти процессы активируются при переходе от нормальных физиологических процессов к патологическим явлениям и процессам.

ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА В УСЛОВИЯХ ДЕСИНХРОНОЗА

Е.Г. Батоцыренова, В.А. Кашуро, М.Б. Иванов, С.В. Степанов, Е.Б. Скоморохова

Институт токсикологии, Санкт-Петербург, Россия

Рассогласование между ритмическими процессами внутри организма и внешними задающими ритм факторами вызывает десинхроноз. Интенсивная физическая нагрузка является провоцирующим фактором для проявления адаптационных возможностей организма, что вызывает в условиях десинхроноза изменение регуляции энергетического обмена и обмена энергетических субстратов. Эксперимент был проведен на беспородных белых крысах-самцах, весом 200–220 г. Животные тренировались по 15 мин в течение 21 дня на тредбане в обычных световых условиях. После тестирования крысы были разделены на 3 группы: контрольная (n=10) и две опытных (n=20). Животные контрольной группы продолжали тренироваться в условиях смены дня и ночи (12/12), вторая опытная группа тренировалась в условиях постоянного освещения, третья опытная группа – в условиях постоянной темноты. Через 7 дней было проведено контрольное тестирование на физическую работоспособность и определены показатели энергетического обмена в сыворотке крови: активность фермента фосфоэнолпируваткарбоксикиназы (ФЕПМК), активность Na⁺,K⁺-АТФазы, концентрации PPARγ и HIF1α. Через 1 неделю экспериментального десинхроноза наблюдается значительное снижение физической работоспособности крыс. Так, у животных, находившихся в условиях темновой депривации, активность бега достоверно снизилась на 17,1%, а в условиях световой депривации – на 54,3%. Активность ФЕПМК в сыворотке крови животных, находившихся при постоянном освещении, возрастала на 35%, активность Na⁺,K⁺-АТФазы повышалась в 6 раз, концентрация PPARγ и концентрация HIF1α возрастала в 3 раза по сравнению аналогичными показателями в сыворотке крови крыс из контрольной группы. Подобная тенденция наблюдалась у животных, находившихся в условиях световой депривации. Анализ полученных экспериментальных данных подтверждает, что одной из мишеней действия час-овых генов являются регуляторы энергетического обмена клетки. Поэтому поддержание энергетических ресурсов клеточного метаболизма является важной задачей в условиях десинхроноза.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА В НЕЙРОНАХ И АСТРОЦИТАХ ПРИ ФОТОИНДУЦИРОВАННОМ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Е.В. Бережная, М.А. Негинская *Академия биологии и биотехнологии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия*

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – это селективное разрушение клеток, окрашенных фотосенсибилизатором, при облучении светом определенной длины волны в присутствии кислорода. Повреждение клеток при ФДТ происходит в результате фотоиндуцированной генерации активных форм кислорода, вызывающих окислительный стресс. ФДТ используется в онкологии в том числе для удаления опухолей мозга. При облучении повреждаются так же и здоровые клетки, поэтому важно исследовать действие фотоиндуцированного окислительного стресса на здоровые нервные и глиальные клетки. В данной работе с помощью флуоресцентных зондов исследовались клеточные механизмы фотодинамического воздействия фотосенсибилизатора радахлорин (200 нМ) на нейроны и астроциты в первичной клеточной культуре. С помощью флуоресцентного зонда, дигидроэтидиума, было показано, что фотодинамическое воздействие радахлорина повышает генерацию супероксид анионов. Уровень окислительного стресса в клетках оценивался по уровню глутатиона, измеренному с помощью монохлор-

бимана через 4 часа после воздействия. Также при облучении наблюдалась небольшая деполяризация митохондрий, измеренная с помощью родамина 123. Фотоиндуцированный окислительный стресс снижал флуоресценцию НАДН и митохондриальное депо НАДН. Уменьшение флуоресценции НАДН при облучении может быть связано с потреблением НАД⁺ ферментом PARP, т.к. этот эффект исчезал при добавлении ингибитора PARP DPQ (20 мкМ). Добавление DPQ (20 мкМ) также частично блокировало фотоиндуцированные изменения митохондриального потенциала. Таким образом, можно заключить, что наблюдаемые изменения в митохондриальном метаболизме частично связаны с активацией PARP в результате фотоповреждения ДНК. *Исследование поддержано грантом РФФИ № 16-34-01145.*

ЭФФЕКТ ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛЕЙ-ЭНКЕФАЛИНА НА ОКСИДАНТНЫЙ СТРЕСС И АКТИВНОСТЬ СИГНАЛЬНЫХ КИНАЗ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК НЕК-293

Е.А. Благодаренко, Н.Л. Лиля, П.К. Бойченко *Луганский государственный медицинский университет, Луганск*

Стимуляция дельта-опиоидных рецепторов может играть важную роль в уменьшении поражения, вызванного ишемией-реперфузией, в процессе прекоондиционирования и посткоондиционирования. Так как посткоондиционирование имеет большее значение в клинической практике, мы имитировали посткоондиционирование, используя лей-энкефалин DADLE и изучили его защитное действие. Клетки НЕК-293 выращивались в нормальной среде DMEM. Выживаемость клеток определялась при помощи исследований с использованием трипанового синего и МТТ. Активность протеинкиназ исследовалась вестерн-блоттингом с использованием фосфоспецифических антител. Образование АФК измеряли с помощью реагента MitoTracker Red (Invitrogen). Флуоресценцию фиксировали с использованием инвертированного конфокального микроскопа. Условия ишемии-реперфузии для клеточной культуры моделировали при помощи специальной камеры для гипоксии. Установлено влияние стимуляции дельта-опиоидных рецепторов на активность киназ ERK и AKT. При воздействии на клетки в нормальных условиях активность киназ повышалась. После ишемии-реперфузии выявлено повышение продукции АФК, что сопровождается активацией исследованных киназ ERK и AKT. Добавление в среду лей-энкефалина DADLE после ишемии-реперфузии (период посткоондиционирования) вызывало повышение выживаемости клеток, снижение выработки АФК и активности протеинкиназ. Таким образом, выявлены механизмы защитного действия лей-энкефалина DADLE, вызывающего стимуляцию дельта-опиоидных рецепторов, во время посткоондиционирования ишемией-реперфузией.

СИСТЕМА ПОЛИ(АДФ-РИБОЗИЛ)ИРОВАНИЯ БЕЛКОВ ВОВЛЕЧЕНА В КАРДИОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ДОКСОРУБИЦИНА

А.С. Ефремова, И.А. Недорубова, А.В. Лахин, Л.В. Генинг, Н.Ф. Мясоедов, С.И. Шрам

Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Система поли(АДФ-рибозил)ирования белков выполняет важную роль в поддержании целостности генома и в координации стресс-индуцированных сигнальных путей, активируемых при повреждении ДНК. В данной работе было исследовано участие поли(АДФ-рибоза)-полимераз (ПАРП) в гибели кардиомиоцитов при воздействии доксорубина (Dox). Эксперименты проводились на культурах кардиомиобластов крысы H9c2, дифференцированных в кардиомиоциты. Было обнаружено, что при обработке кардиомиоцитов Dox (1 мкМ) в течение 6 ч в ядрах наблюдается почти двукратное увеличение уровня поли(АДФ-рибозил)ированных белков по сравнению с его базальным уровнем. Показано, что Dox-стимулированная активация ПАРП не связана с генерацией активных форм кислорода и окислительными повреждениями ДНК, поскольку она не предотвращалась инкубацией клеток в присутствии антиоксидантов. Обработка кардиомиоцитов Dox (1 мкМ; 6–48 ч) приводила к накоплению повреждений ДНК и транслокации апоптоз-индуцирующего фактора (АИФ) из цитоплазмы в ядро, что свидетельствует об активации ПАРП-зависимого пути клеточной гибели – партанатоза. При этом не наблюдали межнуклеосомной фрагментации ДНК, характерной для каспаза-зависимого пути апоптоза. Ингибиторы ПАРП оказывали выраженное цитопротекторное действие при обработке кардиомиоцитов Dox, кроме того они предотвращали транслокацию АИФ в ядра и снижали степень повреждения ДНК. Также было показано, что Dox-индуцированная гибель кардиомиоцитов, не обусловлена развитием окислительного стресса, поскольку антиоксиданты не оказывали защитного действия на клетки. Таким образом, нами было установлено, что временная активация процесса поли(АДФ-рибозил)ирования белков, вызванная цитотоксическими дозами Dox, приводит к гибели кардиомиоцитов в культуре. *Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-04-01870).*

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ПЕРВОГО ИНТРОНА ГЕНА IL2RA, АССОЦИИРОВАННЫХ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

А.М. Шварц¹, Л. В. Путляева¹, И.В. Кулаковский^{1,2}, И.Е. Воронцов², Д.Э. Демин^{1,3}, Д.В. Купраш^{1,4}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН; ²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН; ³Факультет биологической и медицинской физики, Московский физико-технический институт; ⁴Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова Москва, Россия.

Интерлейкин 2 рецептор альфа (Interleukin 2 receptor alpha, IL2RA) участвует в регуляции активности хелперных и регуляторных Т-лимфоцитов. Эти две группы лимфоцитов играют важную, и зачастую противоположную, роль в развитии различных аутоиммунных заболеваний. Не удивительно, что ряд полиморфизмов, ассоциированных с риском развития различных аутоиммунных заболеваний, расположен в локусе il2ra. Большая часть описанных полиморфизмов локуса располагается в первых 12 кб первого интрона гена. В данной области нами было найдено 7 регуляторных элементов, способных усиливать транскрипцию с промотора IL2RA, активность которых сильно зависит от вариантов различных полиморфизмов, ассоциированных с развитием аутоиммунных заболеваний. Мы обнаружили, что активность данных энхансерных элементов по-разному проявляется в клетках линий Jurkat и MT-2, напоминающих по профилю экспрессии генов Т-хелперы и регуляторные Т-клетки, соответственно. Также нами было показано, что представители определенных семейств транскрипционных факторов существенно изменяют аффинность связывания с последовательностями энхансеров первого интрона гена il2ra в зависимости от вариантов исследуемых полиморфизмов. *Данная работа поддержана грантом №14-14-01140 Российского научного фонда.*

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОФИЛЯ ЦИТОКИНОВ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ

Ю.Д. Романова¹, А.В. Лайков¹, М.И. Маркелова¹, Е. А. Куприянова¹, С.Ю. Ефремова¹, А.Р. Максеев², Л.И. Фахрутдинова³, С.Ю. Маланин¹, И.И. Салафутдинов¹ ¹Казанский (Приволжский) федеральный университет; ²Казанский государственный медицинский университет; ³Казанская государственная медицинская академия, Казань, Россия

Хроническая почечная недостаточность (ХПН) возникает при сокращении числа функционирующих нефронов, что приводит к нарушению выделительных функций почки. Одним из основных методов лечения терминальной ХПН (т-ХПН), помимо гемодиализа, является трансплантация почки. Данная операция является дорогостоящим и трудоемким методом лечения. В связи с чем, первостепенной задачей для медицинской практики является сохранение функций трансплантированной почки. Одним из прогностических подходов, позволяющих оценить приживаемость почки и скорректировать медикаментозную терапию, является исследование уровней цитокинов. С помощью набора «Bio-PlexPro™ HumanCytokine 21-plexAssay» (BioRad) была проведена оценка: IL-1α, IL-2Rα, IL-3, IL-12(p40), IL-16, IL-18, CTACK, GRO-α, MIG, MIF, M-CSF, MCP-3, SDF-1α, SCF, SCGF-β, HGF, IFN-α2, LIF, β-NGF, TNF-β, TRAIL в сыворотке крови 15 условно здоровых лиц и 158 больных с т-ХПН до и после трансплантации почки. До трансплантации больные получали диализную терапию, а после – базовую иммуносупрессивную терапию. В ходе исследования сыворотки крови пациентов с т-ХПН как до трансплантации почки, так и после, было установлено повышение концентрации IL-2Rα, IL-3, IL-16, CTACK, GRO-α, HGF, IFN-α2, LIF, M-CSF, β-NGF, TRAIL, SDF1-α, SCGF-β, SCF в несколько раз, а концентрации IL-12(p40), IL-18, MCP-3, MIF, MIG - более чем в 10 раз по сравнению с контрольной группой. Концентрации цитокинов IL-2Rα, IL-3, IL-16, CTACK, GRO-α, HGF, IFN-α2, LIF, M-CSF, β-NGF, TRAIL, SDF1-α, SCGF-β, SCF в сыворотке больных снижались на фоне проведения противовоспалительной терапии в посттрансплантационный период. Во всех исследованных выборках значения IL-1α и TNF-β были ниже уровня детектирования. В целом, наблюдаемое увеличение концентраций IL-12(p40), IL-18, IL-16, MCP-3, IFN-α2, IL-2Rα и IL-3 в сыворотке крови больных с т-ХПН можно объяснить запуском активированными макрофагами Th1-опосредованного иммунного ответа. Поскольку уровень IL-12(p40) в крови больных был повышен в 35–40 раз и оставался высоким после трансплантации на фоне проводимой противовоспалительной терапии, можно предложить оценивать изменения в концентрации IL-12(p40) в качестве возможного прогностического фактора, ассоциированного с риском отторжения почки в среднесрочной перспективе.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ЦИКЛИЧЕСКОЙ РНК ГЕНА Sgms1 В УСЛОВИЯХ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

В.В. Ставчанский, И.Б. Филиппенков, В.Г. Дмитриева, Л.В. Дергунова, С.А. Лимборская
Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Ген сфингомиелинсинтазы Sgms1 кодирует фермент SMS1. Катализируя синтез сфингомиелина и диацилглицерина (ДАГ) из фосфатидилхолина и церамида, SMS1 принимает участие в регулировании баланса между процессами клеточной гибели и выживания посредством регуляции образования про-апоптотического медиатора церамида и синтеза анти-апоптотического медиатора ДАГ. Ранее мы наблюдали падение содержания мРНК гена Sgms1 в ишемической коре и соответствующих ей подкорковых структурах через 3 и 24 часа после окклюзии. В числе транскриптов гена Sgms1 нами были обнаружены циклические РНК, которые возникают из экзонов протяженной 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) гена, не кодируют белок, но имеют консервативную структуру и преимущественную мозгоспецифическую экспрессию у человека и грызунов. С помощью ПЦР в реальном времени проведен анализ содержания циклической РНК (circSgms1_2-5), включающей экзон 5'-НТО гена Sgms1 в лобной коре и подкорковых структурах мозга крыс в условиях модели фокальной ишемии. Фокальную ишемию у экспериментальных животных вызывали необратимой коагуляционной окклюзией левой средней мозговой артерии. В качестве контроля использовали животных, подвергнутых ложной операции. В течение первых суток после окклюзии уровень circSgms1_2-5 в ипсилатеральной коре, включающей очаг повреждения, не отличался от уровня экспрессии этого транскрипта у контрольных животных. В прилегающих к очагу повреждения подкорковых структурах уровень circSgms1_2-5 был снижен только через 24 часа после окклюзии. Оценка содержания циклического транскрипта circSgms1_2-5 свидетельствует о его устойчивости в условиях ишемического повреждения коры головного мозга. Отмеченное нами через сутки падение circSgms1_2-5 в подкорковых структурах со стороны повреждения, где преимущественно располагаются способные к восстановлению клетки пенумбры, может свидетельствовать об его функциональном использовании в целях регуляции экспрессии гена Sgms1 в условиях ишемии. На примере гена Sgms1 видно, что кодирующие и циклические РНК могут иметь различную динамику экспрессии в условиях повреждения и стресса. *Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (14-04-00487; 16-04-00488; 16-34-00653), Программы Российской академии наук «Молекулярная и клеточная биология».*

ИЗУЧЕНИЕ ФОСФОЛИПИДНОГО СОСТАВА И СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В КОЖЕ БОЛЬНЫХ ВИТИЛИГО

Б.Т. Саатов *Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр дерматологии и венерологии МЗ Республики Узбекистан, Ташкент, Узбекистан*

Витилиго – широко распространенное заболевание кожи человека, характеризующееся появлением белых пятен на кожном покрове. До настоящего времени причины развития заболевания все ещё не установлены и эффективные методы его лечения отсутствуют. Целью работы является исследование роли нарушения фосфолипидного состава и стимуляции окислительного стресса в коже человека в патогенезе витилиго. Исследования проводились в биоптатах кожи здоровых лиц и депигментированных участках кожи больных витилиго. Определены количественный и качественный состав фосфолипидов, а также интенсивность ПОЛ и активность фермента каталазы. Результаты исследования показали, что в коже больных витилиго происходит достоверное снижение содержания суммарных фосфолипидов по сравнению с нормой. В составе кожи человека выявлены 8 фракций фосфолипидов, количественное содержание которых при витилиго значительно отличалось от показателей здоровой кожи. В отличие от нормы в коже больных витилиго наблюдается значительное увеличение содержания лизофосфатидилхолина и фосфатидной кислоты, тогда как содержание нейтральных фосфолипидов (фосфотидилхолин,

фосфатидилэтаноламин, сфингомиелин) было заметно ниже. В пораженных участках кожи больных витилиго установлено резкое повышение количества кислых фракций фосфолипидов (фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, кардиолипин) по сравнению с нормой. Как видно, фосфолипидный состав кожи подвергается значительному изменению при её витилигиозном поражении. В депигментированной зоне кожи больных витилиго происходит накопление конечного продукта липопероксидации – малонового диальдегида (МДА). В очаге витилигиозного поражения уровень МДА превышал контрольные показатели в 3,3 раза. При этом активность каталазы в депигментированном участке кожи больных витилиго была снижена в 1,3 раза относительно уровня контроля. Полученные данные указывают на повышение окислительного стресса в коже больных при развитии витилиго. Вероятно, стимуляция окислительного стресса в коже при витилиго является предпосылкой для повреждения и гибели меланоцитов с последующим формированием очага депигментации. Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о том, что изменение фосфолипидного состава и усиление окислительного стресса в коже занимают ключевое место в патогенезе витилиго.

КОРРЕКЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ СИНТЕТИЧЕСКИМИ ФРАГМЕНТАМИ РЕЦЕПТОРА RAGE НА МЫШИНОЙ МОДЕЛИ СПОРАДИЧЕСКОЙ ФОРМЫ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

А.В. Аветисян¹, Р.А. Симонов¹, А.Н. Самохин², Д.О. Короев³, О.М. Вольпина³, Н.В. Бобкова²

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ²Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская область; ³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Митохондрии играют основополагающую роль в патогенезе болезни Альцгеймера (БА). Дисфункция мозговых митохондрий приводит к энергетическому дефициту и окислительному стрессу, что может служить инициатором/триггером преждевременной гибели нервных клеток при БА. Нами изучены митохондриальные нарушения в мозговых тканях мышей с ольфакторной бульбэктомией, являющиеся моделью спорадической формы БА, а также терапевтический эффект интраназального введения синтетических фрагментов белка RAGE. Удаление обонятельных луковиц (ОБЭ) у половозрелых мышей вызывает через 4–5 недель после операции нейродегенерацию с характерными признаками БА, в том числе, потерю пространственной памяти, апонтоз нейронов, нарушение энергетического обмена, повышенный уровень мозгового Аβ и фосфо-τ. У ОБЭ мышей регистрируется выраженная дисфункция мозговых митохондрий, коррелирующая с высоким содержанием в них растворимого белка Aβ1–40, и Aβ-индуцированный окислительный стресс. Изолированные из неокортекса и гиппокампа митохондрии демонстрируют низкую скорость дыхания и мембранный потенциал, значительное падение активности комплексов I и IV электрон-транспортной цепи. Нарушение энергетического метаболизма сопровождается накоплением продуктов перекисного окисления липидов в митохондриях, что свидетельствует об окислительном стрессе. Известно, что рецепторы конечных продуктов неферментативного гликирования белков RAGE участвуют в процессе накопления нейротоксического Аβ в мозговых клетках. В то же время, растворимая форма рецептора sRAGE в межклеточном пространстве связывается с Аβ и способствует его выносу в кровяное русло, очищая мозг от токсических амилоидов. Нами установлено, что аналогичным действием обладают также короткие синтетические пептиды неструктурированных фрагментов внеклеточной части RAGE, у шести из которых были изучены эффекты на оперативную память мышей и митохондриальные функции. Интраназальное введение данных пептидов в течение 19 дней восстанавливало биоэнергетические характеристики митохондрий, и только один из них улучшил пространственную память ОБЭ мышей. Таким образом, восстановление энергетического метаболизма является необходимым, но недостаточным условием для предотвращения/лечения нейродегенерации в данной модели БА. *Работа поддержана РФФИ, грант № 16-04-00944.*

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА SLAMF1, АССОЦИИРОВАННЫХ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Л.В. Путляева, А.М. Шварц, Д.В. Купраш *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*

CD150 (SLAM, SLAMF1) – трансмембранный гликопротеин массой 70 kDa, который у человека и мыши экспрессируется на поверхности В- и Т-лимфоцитов (на различных стадиях дифференцировки), дендритных клеток, субпопуляций базофилов и макрофагов. Экспрессия SLAMF1 повышается при активации упомянутых клеток, а также при активации моноцитов и тучных клеток. Показано, что нарушение регуляции экспрессии данного белка может приводить к развитию аутоиммунных заболеваний и иммунодефицитных состояний. В результате исследования локуса гена SLAMF1 было выявлено 7 регуляторных элементов, способных усиливать транскрипцию с промотора slamf1, в двух из которых (энхансер 5 и энхансер 7) ранее были обнаружены однонуклеотидные полиморфизмы rs3753381 и rs11265455. Менее распространенный (минорный) вариант полиморфизма rs3753381 (G→A) ассоциирован с повышенным риском развития миастении Грависа, в то время как наиболее распространенный (мажорный) вариант rs11265455 повышает риск развития сахарного диабета 2-го типа. Функциональный анализ энхансеров гена SLAMF1 продемонстрировал, что полиморфизмы rs3753381 и rs11265455 оказывают значительное влияние на активность промотора в системе с геном-репортером. Также интересно, что влияние различных вариантов полиморфизмов наиболее заметно проявляется в В-клеточной линии Raji (лимфома Бёркитта) и в клеточной линии MP-1 (В-лимфобластоидная лимфома). Можно предположить, что изменение экспрессии SLAMF1 в В-клетках напрямую или опосредованно связано с увеличенным риском развития миастении Грависа и сахарного диабета 2-го типа.

АНАЛИЗ АССОЦИИАЦИИ ГЕНОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА МЕТАБОЛИЗМ ГОМОЦИСТЕИНА И РАЗВИТИЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ

О.А. Левашова, И.Г. Золкормяев, Н.И. Алешина, Н.И. Баранова, Е.Р. Кулюцина

Пензенский институт усовершенствования врачей МЗ РФ, Пенза, Россия

Ишемический инсульт (ИИ) – мультифакториальное заболевание, обусловленное взаимодействием различных факторов. Перспективным подходом является изучение генетического разнообразия генов, являющихся независимыми факторами риска возникновения ИИ, а также определение межгенного взаимодействия и ассоциации полиморфизма генов. Цель исследования: изучить частоту встречаемости полиморфных вариантов ряда генов, кодирующих ферменты фолатного цикла (MTHFR C677T и A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G), белки различных звеньев ренин-ангиотензиновой системы (РАС)

(AGT Thr174Met, AGT Met235Thr, AGTR1 A1166C) и эндотелиальных факторов (NOS3 C786T) у пациентов с ИИ различной степени тяжести. Обследовано 78 пациентов с ишемическим инсультом, верифицированного по результатам МРТ/КТ головного мозга в возрасте $65 \pm 7,8$ лет. Неврологический статус оценивался по шкале NIHSS. Анализ полиморфизма изучаемых генов проводили методом ПЦР в режиме «реального времени» реактивами НПО «Литех» и ООО «НПО ДНК-технология». Пациенты в зависимости от тяжести ИИ были разделены на две группы: 1-ая группа – 53 пациента с инсультом легкой и средней степени тяжести (от 4 до 14 баллов); 2-ая – 25 человек с тяжестью инсульта от 15 до 22 баллов. Для сравнения распределений частот генотипов и аллелей использовался критерий χ^2 (Пирсона). Оценка частоты аллелей и генотипов полиморфизма генов, кодирующих ферменты фолатного цикла, показала более частое носительство аллеля 677T MTHFR в группе больных с тяжелым течением заболевания ($\chi^2=6,205$; $p<0,05$), что может свидетельствовать о влиянии гипергомоцистемии на развитие ИИ. Анализ встречаемости полиморфных генов PAC не выявил статистически значимых различий в изучаемых группах пациентов. Полиморфизм гена NOS C786T в нашем исследовании не ассоциировался с тяжестью заболевания. Комплексное изучение ИИ с учетом генетической составляющей позволит определить новые критерии повышенного риска развития заболевания, оптимизировать профилактику, снизить инвалидизацию и летальность при данной патологии.

ОЛИГОМЕРНЫЕ ФОРМЫ ПАРКИНА И ГОМОЛОГА ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ ИЗОФОРМЫ TV7: АВТОУБИКВИТИНИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ И ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ ОЛИГОМЕРИЗАЦИИ

М.В. Крюкова¹, А.В. Липкин¹, В.О. Попов^{1,2}, Г.С. Качалова^{1,2} ¹НИЦ «Курчатовский институт»; ²Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Дисфункцию белка Паркина – E3 убиквитин лигазы, содержащей 4 RING домена, полагают причиной наследственных форм болезни Паркинсона (БП). Кроме того показано, что воздействие множества различных стресс-факторов, включая допамин, стимулирующих развитие спорадической формы БП, изменяет и растворимость паркина, содействуя его внутриклеточной агрегации и способствуя подверженности дегенерации нейронов мозга. Влияние допамина, например связано с ковалентной модификацией остатков цистеинов, большинство которых консервативно и расположено в активных центрах RING доменов. Возрастает число данных, предполагающих, что к риску заболевания спорадической формой БП приводит вариативность экспрессии паркина. В работе были исследованы гибридные белки gat паркина (Prk) и гомолога TV7 изоформы human Паркина из RING0-RING1 доменов (R0R1) фьюжн с GST и MBP. При очистке, данные SEC показавшие, что степень олигомеризации образцов более 10 молекул, были подтверждены методом малоугловой дифракции и сканирующей атомно-силовой микроскопии. Исследование автоубиквитинирующей активности олигомерных белков Prk и R0R1 с GST и MBP тагами показало, что все они проявляют активность, независимо от доменного состава. Принципиальным фактом оказалось проявление автоубиквитинирующей активности белком R0R1 в отсутствии RING2 домена. Предположено, что процесс автоубиквитинирования возможно идет по механизму, отличному от E3 лигазной активности при убиквитинировании субстрата. Каждый RING домен паркина содержит 2 Zn-содержащих кластера, в которых основными остатками координирующими атомы Zn являются остатки цистеинов. Методом рентгенофлуоресцентного анализа был определен элементный состав олигомерных препаратов. Количественный элементный анализ выявил, что содержание атомов Zn в образцах соответствует более низкому содержанию, чем должно быть согласно канонической стехиометрии исследуемого белка. Недостаток необходимого количества атомов цинка, а следовательно отсутствия их в цинковых кластерах свидетельствует об их разрушении. Полученные результаты согласуются с известными данными о подверженности к изменениям растворимости цистеин содержащих белков при окислительных стрессах. Аналогичные химические модификации тиоловых групп цистеинов могут способствовать образованию олигомерных форм паркина.

ВЛИЯНИЕ СЫВОРОТКИ БОЛЬНЫХ С ОЖИРЕНИЕМ И БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-го ТИПА НА ПРОДУКЦИЮ ИНСУЛИНА ОСТРОВКАМИ ЛАНГЕРГАНСА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС

А.В. Зубова¹, Г.С. Русских², М.В. Битхаева¹, И.П. Жураковский¹, О.Н. Потеряева²

¹ЦНИЛ Новосибирского государственного медицинского университета МЗ РФ; ²Научно-исследовательский институт биохимии, Новосибирск, Россия

Метаболический синдром (МС) характеризуется наличием у пациентов сочетания артериальной гипертензии, дислипидемии, инсулиннезависимого сахарного диабета и ожирения. Главный и обязательный критерий МС – абдоминальное ожирение, при котором жировая ткань откладывается преимущественно в области живота. Метаболический синдром считается одной из актуальных проблем медицины. У пациентов с МС возрастает частота развития сахарного диабета 2 типа. Цель работы: изучить влияние сыворотки крови больных с ожирением и больных сахарным диабетом 2 типа (СД 2 типа) на синтез инсулина островками Лангерганса поджелудочной железы крыс *in vitro*. Материалы и методы исследования: сыворотка крови была получена у больных ожирением (ИМТ>30), у больных СД 2 типа в стадиях компенсации и декомпенсации. У всех пациентов получено письменное информированное согласие на проведение обследования. Экспериментальная часть работы была выполнена на крысах-самцах массой 180-200 г, предоставленных вивариум ЦНИЛ ИГМУ. Островки Лангерганса выделяли седиментационным методом согласно Lacy P. et al. [1967]; отбор островков Лангерганса проводился с помощью стереомикроскопа «Stemi 2000C, Carl Zeiss» (Германия). Концентрацию крысиного инсулина измеряли набором ИФА (Shibayagi, Япония). Результаты исследования: при добавлении 20 мМ глюкозы и сыворотки здоровых людей островки Лангерганса секретируют в среду $0,85 \pm 0,13$ нг/мл инсулина в течение часа инкубации. При добавлении глюкозы и сыворотки крови больных с ожирением секреция инсулина снижалась в 2,4 раза по сравнению с действием сыворотки здоровых людей и составила $0,36 \pm 0,04$ нг/мл ($p<0,05$). При добавлении глюкозы и сыворотки больных СД 2 типа в стадии компенсации секреция крысиного инсулина снижалась в 1,4 раза по сравнению с действием сыворотки здоровых людей и составила $0,6 \pm 0,03$ нг/мл. Секреция инсулина в присутствии глюкозы и сыворотки больных СД 2 типа в стадии декомпенсации снижалась в 5 раз по сравнению с сывороткой здоровых людей и составила $0,17 \pm 0,04$ нг/мл инсулина ($p<0,001$).

Под действием сыворотки крови больных с ожирением и больных СД 2 типа в стадии декомпенсации происходит снижение секреции инсулина по сравнению с сывороткой крови здоровых людей.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТАБОЛОМНЫХ ПРОФИЛЕЙ ВОДЯНИСТОЙ ВЛАГИ И СЫВОРОТКИ КРОВИ

А.А. Хличкина, О.А. Снытникова, В.В. Яньшол, Л.В. Яньшол, Ю.П. Центалович *Институт «Международный томографический центр» СО РАН, Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Проблема заболеваний глаз – одна из наиболее актуальных в современной медицине. Самыми распространенными патологиями, приводящими к частичной или полной потере зрения являются глаукома, катаракта, макулодистрофия и кератоконус. Развитие патологических процессов в организме отражается в изменении уровня концентраций метаболитов, в дисбалансе между окислителями и антиоксидантами, которые приводят к окислительному стрессу, основному патологическому фактору. Важную роль в обменных процессах в глазу человека играют сосудистая оболочка глазного яблока и водянистая влага (ВВ), выполняющие функцию как поставки – питания полезных, так и отвода патогенных/токсичных веществ. «Исходным сырьем» для образования ВВ является кровь, однако литературные данные о механизмах её образования ограничены. Данная работа направлена на изучение метаболомного состава водянистой влаги и сыворотки крови человека. Целью работы было провести сравнительный анализ метаболомных составов для выявления отличий и/или корреляций в составе метаболитов с возрастными и патологическими изменениями. Методами ВЭЖХ-МС и ЯМР был проанализирован метаболомный состав данных биологических жидкостей 6 человек при жизни и 6 человек post-mortem. Определены концентрации 60 соединений. Выявлены метаболиты, преобладающие по концентрации, как в ВВ, так и в сыворотке. Установлены отношения концентраций метаболитов сыворотка/ВВ. Для большинства соединений данное отношение близко к единице, это свидетельствует о том, что барьер между кровью и ВВ работает как ультрафильтрационная решетка, способная пропускать малые молекулы и тем самым поддерживать одинаковую концентрацию метаболитов в ВВ и сыворотке. Однако концентрация некоторых метаболитов в ВВ выше, чем в сыворотке. Это свидетельствует о том, что данные соединения образуются в тканях, которые омываются водянистой влагой. После смерти наблюдается резкое увеличение концентрации отдельных метаболитов как в крови, так и в ВВ, что подтверждает тесную взаимосвязь крови и ВВ, проявляющуюся в эффективном обмене метаболитами.

ПРИОБРЕТЕНИЕ КАРДИОМИОЦИТАМИ КРЫСЫ Н9С2 СЕНЕСЦЕНТНОГО ФЕНОТИПА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ СВЯЗАНО С ПОВЫШЕННОЙ ПРОДУКЦИЕЙ КЛЕТКАМИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

И.А. Недорубова, С.И. Шрам *Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия*

Увеличение числа клеток со сенесцентным фенотипом (старение клеток) характерно не только для стареющего организма, но также для ряда патологий. Однако процесс старения кардиомиоцитов, обусловленный хронической гипергликемией при диабете еще мало изучен. Цель работы: выяснить влияние антиоксиданта N-ацетил цистеина (НАС) на процессы образования активных форм кислорода (АФК), а также гибель и старение культивируемых кардиомиоцитов крысы Н9с2 в условиях хронической гипергликемии. Исследования проводились на дифференцированных в кардиомиоциты культурах клеток Н9с2 (кардиомиобласты крысы). Хроническую гипергликемию вызывали длительной (от 1–10 суток) инкубацией клеток в среде с высокой концентрацией глюкозы 30,5 мМ (нормогликемия – 5,5 мМ). Продукцию АФК оценивали с помощью флуоресцентного зонда – 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетата, число апоптотических клеток – методом TUNEL, а число сенесцентных клеток – методом анализа ассоциированной со старением активности β-галактозидазы (SA-β-Gal). Перевод культур Н9с2 в условия гипергликемии уже через 24 ч инкубации приводит к увеличению образования в клетках АФК, и такой повышенный уровень АФК сохраняется вплоть до 10 суток инкубации. Показано, что в условиях гипергликемии снижение плотности клеток в культуре происходит только в период между 7 и 10 сутками инкубации. При этом заметное увеличение числа апоптотических клеток в культуре наблюдается на 3 сутки инкубации в условиях гипергликемии, а к 10 суткам процент апоптотических клеток падает. Хроническая гипергликемия стимулирует значительное возрастание числа клеток со сенесцентным фенотипом, интенсивно окрашиваемых на маркер клеточного старения – SA-β-Gal. Наибольший процент таких клеток обнаруживается на 7 сутки. Не были обнаружены клетки, в которых бы одновременно выявлялись маркеры как сенесцентных клеток, так и апоптоза. Внесение в среду культивирования НАС приводило к подавлению апоптоза и клеточного старения. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-04-01870).

ТКАНЕВАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА ЧЕЛОВЕКА

О.В. Крюкова, В.Е.Тихомирова, А.В. Гусаков, Н.И. Булаева, А.З. Жолбаева, Е.З. Голухова, С.М. Данилов, О.А. Кост *МГУ им. М.В. Ломоносова; Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева, Москва, Россия*

Изменения конформации ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) могут происходить из-за мутаций, денатурации, влияния ингибиторов, присутствия мембранного якоря и т.п. Конформация поверхности АПФ может также меняться в зависимости от гликозилирования фермента. Целью работы было изучение структурных (конформационных) различий АПФ из различных тканей человека (эндотелиальных клеток легких и эпителиальных клеток простаты и эпидидимиса) на основе связывания панели из 17 моноклональных антител (мАт), направленных к разным эпитопам на поверхности N- и C-доменов АПФ. Для этого мы использовали как АПФ, очищенный из легких и семенной жидкости, так и гомогенаты различных тканей (как источник нативного фермента). Относительная эффективность (pattern) связывания панели мАт с АПФ из легких и из семенной жидкости (а также АПФ в составе гомогенатов легких и гомогенатов простаты и эпидидимиса) резко различалась (для 10 из 17 антител). Различия в связывании мАт отражают различия в локальной конформации АПФ из разных источников и объясняются различным гликозилированием некоторых сайтов гликозилирования фермента в разных клетках – Asn 25 (мАт BB9, 3A5 и i1A8), Asn 289 (i2H5 и 1G12), Asn 731 (1B3 и 3F10), Asn 666 (1E10), Asn 685 (1E10 и 4E3). Анализ АПФ с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии показал, что в АПФ из семенной жидкости реально гликозилированы Asn 117, 416, 648, 666 и 685, а в легких гликозилированы Asn 82, 117, 480, 648, 666 и 731. Остатки Asn 117, 648 и 666 гликозилированы у обоих ферментов, однако молярные массы гликанов отличались между собой, а, соответственно, отличались и структуры олигосахаридов. Существенные структурные различия АПФ из разных органов и тканей в перспективе возможно использовать для выработки антител, специфичных для АПФ из разных тканей, которые смогут отличать АПФ, попадающий в кровь из определенной ткани. Работа поддержана грантом правительства Российской Федерации (№ 14.Z50.31.0026).

ФЕНОТИПИРОВАНИЕ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА ИЗ СЕРДЦА ЧЕЛОВЕКА

В.Е. Тихомирова, О.В. Крюкова, А.З. Жолбаева, Н.И. Булаева, Е.З. Голухова, С.М. Данилов, О.А. Кост *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова; Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева, Москва, Россия*

Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ) играет ключевую роль в регуляции кровяного давления, а также участвует в развитии сердечной патологии. Фибрилляция предсердий – наиболее часто встречающийся вид нарушений сердечного ритма. Пациенты с фибрилляцией предсердий имеют повышенный уровень АПФ в предсердиях. Обнаружение в крови пациентов АПФ, продуцируемого в сердце, в перспективе может служить прогностическим маркером возможности развития фибрилляции предсердий. Целью данной работы являлось фенотипирование АПФ из сердца человека, включая выявление конформационных особенностей АПФ сердца по сравнению с ферментом лёгких, являющегося основным источником АПФ в крови, для последующего получения моноклональных антител (мАт), специфичных к АПФ сердца. Мы оценивали экспрессию АПФ в различных тканях человека – сердце, легких, почках и селезенке – путем сравнения активности АПФ в гомогенатах этих тканей. Активность АПФ в сердце человека (80 мЕд/г) примерно в 3 раза выше, чем в плазме крови человека и 8–12 раз меньше, чем в легких человека. Конформационные различия АПФ из тканей оценивали путём сравнения эффективности связывания панели мАт, направленных к 17 различным эпитопам на поверхности как N, так и C-домена АПФ человека. Продemonстрировано, что эффективность связывания некоторых мАт с АПФ сердца и лёгких значительно отличается, что указывает на конформационные отличия поверхности обоих доменов этих ферментов (скорее всего за счет различия гликозилирования АПФ в сердце и легких). Более того, показаны конформационные отличия ферментов внутри сердца (предсердия и желудочки). Конформационные отличия АПФ из тканей сердца и легких, которые мы нашли, создают возможность получения моноклональных антител, способных различать АПФ, попадающий в кровоток из этих двух органов и, следовательно, сформируют основу для прогностического теста крови на риск развития фибрилляции предсердий. *Работа поддержана грантом правительства Российской Федерации (№ 14.Z50.31.0026).*

ДИСБАЛАНС ПРО- И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КАК МЕХАНИЗМ РАЗВИТИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-го ТИПА

Ю.Э. Азарова, А.В. Полоников, А.И. Конопля *Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия*

В настоящее время сахарный диабет является самым распространенным эндокринным заболеванием: в мире насчитывается более 415 млн больных сахарным диабетом, 90% которых страдают диабетом 2-го типа. Цель настоящей работы – оценить содержание общего глутатиона и активных форм кислорода в плазме крови больных сахарным диабетом 2-го типа. В исследование включены 24 больных сахарным диабетом 2-го типа, получавших стационарное лечение в эндокринологическом отделении ОБУЗ КГК БСМП г. Курска в январе–феврале текущего года. Средний возраст пациентов составил 58,8 лет. 10 человек с нормальным углеводным обменом и средним возрастом 55,6 лет составили группу контроля. У всех обследуемых производили забор 6 мл венозной крови натощак в пробирки Vacuette с гепарином лития в качестве антикоагулянта. Кровь сразу же центрифугировали при $t=+4^{\circ}\text{C}$ 15 минут (3500 об/мин). Плазму отбирали в микропробирки, добавляли четырехкратный объем 5%-ледяной метафосфорной кислоты, оставляли на льду на 15 минут и вновь центрифугировали 10 минут (12000 об/мин). Нативную и депротеинизированную плазму замораживали при -80°C . Последующий анализ проводили с использованием набора реагентов фирмы Cell Biolabs на микропланшетном ридере Varioscan Flash Thermo Fisher Scientific. В группе больных сахарным диабетом концентрация общего глутатиона составила $0,603 \pm 0,407$ мкмоль/л, что ниже, чем в группе контроля $0,660 \pm 0,363$ мкмоль/л ($t=0,388$, $p=0,7$). Референсные значения уровня глутатиона находились в пределах $0,008$ – $0,700$ мкмоль/л. Концентрацию перекиси водорода в опытных пробах определяли по калибровочной кривой. В группе больных сахарным диабетом она составила $2,861 \pm 1,357$ мкмоль/л, что выше, чем в группе контроля $1,777 \pm 0,563$ мкмоль/л, и эти различия статистически значимы ($t=2,42$, $p=0,02$). Группы также отличались по вариабельности: у больных отмечается больший разброс значений ($p=0,01$). Таким образом, выявлена тенденция к снижению концентрации глутатиона и увеличению содержания активных форм кислорода в плазме крови больных сахарным диабетом 2-го типа, что, вероятно, связано с характерными чертами заболевания, а именно, глюкозо- и липотоксичностью, способствующими формированию дисбаланса между продукцией и обезвреживанием свободных радикалов.

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СИСТЕМЫ КРОВЬ - СПЕРМОПЛАЗМА В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ

О.А. Гусякова, С.И. Мурский, О.И. Мелешкина, А.В. Козлов, Ю.В. Первова, Т.В. Старикова

Самарский государственный медицинский университет МЗ РФ, Самара, Россия

По данным ВОЗ частота бесплодных браков в разных странах колеблется от 10 до 20%. Как известно, состояние репродуктивной системы мужчин в основном оценивается по количеству и подвижности сперматозоидов, сохранности их морфологии. Метаболические характеристики спермальной плазмы, обеспечивающей жизнеспособность сперматозоидов, изучены фрагментарно. Исследование проводилось на базе Клиник СамГМУ. Исследованы биологические образцы крови и эякулята 15 пациентов скрпизооспермией, 25 – с олигоастенотератозооспермией с изучением морфологических особенностей клеточного состава, параметров белкового, углеводного, липидного и минеральных обменов с помощью анализаторов «Hitachi-902» и Cobas Integra 400+. В качестве контроля исследовались образцы крови и эякулята 100 практически здоровых лиц от 20 до 45 лет с нормоспермией, наличие острых и хронических воспалительных заболеваний исключалось с помощью микробиологического исследования эякулята с использованием MALDI-TOFF спектрометрии. Выявлено при значительно более низких показателях общего белка и альбумина отмечается высокая активность ферментов трансаминирования АлАТ, АсАТ и особенно ГГТ. В содержании же конечных продуктов азотистого обмена отмечается близость показателей сыворотки крови и спермоплазмы. Показатели липидного обмена продемонстрировали значимо более низкие результаты тестирования в спермальной плазме. Установлены различия в показателях белкового, углеводного, липидного, минерального обменов в показателях спермоплазмы в зависимости от концентрации сперматозоидов – как в норме, так и при криптоспермии. Так, установлен параллелизм в увеличении концентраций альбумина, креатинина, мочевои кислоты и количества сперматозоидов. Выявлены биохимические показатели, сопровождающие снижение подвижности и появление патологических форм сперматозоидов при олигоастенотератозооспермии в зависимости от степени выраженности клеточной патологии. Прослеживается четкая корреляция между метаболическими и морфо-функциональными особенностями сперматозоидов.

ИЗМЕНЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ТИОПЕНТАЛОМ НАТРИЯ В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕНИЯ ЦИРКАДИАННОГО РИТМА

Е.Г. Батоцыренова^{1,2}, Т.А. Кострова, Е.Х. Жилыева

¹Институт токсикологии; ²Педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Исследование проблемы времени в биологических системах, в частности, циркадианных ритмов направлено на изучение десинхронизации – нарушения согласованности работы регуляторных механизмов поддержания гомеостаза. В нашем исследовании было изучено состояние антиоксидантной системы (АОС) в условиях острой интоксикации депримирующим препаратом в дозе LD50 и изменения светового режима существования экспериментальных животных. Эксперимент был проведен на 60 беспородных белых крысах-самцах, весом 200–220 г. Введение тиопентала натрия производили внутривенно в дозе LD50. После этого крысы из опытной группы были разделены на 3 группы: первая – световой режим 12/12, вторая – режим световой депривации и третья группа – режим темновой депривации. Через 30 дней после интоксикации определялись показатели системы АОС в гемолизате эритроцитов. Так, концентрация восстановленного глутатиона в первой группе повышалась на 30%, во второй группе – повышалась на 9% и в третьей – понижалась на 13% по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы. Концентрация малонового диальдегида в группе с естественным освещением повышалась на 30%, а в группах с измененным световым режимом снижалась, во второй группе на 7%, в третьей группе – на 15% по сравнению со значениями контрольной группы. При исследовании активности группы ферментов АОС выявлено, что активность супероксиддисмутазы в первой группе снижалась на 32%, в двух других группах повышалась в среднем на 25% по сравнению с контрольными показателями. Активность глутатионтрансферазы в подопытных группах снижалась: во второй группе – на 18%, а в третьей группе – на 36% по сравнению с контрольными значениями. Активность глюкозы-6-фосфатдегидрогеназы в группе с обычным освещением повышалась на 72%, а в группе с режимом темновой депривации увеличивалась почти на 200% по сравнению с контролем. Таким образом, данное исследование выявило разнонаправленный характер изменений показателей АОС в условиях разного светового режима в отдаленный период после острого тяжелого отравления тиопенталом натрия.

ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ЭНДОГЕННЫХ ПЕПТИДОВ КАК МАРКЕРОВ РАЗВИТИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ «С»

А.М. Эфендиев, Г.И. Азизова, З.Г. Гидаева, А.Р. Дадашова

Азербайджанский медицинский университет, Баку, Азербайджан

В мире вирус хронического гепатита С (ХВГС) поражает около 500 миллионов человек, вследствие чего наблюдается хроническое прогрессирующее повреждение печени. Важную роль в развитии процессов воспаления, поддержании и регуляции адаптивной иммунной системы играют эндогенные антимикробные пептиды. Целью исследования было изучение маркеров эндотоксемии (эндотоксина и липополисахарид-связывающего белка LBP) и выявление взаимосвязи с иммунными показателями в патогенезе ХВГС. Была исследована кровь 87 больных в возрасте 17–38 лет, которые были разделены на две группы: I группа – 45 больных с хроническим вирусным гепатитом С и II группа – 42 больных ХВГС, осложненным бактериальной инфекцией (пневмония). Контрольную группу составляли 20 здоровых доноров. Диагноз ХВГС был поставлен согласно классификации Всемирного конгресса гастроэнтерологов (Лос-Анджелес, 1994). Из биохимических маркеров определяли общий, прямой и непрямой билирубин и активность фермента γ -глутамилтрансферазы (ГГТ) и содержание общего белка. Статистическую обработку данных проводили с помощью U-критерия Уилкинсона (Манна–Уитни). Значение $p < 0,05$ принималось как достоверное. Все биохимические показатели (билирубин и его фракции, активность АлАТ) в обеих группах были повышены по сравнению с нормой, и выраженности этих изменений отвечала активность и клиническим проявлениям гепатита. Во II группе концентрация АсАТ увеличивалась на достоверно значимую величину $p < 0,01$, а в I группе находилась в пределах нормы. Концентрация ГГТ во II группе увеличивалась в 1,9 раза, что свидетельствует о тяжелом некролизе гепатоцитов. Количество эндотоксина при ХВГС в I группе составляло $24,4 \pm 2,3$ МЕ/мл, а во II группе $57,7 \pm 5,2$ МЕ/мл при контроле $0,10 \pm 0,01$ МЕ/мл. Уровни LBP коррелировали с тяжестью инфекционного процесса в печени. Наиболее высокий уровень был отмечен во II группе – повышение в 18,8 раза ($443,6 \pm 29,6$ нг/мл), а в I группе – в 5,9 раза ($138,7 \pm 8,9$ нг/мл) по сравнению с контролем. Таким образом, можно сделать вывод, что содержание липополисахарид-связывающего белка быстро возрастает при наличии бактериальной инфекции, что не исключает перспективность использования этого белка для количественной оценки эндотоксемии и в качестве маркера развивающегося воспалительного процесса.

КСАНТИНОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В АДИПОЦИТАХ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

В.В. Иванов, Н.А. Перекуча, Е.А. Степоява *Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия*

Согласно современным представлениям в механизмах возникновения сахарного диабета (СД) типа 1 и развития осложнений важную роль играет окислительный стресс. Важным ферментативным источником супероксид-анион радикала и H_2O_2 является ксантиноксидоредуктаза, которая в нормальных условиях находится преимущественно в ксантиндегидрогеназной форме и может обратимо или необратимо переходить в ксантиноксидазу в результате окислительной модификации. У грызунов ксантиноксидоредуктаза в жировой ткани экспрессируется с высокой скоростью по сравнению с другими тканями. Цель: установить роль ксантиноксидазы в формировании окислительного стресса в адипоцитах крыс при экспериментальном сахарном диабете типа 1. СД типа 1 у крыс-самцов Wistar вызывали инъекцией аллоксана или стрептозотоцина. Адипоциты из эпидидимальной жировой ткани изолировали с помощью коллагеназы. В адипоцитах определяли содержание гидроперекисей липидов (ГПЛ) FOX-2 методом, ксантиноксидазную (КО) и ксантиндегидрогеназную (КД) активность с использованием субстрата птерина флуоресцентным методом. Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Аллоксановый и стрептозотоциновый диабет у крыс сопровождался повышением содержания ГПЛ в адипоцитах 1,6 раза ($p < 0,05$) и 1,7 раза ($p < 0,05$) соответственно. При этом КД активность увеличивалась в 1,7 раза ($p < 0,05$) при аллоксановом и в 1,8 раза ($p < 0,05$) при стрептозотоциновом диабете, КО активность возрастала в 1,8 раза ($p < 0,05$) и в 2 раза ($p < 0,05$) соответственно. Повышение КД активности в адипоцитах крыс с СД обусловлено увеличением величины экспрессии м-РНК фермента в 2,5 раза ($p < 0,05$) и 3,2 раза ($p < 0,05$) соответственно. Введение крысам с аллоксано-

вым диабетом ингибитора КО аллопуринола снижало уровень ГПЛ в адипоцитах на 21% ($p < 0,05$). Увеличение ксантиноксидантной активности и уровня гидроперекисей липидов при диабете обусловлено, в определенной мере, повышением экспрессии мРНК ксантиндегидрогеназы и посттрансляционной модификацией ксантиндегидрогеназной активности в ксантиноксидантную. Важный вклад ксантиноксиданты в развитие окислительного стресса при экспериментальном диабете подтверждается данными о способности аллопуринола снижать уровень гидроперекисей липидов в адипоцитах.

ИССЛЕДОВАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ И КИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ОРГАНАХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

А.Г. Соловьева Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия

Развивающаяся при термической травме ожоговая болезнь сопровождается возникновением тканевой гипоксии, нарушением метаболизма. Ключевую роль в энергетическом обмене играет лактатдегидрогеназа (ЛДГ, КФ 1.1.1.27), от активности которой зависит соотношение лактат/пируват и НАД/НАДН в клетках. Целью работы явилось изучение активности и кинетических свойств ЛДГ в органах крыс на 3, 7 и 10 сутки после ожога. Материалы и методы. Эксперимент проведен на 18 крысах линии Wistar. Под эфирным наркозом животным наносили ожог кипятком (20%, экспозиция – 3 с), на 3, 7 и 10 сутки забивали путем декапитации. Контроль представлен здоровыми животными. Приготовление гомогенатов из печени, почек, сердца, легких проводилось по Н.Д. Ещенко (1982). Активность ЛДГ определяли по Г.А. Кочетову (1980), концентрацию белка – по О.В. Королевой (1979), кинетические характеристики (K_t , V_{max} , K_a) – по J. Kostir (1985). Результаты исследования обрабатывали с помощью BIOSTAT. Результаты. Установлено, что на 10 сутки после ожога происходит перераспределение общей активности ЛДГ в прямой реакции (ЛДГпр) – активность уменьшалась в ряду: почки → сердце → легкие → печень. Наибольшая общая активность ЛДГпр у животных с ожогом (3, 7 сутки) обнаружилась в почках, наименьшая – в легких. Общая активность ЛДГ в обратной реакции (ЛДГобр) у крыс с ожогом располагалась в порядке уменьшения: почки → сердце → печень → легкие. Удельная активность ЛДГпр и ЛДГобр увеличилась во всех исследуемых органах на все сутки после ожога, что привело к изменению соотношения ЛДГпр/ЛДГобр. При ожоге в сердце, почках и печени отмечено снижение соотношения на всех исследуемых сутках после ожога, что свидетельствует о накоплении лактата, и как следствие о развитии гипоксии. Показано, что при ожоге изменяются сродство к субстратам, максимальная скорость ферментативной реакции и каталитическая эффективность ЛДГ. Таким образом, выявлено изменение каталитических и кинетических свойств ЛДГ при ожоге, что может быть связано с развитием эндогенной интоксикации, полиорганной недостаточности, изменением клеточных структур и гипоксии.

НАРУШЕНИЯ БЕЛКОВОГО И ЛИПИДНОГО СПЕКТРА МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

А.И. Конопля, Н.А. Быстрова, А.А. Шульгинова Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Цель – выявление изменений структурно-функциональных свойств эритроцитов периферической крови у пациентов с хронической ишемией головного мозга (ХИМ). Обследовано 57 пациентов БМУ «Курская областная клиническая больница» с ХИМ на фоне гипертонической болезни II стадии (основная группа) и 15 практически здоровых людей (контрольная группа). Возраст пациентов и доноров в среднем составлял 50 ± 5 лет. Клинико-инструментальное обследование проводили по общепринятым стандартам. Лабораторные методы исследования эритроцитов периферической крови проводились при поступлении больных в стационар. Эритроциты получали из 5 мл гепаринизированной крови. Мембраны эритроцитов выделяли методом G.T. Dodge, липиды мембран – методом тонкослойной хроматографии, электрофорез белков – в вертикальных пластинах полиакриламидного геля. У пациентов с ХИМ при госпитализации выявлено снижение в эритроцитарной мембране уровня α - и β -спектрина соответственно на 17,2 и 13,2%, анкирина на 29,7%, паллидина на 35,8%, белка полосы 4.5 на 40,7%, дематина на 51,1%, глицеральальдегид-3-фосфатдегидрогеназы (Г-3-ФД) на 44,1% и глутатион-S-трансферазы (Г-S-T) на 68,9% при повышении представительности белка полосы 4.1 на 18,6%, актина на 19,2%, тропомиозина на 30,4% и нормальном содержании анионтранспортного белка. Установлено снижение в эритроцитарной мембране содержания фосфатидилхолина (ФХ) на 60,2%, фосфатидилэтаноламина (ФЭ) на 17,4%, фосфатидилсерина (ФС) на 41,7%, фосфатидилинозитола (ФИ) на 34,0%, глицерофосфолипидов (ГФЛ – сумма ЛФХ, ФХ, ФЭ, ФС и ФИ) на 31,5%, сфингомиелина (СМ) на 20,5%, фосфолипидов (ФЛ – сумма ГФЛ и СМ) на 30,1%, эфиров холестерина (ЭХ) на 44,2%, суммы холестерина и его эфиров (ХС) на 6,3%, повышение уровня лизофосфатидилхолина (ЛФХ) на 41,3%, свободного холестерина (Х) на 23,2%, триацилглицеролов на 44,6%, свободных жирных кислот на 46,2%, при нормальном содержании моно- и диацилглицеролов. При анализе соотношений фракций липидов установлено повышение соотношения ЛФХ/ФХ, СМ/ФХ, СМ/ФС, СМ/ФИ, ХС/ФЛ, Х/ЭХ и снижение ФХ/ФЭ, ФХ/ФС, ФХ/ФИ. Таким образом, у пациентов с ХИМ в мембране эритроцитов существенно изменяется содержание и соотношения фракций белков и липидов, что требует проведения фармакологической коррекции.

КОРРЕКЦИЯ ПРЕПАРАТАМИ МАГНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ СИНДРОМОВ ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ И ОКСИДАНТНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ЭТАНОЛОМ

А.В. Локтионова Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Цель – оценить метаболическую эффективность препаратов магния при хронической интоксикации этанолом. Исследования на 88 здоровых половозрелых крысах Вистар массой 150–200 г. При хронической алкогольной интоксикации (ХАИ) 20% этанол в дозе 3 мл/кг вводили в течение 30 или 60 дней (ХАИ-30, ХАИ-60) через 24 часа, внутривентрикулярно. Животных с ХАИ-30 делили на 5 групп по 9–10 особей в каждой: 1-я группа (контрольная); 2-я группа – ХАИ –30; 3-я группа – ХАИ-30 и введение магне В6 (*per os*, 100 мг/кг в пересчете на магний, через 24 часа, №14); 4-я группа – ХАИ-30 и введение магнелиса (*per os*, 96 мг/кг в пересчете на магний, через 24 часа, №14); 5-я группа – Хаи-30 и введение панангина (*per os*, 33,7 мг/кг в пересчете на магний, через 24 часа, №14). При ХАИ-60 3–5 группам животных вводили аналогичные препараты магния. Введение препаратов магния начинали за 15 суток до забоя, который осуществляли через 24 часа после последнего введения этанола и препаратов. Для оценки функционального состояния гепатоцитов в плазме крови с использованием стандартных

наборов реактивов определяли активность аспартат- и аланинаминотрансфераз (АСТ, АЛТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), гаммаглутаминтранспептидазы (ГГТ), содержание билирубина, фибриногена и протромбиновый индекс (ПТИ). Интенсивность ПОЛ оценивали по содержанию ацилгидроперекисей (АГП) и малонового диальдегида (МДА) в плазме крови. Определяли общую антиокислительную активность сыворотки крови (ОАА), активность каталазы, супероксиддисмутазы (СОД) и концентрацию стабильных метаболитов оксида азота (СМНО). При ХАИ-30, в большей степени выраженности при ХАИ-60, установлено развитие оксидативного стресса и основных биохимических синдромов поражения печени, при этом этанольная интоксикация в течение 30 или 60 дней приводит к нарушению 15 (100%) лабораторных показателей со значительным увеличением нарушений II–III степени, соответственно 46,6% и 73,3%. Коррекция метаболических нарушений применением магнелиса или панангина при ХАИ-30 нормализует и корректирует (не до уровня контроля) соответственно 4 и 6, а введение магне В6 соответственно 6 и 7 из 15 нарушенных интоксикацией этанолом лабораторных показателей. При ХАИ-60 магне В6 также оказался эффективнее.

УЧАСТИЕ МЕЛАТОНИНА В РЕГУЛЯЦИИ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

К.С. Эльбекян, И.Л. Литвиненко, Е.В. Маркаровна

Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, Россия

В настоящее время достаточно хорошо известно, что любая интоксикация всегда сопровождается реакцией на нее со стороны иммунной системы. В этой связи применение иммуномодулирующих средств для нивелизации последствий влияния ксенобиотиков приобретает важное значение. Имеется большое количество экспериментальных и клинических доказательств о ярко выраженном иммуностимулирующем действии экзогенного гормона щитовидной железы – мелатонина. Не вызывает сомнения и его терапевтический эффект. Цель: изучить роль эпифиза в иммунном ответе организма белых беспородных крыс на интоксикацию полиметаллической смесью. Материалы и методы: эксперименты проведены на нелинейных крысах-самцах. Изучалось влияние мелатонина на иммунологические показатели крови. Животные были разделены на две подгруппы (по 10 крыс в каждой): контрольную (введение мелатонина) и опытную (введение полиметаллической смеси и мелатонина). Крысы получали мелатонин внутривнутривенно на протяжении 10, 30 и 90 дней один раз в сутки между 16–18 часами в дозе 0,1 мг/кг. Забор крови производили на следующий день после прекращения инъекций. Результаты. Согласно полученным результатам абсолютное количество Т-лимфоцитов после 10 дней введения мелатонина оказалось в 2,7 раза выше ($8,85 \pm 0,11$ против $3,29 \pm 0,7$, $p < 0,001$), чем в контрольной группе и продолжало нарастать, достигнув максимума к концу третьего месяца ($9,5 \pm 0,09$). В первый месяц наблюдений абсолютные значения регуляторных субпопуляций – Т-супрессоры и Т-хелперы – ощутимым колебаниям не подвергались. Через 90 дней содержание Т-хелперов становилось заметно меньше ($0,26 \pm 0,01$ против $0,350,03$, $p < 0,001$), при некоторой тенденции к увеличению Т-супрессоров. Это приводило к заметному росту ($p < 0,001$) значения коэффициента СД4/СД8. Число ЦИК, оставались в ходе эксперимента в пределах нормы. Максимальное количество В-лимфоцитов регистрировалось через 10 дней после начала эксперимента ($1,7 \pm 0,09$ и $0,45 \pm 0,04$ в контроле) и оставалось значимым до конца. Таким образом, изучение реакции иммунной системы на введение мелатонина показало, что данный гормон активизирует включение звеньев клеточного и гуморального иммунитета, а также повышает связанность компонентов иммунного статуса, которая может быть рассмотрена как активация иммунной системы.

ВЛИЯНИЕ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА НА ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ МОДИФИКАЦИЮ БЕЛКОВ И РЕАЛИЗАЦИЮ АПОПТОЗА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ P19 ПРИ НОРМОКСИИ И ГИПОКСИИ

Д.С. Орлов, Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева

Сибирский государственный медицинский университет, Томск; Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

На сегодняшний день установлено, что опухолевая прогрессия помимо дисрегуляции апоптоза сопровождается гипоксией и формированием окислительного стресса, приводящего к окислительной модификации белковых молекул в клетке. Управление окислительной модификацией белков является одной из потенциальных мишеней для регуляции апоптоза. Опухолевые клетки линии P19 культивировали в полной питательной среде α -MEM. Культуру поддерживали в логарифмической фазе роста. Моделирование гипоксии осуществляли в специальной камере ("Hypoxia Incubator Chamber"), заполняемой газовой смесью (5% O_2 , 5% CO_2 , 90% N_2). Инкубация длилась 18 часов. Конечная концентрация N-ацетилцистеина составляла 5 мМ. Оценку апоптоза проводили на проточном цитофлуориметре аннексийным методом. Содержание карбонильных производных белков определяли по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином и выражали в нмоль/мг белка. Концентрацию белка в анализируемых образцах измеряли методом Бредфорда. В условиях гипоксии внутриклеточная концентрация карбонильных производных белков увеличивалась в 2,2 раза ($p < 0,05$), что свидетельствует о формировании окислительного стресса. При этом повышался процент аннексин-положительных клеток в 4,1 раза ($p < 0,05$) по сравнению с нормоксией. При гипоксии под воздействием N-ацетилцистеина регистрировалось снижение содержания карбонильных производных белков в 3,3 раза ($p < 0,05$), в то же время, при нормоксии N-ацетилцистеин не изменял данный показатель ($p > 0,05$). Количество клеток, вступивших в апоптоз в случае одновременного воздействия гипоксии и N-ацетилцистеина, было выше, чем в культуре, подвергнутой воздействию только N-ацетилцистеина в 1,7 раза ($p < 0,05$).

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ УБИКВИТИН-НЕЗАВИСИМОЙ ДЕГРАДАЦИИ ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА В РАЗВИТИИ АУТОИММУННОЙ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ

А.А. Белогуров^{1,2}, А.Г. Габитов^{1,2} ¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Рассеянный склероз (РС) – это системное аутоиммунное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы человека, характеризующееся множественными повреждениями белого вещества. Среди главных аутоантигенов при РС выделяют несколько белков миелиновой оболочки, в том числе основной белок миелина (МВР), в значительных количествах присутствующий в мембране олигодендроцитов. В процессе метаболизма внутриклеточный протеолиз МВР может происходить под действием различных протеаз, а также мультикалитического протеиназного комплекса – протеасомы. Абсолютное большинство белков разрушаются 26S протеасомой по убиквитин-зависимому пути. Нами было установлено, что МВР

принадлежит к крайне малочисленной группе белков, способных подвергаться протеолизу 26S протеасомой в отсутствии молекул убиквитина. Молекулярный механизм гидролиза MBP включает в себя заряд-опосредованное связывание с интерферон-индуцибельной субъединицей REGα. Нами было установлено, что при развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита (ЕАЕ) – животной модели рассеянного склероза – в головном мозге иммунизированных животных конститутивная протеасома в значительной степени замещается иммунопротеасомой, при этом имуносубъединица β1i локализуется преимущественно в олигодендроцитах. Показано, что увеличение содержания иммунопротеасомы в головном мозге мышей с ЕАЕ приводит к образованию повышенного количества ряда патогенных пептидов MBP, включая пептид ENPVVHFF, являющийся частью энцефалитогенного региона. Активированные CD8⁺ Т-клетки, специфичные к данному пептиду, эффективно лизировали олигодендроциты, обработанные интерфероном-гамма. Специфический ингибитор имуносубъединицы β1i селективно воздействовал на иммунопротеасому *in vitro*, а также эффективно подавлял развитие ЕАЕ *in vivo* у экспериментальных животных. Полученные факты указывают на связь между убиквитин-независимой протеолитической активностью иммунопротеасомы в отношении основного белка миелина и развитием рассеянного склероза, а также на перспективность специфических ингибиторов иммунопротеасомы как потенциальных лекарственных средств. *Работа была поддержана проектом РНФ № 14-14-00585 «Молекулярный механизм убиквитин-независимого протеолиза белков протеасомой и его роль в норме и патологии».*

QUALITY OF HUMAN MATURE LYMPHOCYTES IN THE ENVIRONMENT OF MHC-MISMATCHED RECIPIENT

Nadia Anikeeva¹, Dolores Grosso², Neal Flomenberg^{2,3}, Yuri Sykulev^{1,2,3} *Departments of ¹Microbiology and Immunology and ²Medical Oncology, ³The Sidney Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University, Philadelphia, USA*

We have developed an assay to evaluate the frequency and functional activity of antigen-specific CD8 T cells. The assay measures changes of intracellular Ca²⁺ induced by antigen stimulation in real time by fluorescent microscopy in individual CD8 T cells, which are immobilized on a glass surface to form a monolayer enabling the cells to present cognate peptides to each other. The proposed approach permits comparison of the same cell before and after stimulation to avoid false positive results providing a significant increase in the sensitivity and utility of the assay. We utilized the approach to characterize the frequency and quality of human cytomegalovirus-specific CD8 T cells from peripheral blood of healthy donors and patients who underwent haploidentical stem cell transplantation. We found significantly higher number of CMV-specific CD8 T cells in patient's blood as opposed to normal individual. However the kinetics of Ca²⁺ signaling in the T cells from the patient was much slower suggesting that the patient's CMV-specific T cells were less efficient as compared to those from normal donors. The assay has important implications for evaluating the virus specific responses in patients after stem cell transplantation.

ИММУННЫЕ ПРОТЕАСОМЫ В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ КРЫСЫ

Н.П. Шарова, Я.Д. Карпова, Ю.В. Люпина, П.А. Ерохов, Т.М. Астахова

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Исследована экспрессия иммунных протеасом, образующих пептиды для молекул главного комплекса гистосовместимости класса I, в раннем развитии иммунной системы крысы. Показано, что в тимусе, первичном лимфоидном органе, уровень протеасом, содержащих протеолитические иммунные субъединицы LMP2 и LMP7, достигает высоких значений к концу эмбриогенеза. При этом наибольшее количество иммунных субъединиц выявляется в антигенпредставляющих клетках тимуса: эпителиальных и дендритных клетках. Очевидно, становление процессов селекции в тимусе, зависимое от активности иммунных протеасом, может происходить уже в пренатальном онтогенезе. В селезенке, вторичном лимфоидном органе, уровень иммунных протеасом постепенно повышается к концу третьей постнатальной недели по сравнению с эмбриональным периодом. Этот процесс сопряжен с формированием белой пульпы В- и Т-лимфоцитами, содержащими иммунные протеасомы. В-лимфоциты экспрессируют иммунные протеасомы для выполнения функции антигенпредставляющих клеток, в то время как в Т-лимфоцитах иммунные протеасомы контролируют пролиферацию, очевидно, путем образования биологически активных пептидов. В печени также наблюдается возрастание количества иммунных протеасом к концу третьей постнатальной недели по сравнению с эмбриональным периодом. Однако динамика их содержания отличается от таковой в селезенке волнообразным характером: первая волна повышения длится с 18-го эмбрионального до 3-го постнатального дня, затем наблюдается спад со следующим возрастанием к 21-му постнатальному дню. Такая сложная динамика связана с выполнением печенкой функции первичного лимфоидного органа в эмбриогенезе и прекращением этой функции после рождения. В печени выявляются В-лимфоциты, обогащенные иммунными протеасомами, с конца эмбрионального периода по 3-й постнатальный день. К концу третьей постнатальной недели экспрессия иммунных протеасом повышается в гепатоцитах, что сопровождается увеличением содержания в них нейрональной NO-синтазы. По-видимому, в данный период экспрессия иммунных протеасом регулируется по сигнальному пути с участием окиси азота. В целом, результаты указывают на возможность иммунных реакций у крысы, связанных с Т-клеточным звеном иммунитета, начиная с 3-й постнатальной недели. *Работа поддержана РФФИ, грант № 15-04-03494.*

АНТИТЕЛА К OmpF ПОРИНУ НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS КАК ВОЗМОЖНАЯ ПРИЧИНА РАЗВИТИЯ АУТОИММУННОГО ТИРЕОИДИТА (БОЛЕЗНИ ГРЕЙВСА)

О.Ю. Портнягина¹, В.А. Хоменко¹, Е.Ф. Соловьева², О.Д. Новикова¹ *¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН; ²Тихоокеанский медицинский университет МЗ РФ, Владивосток, Россия*

Псевдотуберкулёз – заболевание, вызываемое *Yersinia pseudotuberculosis*, отличается от других острых кишечных инфекций тем, что у больных нередко развиваются вторично-очаговые формы, которые рассматриваются как аутоиммунные процессы. Болезнь Грейвса – наиболее часто встречающееся аутоиммунное заболевание щитовидной железы (ЩЖ), которое характеризуется симптомами тиреотоксикоза, развивающегося вследствие накопления в крови больных стимулирующих аутоантител, конкурирующих с тиреотропным гормоном за связывание с рецептором тиреотропного гормона (рТТГ). В случае инфекционного происхождения болезни Грейвса процесс избыточной активации ЩЖ через рТТГ может осуществляться за счет антител к некоторым иммунодоминантным антигенам наружной мембраны бактерий, а именно к порообразующим

белкам (поринам). В настоящей работе была исследована перекрестная иммунореактивность между OmpF порином *Y. pseudotuberculosis* и рТТГ человека. В качестве материалов для исследования были использованы сыворотки крови и операционные ткани ЩЖ, полученные от больных с клиническими и диагностическими признаками диффузного токсического зоба. Из образцов операционных тканей ЩЖ была выделена сумма белков, среди которых был идентифицирован рТТГ. Установлено, что с антигенами экстрактов ЩЖ и с OmpF порином *Y. pseudotuberculosis* взаимодействуют сыворотки крови пациентов, поликлональные антитела к порину псевдотуберкулёзного микроба и моноклональные антитела к рТТГ. С помощью рекомбинантных мутантных поринов с делециями некоторых наружных петель (L1, L4, L6, L8), показано, что участок аминокислотной последовательности OmpF порина, соответствующий наружной петле L1, содержит антигенные эпитопы, которые взаимодействуют как с антителами к порину, так и с антителами к рТТГ. Поскольку рТТГ и OmpF практически не имеют гомологии в первичной структуре, скорее всего, перекрестно реагирующие антитела имеют специфичность к подобным конформационным антигенным детерминантам, формирующимся на уровне третичной структуры белковых молекул. Можно предположить, что антитела к таким эпитопам OmpF порина, присутствующие в сыворотках крови некоторых пациентов с болезнью Грейвса, способны взаимодействовать с рТТГ, аналогично стимулирующим аутоантителам к нему и вызывать гиперстимуляцию ЩЖ, ведущую к развитию тиреотоксикоза.

НАРУШЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ СФИНГОЛИПИДОВ В МЕХАНИЗМЕ РАЗВИТИЯ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ И САХАРНОГО ДИАБЕТА

Т.С. Саатов *Институт биоорганической химии АН Республики Узбекистан, Ташкент, Узбекистан*

По современным представлениям инсулинорезистентность, сахарный диабет и его осложнения неразрывно связаны с нарушением метаболизма сфинголипидов и их производных. Однако этот вопрос остается всё ещё окончательно не решенным. Исходя из этого, целью данной работы является изучение роли нарушения метаболизма сфинголипидов в патогенезе инсулинорезистентности и сахарного диабета. Для реализации поставленной цели создана адекватная модель инсулинорезистентности у крыс путем длительного вскармливания их высококалорийной диетой. В различных органах животных с моделью сахарного диабета определено содержание метаболитов сфинголипидов (сфингомиелин, сфингозин, церамид), а также активность фермента сфингомиелиназы. Установлено, что в печени, а также в скелетных мышцах и миокарде инсулинорезистентных крыс происходит достоверное увеличение активности как нейтральной, так и кислой сфингомиелиназы. При этом в указанных органах наблюдается снижение концентрации сфингомиелина до 40% от уровня контроля. Отмечалось также достоверное увеличение концентрации церамида и повышение уровня сфингозина в изученных органах экспериментальных животных. Гиперпродукцию церамида следует рассматривать как ключевой фактор патогенеза инсулинорезистентности и сахарного диабета. У больных сахарным диабетом II типа нами установлено нарушение в частотах встречаемости аллелей и генотипов по полиморфизму G-308 A гена TNF α , которое ассоциируется с повышенным уровнем продукции этого цитокина.

На основании результатов собственных исследований клеточную сигнализацию сфинголипидов при развитии инсулинорезистентности можно сформулировать следующим образом: Жировая ткань, обогащенная липидами при ожирении и инсулинорезистентности, усиленно секретирует TNF α , который стимулирует активность сфингомиелиназы и гидролиз сфингомиелина с гиперпродукцией церамида. Церамид ингибирует сигнальный путь инсулина и подавляет транспорт глюкозы в клетку, что приводит к развитию гипергликемии и снижению чувствительности клеток к инсулину – инсулинорезистентности. Кроме того, церамид запускает процесс апоптоза β -клеток поджелудочной железы, что приводит к усугублению сахарного диабета.

ИММУНИЗАЦИЯ БЕЛКОМ LMP1 ВИРУСА ЭПШТЕЙНА–БАРР ИНДУЦИРУЕТ ОБРАЗОВАНИЕ КРОССРЕАКТИВНЫХ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К ОСНОВНОМУ БЕЛКУ МИЕЛИНА, *IN VIVO*

Я. Ломакин^{1,2}, А. Белогуров^{1,2} *¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

Рассеянный склероз является хроническим воспалительным заболеванием центральной нервной системы. На сегодняшний день очевидно, что наряду с участием Т-клеток активация В-клеток также необходима для развития данной патологии. Несмотря на обилие работ, посвященных роли аутореактивных В-клеток, патологические аутоиммунные антитела и процессы их образования до сих пор недостаточно охарактеризованы. Кроссреактивность собственных и вирусных антигенов рассматривается в качестве возможного механизма развития рассеянного склероза. Ранее в нашей лаборатории было показано, что антитела, специфичные к основному белку миелина (*myelin basic protein*, MBP), могут также взаимодействовать и с белком LMP1 (*latent membrane protein 1*) вируса Эпштейна–Барр. В данной работе, используя мышиные модели *in vivo*, мы показали, что антитела, первоначально индуцированные против вирусного белка LMP1, способны специфически взаимодействовать с MBP. Это исследование подтверждает возможную роль противовирусных миелин-реактивных антител как в индукции рассеянного склероза, так и в усилении развития заболевания. *Исследования были проведены в рамках проекта Минобрнауки России № RFMEFI60714X0061.*

ПОЛИМОРФНЫЕ МАРКЕРЫ ГЕНА MDR1 В ТЕРАПИИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

О.В. Шевченко, В.Б. Бородулин, А.А. Свистунов, А.В. Саратовцев, Е.В. Бобылева

Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского МЗ России, Саратов, Россия

В кишечнике гликопротеин Р выполняет роль насоса, «выкачивающего» лекарственное средство из клетки в просвет кишечника. Субстратами для этого насоса служат многие лекарственные препараты, в том числе карведилол, широко применяющийся в терапии артериальной гипертензии. Полиморфизм гена MDR1 – один из основных факторов активности гликопротеина-Р. Изучается значение нескольких полиморфных маркеров, но наиболее важным считается полиморфный маркер С3435Т гена MDR1 (в 26 экзоне) – замена в нуклеотидной последовательности в 3435-ом положении цитозинового нуклеотида на тимидиновый. У пациентов-носителей измененных аллельных вариантов гена MDR1 экспрессия гликопротеина-Р в кишечнике повышена, что может сопровождаться увеличением биодоступности карведилола. Цель: изучение влияния полиморфного маркера С3435Т гена MDR1 на эффективность лечения артериальной гипертензии карведилолом. В исследовании

приняли участие 26 человек, больных артериальной гипертензией 1-2 степени в возрасте от 30 до 59 лет. На этапе включения и в ходе терапии карведилолом проводились измерение артериального давления. Пациенты получали карведилол в дозе 50 мг в сутки двукратным приемом в течение 4 недель, после чего вновь были обследованы. Для генетического тестирования использовались гидрогелевые биочипы. Результаты и их обсуждение. Из 26 исследованных образцов ДНК в 7 образцах обнаружен генотип ТТ (С3435Т), в 6 образцах – генотип СС (С3435Т), и в 13 образцах – генотип СТ (С3435Т). Лица с генотипом СС гена MDR1 не имели значимого клинического эффекта после 4 недель терапии карведилолом. У пациентов с генотипом СТ гена MDR1 при исследовании систолического и диастолического АД показан несколько лучший терапевтический эффект карведилола. У лиц с генотипом ТТ гена MDR1 отмечался достаточно выраженный гипотензивный эффект карведилола, достигнуты целевые значения АД. Но в данной группе пациентов произошло существенное снижение ЧСС в среднем – до 55 уд/мин., что расценивается как побочный эффект фармакотерапии. Исследование показало, что пациенты с генотипом ТТ гена MDR1 имели более выраженный гипотензивный ответ на терапию карведилолом, а также более высокий риск развития брадикардии. Этот факт требует детального изучения и подтверждения в фармакокинетических исследованиях.

ОСОБЕННОСТИ ИНДУКЦИИ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТочНОЙ ГИБЕЛИ В Т-ЛИМФОЦИТАХ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И ПРИ РАЗВИТИИ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

С.Н. Абрамов, А.Р. Фатхуллина, З.И. Абрамова Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

До недавнего времени апоптоз считался единственной формой регулируемой гибели клеток, но проведенные исследования детального механизма апоптоза (Аро) показали, что существует еще одна форма программируемой клеточной гибели (ПКГ) – аутофагия (Аут). Появились данные о взаимосвязи апоптоза и аутофагии, в частности показано, что при длительном клеточном стрессе инициируется гибель клетки либо аутофагическим путем, либо по пути апоптоза. Рооп и соавторы (2012) обнаружили аутофагосомы в фибробластах и эпителиальных клетках пациентов со средне-тяжелой формой астмы, указывая на связь между Аут и снижением функции легких у больных. Пролонгацию аллергического воспаления при астме связывают с усилением выживаемости Т-лимфоцитов (Т-лф) и утратой ими способности к Аро. Однако, механизмы ПКГ, посредством которого происходит переключение с одного процесса на другой, не до конца ясны. Целью исследования стала оценка взаимосвязи Аро–Аут в норме и при развитии астмы на примере экспрессии генов анти-апоптотического белка Bcl-2 и анти-аутофагической кинзы mTOR. Анализ экспрессии генов bcl2 и mTOR в Т-лф здоровых доноров показал, что в процессе длительного культивирования в Т-лф, испытывающих недостаток питательных веществ, экспрессия генов bcl2 и mTOR снижается на 3–6 сут, что может свидетельствовать как об активации Аро, так и АУТ (как цитопротекторного фактора). Анализ экспрессии гена mTOR в Т-лф, обработанных Dex, показал что под действием Dex наблюдается сначала понижение экспрессии mTOR, но по мере увеличения факторов апоптоза, экспрессия гена mTOR возрастала, достигая уровня контроля, что может свидетельствовать об ингибирующем действии Dex на активацию аутофагии. Мы показали, что лимфоциты больных астмой показывали устойчивость к индукции апоптоза, что сопровождалось гиперэкспрессией гена bcl-2 на фоне снижения экспрессии киназы mTOR в течение 6 суток и активизации аутофагии (установлено методом Western blotting). Полученные результаты позволяют говорить, что существует взаимосвязь и переключение одного процесса ПКГ на другой. В Т-лф больных астмой показана активация аутофагии, которая может способствовать длительному функционированию Т-лф, персистенции заболевания и более тяжелым проявлениям на фоне факта выживаемости Т-лф в связи с утратой ими способности к апоптозу.

РОЛЬ ПРООКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В МЕХАНИЗМАХ РАЗВИТИЯ ГОНАРТРОЗА

В.В. Внуков, И.В. Кroleвец, С.Б. Панина, А.А. Плотников, А.Б. Сагакянц, М.А. Забродин, Н.П. Милютин

Кафедра биохимии и микробиологии, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Иванова, Южный федеральный университет; Кафедра травматологии и ортопедии, лечебной физкультуры и спортивной медицины ФПК и ППС, Ростовский государственный медицинский университет МЗ РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Гонартроз (ГА), или артроз коленных суставов, – мультифакториальное дегенеративно-дистрофическое заболевание с хроническим прогрессирующим течением. Важным фактором риска развития артроза является травма, которая способна инициировать процесс воспаления в тканях сустава, и приводить к развитию посттравматического артроза (ПТГА). Исследовали роль прооксидантных ферментов и цитокинов в развитии окислительного стресса и воспаления при ПТГА. Проведено клинико-биохимическое обследование 76 больных ПТГА I-IV стадии по шкале Kellgren/Lawrence, которые были разделены на 3 группы, в зависимости от стадии (I, II, III–IV) заболевания. В качестве контроля использовали кровь 20 практически здоровых доноров. В работе показано, что активность миелопероксидазы (МПО), важнейшего маркера воспаления, существенно возрастает в мононуклеарах периферической крови и более значительно в синовиальной жидкости (СЖ) больных ПТГА, что способствует развитию галогенирующего стресса и вторичному повреждению тканей сустава. Причем, степень активации МПО зависит от стадии гонартроза. В возрастании прооксидантного потенциала крови при ПТГА существенный вклад вносит НАДФН-оксидаза, активность которой увеличивается в мононуклеарах крови, способствуя повышенной продукции активных форм кислорода (АФК). Установлено, что активность ксантиноксидоредуктазы в СЖ, плазме и мононуклеарной фракции крови, а также уровень мочевой кислоты (МК) в плазме крови являются маркерами стадии посттравматического гонартроза. Известно, что МК и АФК способны индуцировать сборку инфламмосомы и процессинг интерлейкина-1β (IL-1β), важнейшего медиатора воспаления. В исследовании обнаружено, что при гонартрозе содержание провоспалительного цитокина IL-1β в плазме крови и СЖ значительно увеличено относительно контроля. Одновременно показано, что при ПТГА в плазме крови содержание провоспалительного цитокина IL-6 возрастает на 260–315% на различных стадиях заболевания, в СЖ уровень цитокина в 7–8 раз превышает его содержание в плазме, что обусловлено его интенсивным синтезом синовиоцитами. Таким образом, проведенное исследование показывает, что дегенеративный процесс в тканях сустава при артрозе сопровождается гиперпродукцией провоспалительных цитокинов в крови и СЖ на фоне развития окислительного стресса.

БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЯХ

С.Г. Дзугкоев, Ф.С. Дзугкоева, И.В. Можаяева, М.А. Отиев, А.И. Тедтоева, О.Ю. Гармаш, О.И. Маргиева

Институт биомедицинских исследований Владикавказского научного центра РАН, Владикавказ, Россия

Целью настоящего исследования было изучение роли окислительно-восстановительных процессов и метаболизма NO в развитии эндотелиальной дисфункции при различных патологиях. Реализуя цель исследования, данными нашей лаборатории установлено, что ведущую роль в генезе дисфункции эндотелия играют нарушения окислительно-восстановительных процессов и изменение метаболизма оксида азота. При СД типа I и гестационном СД у беременных, ИБС, на фоне экотоксических факторов отмечается активация процессов ПОЛ, повышение в эритроцитах концентрации вторичного продукта – МДА, и нарушения АОЗ клеток. Имеет место генерализованное поражение всех звеньев системы кровообращения: микро- и макроангиопатии. В их происхождении играет роль дефицит NO, нарушение его биодоступности, и снижение уровня экспрессии эндотелиальной NO-синтазы. Активные формы кислорода могут обеспечить разобщение оксидантного и редуктантного доменов в молекуле eNOS, что и сопровождается снижением продукции NO. Вместе с тем, как показали наши исследования, сам фермент начинает продуцировать АФК. В условиях окислительного стресса имеет место недостаточность кофермента BH4. В нормальных условиях в процессе реакции происходит перенос электронов из редуктантного домена одной субъединицы NO-синтазы на оксидантный домен другой субъединицы, которая соединяет гемовый активный центр. Кофактор BH4 играет, по-видимому, существенную роль в регуляции активности eNOS, обеспечивая «сопряжение» процесса восстановления молекулярного кислорода с окислением L-аргинина, а также сохранение стабильности фермента в виде димера. Таким образом, индуцированный гипергликемией, ишемией миокарда и влиянием цветных металлов, окислительный стресс, дисбаланс между продукцией NO и нейтрализацией защитными механизмами АФК играют важную роль в развитии сосудистых поражений. Из наших данных следует, что нарушение функционирования метаболического пути eNOS/NO можно рассматривать как ранний прогностический маркер возникновения и прогрессирования заболеваний атеросклеротического генеза. Эти фундаментальные данные открывают возможности для целенаправленной коррекции биохимических нарушений, включая антиоксиданты: коэнзим Q10, L-аргинин, статины, новый анксиолитик – афобазол.

АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗА – ИНТЕРАКТОР МЕЖДУ ЛИПИДНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ МЕМБРАН И СИГНАЛЬНЫМИ ПУТЯМИ КЛЕТКИ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

Л.М. Обухова¹, Е.И. Ерлыкина¹, И.А. Медяник², К.С. Яшин², Н.А. Щелчкова¹, А.А. Коробов¹, М.Н. Макарова¹

¹Нижегородская государственная медицинская академия МЗ РФ, ²Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия

Цель работы – анализ взаимосвязи ацетилхолинэстеразы эритроцитов с липидными компонентами мембран и белками сигнальных путей при злокачественных новообразованиях. Материалы и методы. Исследована кровь 19 пациентов со злокачественными новообразованиями эпителиальных тканей: 11 с глиобластомами и 15 здоровых людей. Определяли активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ), электрофоретическую подвижность эритроцитов (ЭФПЭ), содержание фракций липидов в эритроцитах (тонкослойная хроматография на пластинках «Sorbifil»). Протеомный анализ проводили по базам IntAct, STRING, BioGrid, SwissProt. Выявлено снижение активности АХЭ крови у пациентов со злокачественными опухолями (на 41%), снижение ЭФПЭ (на 59%), существенные изменения липидного спектра мембран эритроцитов. Корреляционный анализ показал достоверную взаимосвязь активности АХЭ с уровнем холестерина, фосфатидилэтаноламинов, сфингомиелинов, фосфатидилхолинов, лизофосфатидилхолинов и незатерифицированных жирных кислот. Поскольку в формировании отрицательного заряда наружной поверхности мембраны эритроцита участвуют не только липиды, но и белки, отсутствие взаимосвязи АХЭ с электрокинетическими свойствами эритроцитов ($r=0,005$) свидетельствует о незначительном влиянии белковых составляющих мембран на активность этого фермента. Установлено, что АХЭ, помимо участия в передаче нервных импульсов, играет значительную роль в регуляции пролиферации клеток (Grando, 2014), причем противоположную для малигнизированных и интактных клеток. По данным базы данных STRING показана взаимосвязь между АХЭ и транскрипционным фактором белком JUN. С другой стороны, выявлена роль АХЭ в процессах некроза и апоптоза (Park S.E. et al, 2004; Zhang X.J., Greenberg D.S., 2012). Наиболее важным представляется взаимодействие АХЭ в процессе апоптоза с белком p53 (Ye X. et al, 2015). Активность ацетилхолинэстеразы модулируется липидным спектром мембран. Кроме того, ацетилхолинэстераза принимает участие в работе сигнальных путей, регулирующих клеточную пролиферацию, некроз и апоптоз. Выявленное снижение активности этого фермента при карциномах и глиобластомах демонстрирует его возможную роль в патогенезе новообразований и открывает перспективы для разработки метода диагностики злокачественных опухолей с использованием активности ацетилхолинэстеразы.

CARD14 РЕГУЛИРУЕТ СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ NF-kB И FRA1 ПРИ ПСОРИАЗЕ

А.Д. Золотаренко, А.Н. Преловская, С.А. Брускин *Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия*

Псориаз – иммуноопосредованное воспалительное заболевание, которое характеризуется измененными иммунными и сосудистыми профилями в коже, а также гиперпролиферацией кератиноцитов. Одним из ключевых сигнальных путей, регулирующих развитие псориазического воспаления, является каскад транскрипционного фактора NF-kB. У больных псориазом были идентифицированы мутации в гене CARD14, которые могут активировать NF-kB и усиливать воспаление. В данной работе мы изучали роль гена CARD14 в регуляции сигнальных каскадов, связанных с образованием псориазических повреждений. Используя систему редактирования CRISPR/Cas9, мы провели нокаут гена CARD14 в клетках линии HEK293 и на полученной культуре подтвердили ингибирование экспрессии генов IL8 и TNF α , которые являются мишенями NF-kB и медиаторами псориазического воспаления. Мы также оценили экспрессию гена FRA1, который кодирует транскрипционный фактор семейства AP1, участвующий в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток, сверхэкспрессированный при псориазе. В клетках с нокаутом гена CARD14 наблюдалось снижение активации FRA1 в ответ на обработку провоспалительными цитокинами, что подтверждает гипотезу об участии транскрипционного фактора NF-kB в сверхэкспрессии FRA1, наблюдаемой при псориазе. Для оценки вклада FRA1 в развитие псориазических повреждений была создана линия кератиноцитов с индуцибельной сверхэкспрессией данного гена. Полученные клетки характеризовались более

активной пролиферацией и миграцией, чем клетки дикого типа, изменением фенотипа с эпителиального на мезенхимально-подобный, а также повышенной экспрессией матриксных металлопротеаз и маркеров воспалительного процесса, сходными с наблюдаемыми в коже больных псориазом. Проведенные эксперименты подтверждают гипотезу о том, что псориаз-ассоциированные мутации в гене CARD14 не только приводят к NFkB-опосредованному развитию воспаления, но и связаны с развитием псориазических повреждений на коже больных. Кроме того, они позволяют предположить существование петли аутоамплификации псориазического воспаления, в которой участвуют транскрипционные факторы NF-kB и FRA1, которая может активироваться через CARD14-опосредованные сигнальные каскады. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-01356 мол_А*

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА У ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ КОРОВ ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ

Л.Ю. Карпенко, А.А. Карпенко, А.И. Енукашвили, А.А. Бахта, А.Б. Андреева

Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Целью исследований было изучение сезонной динамики показателей минерального обмена в сыворотке крови у высокопродуктивных коров. Исследования проводили в животноводческом комплексе ЗАО «Ударник» Волосовского района Ленинградской области у коров черно-пестрой породы. При анализе сезонной динамики концентрации минеральных веществ в крови высокопродуктивных коров отмечено, что минимальные концентрации кальция ($2,1 \pm 0,6$ ммоль/л), фосфора ($1,22 \pm 0,28$ ммоль/л), магния ($0,7 \pm 0,02$ ммоль/л), калия ($5,5 \pm 0,7$ ммоль/л) отмечается в зимний период; максимальные концентрации кальция, магния, калия отмечаются в осенний период, фосфора в летний период. Исследование микроэлементного состава сыворотки крови высокопродуктивных коров в разные сезоны года показало, что минимальные уровни цинка, меди и железа, йода, селена наблюдаются в весенний период, а максимальные – в осенний. Концентрация свинца в сыворотке крови высокопродуктивных коров колеблется от $3,3 \pm 0,35$ нмоль/л в весенний период до $3,9 \pm 0,82$ нмоль/л в зимний период. Данные колебания концентрации были незначительны ($p > 0,05$). Концентрация кадмия в сыворотке крови высокопродуктивных коров наименьшая в весенний период ($0,81 \pm 0,03$ нмоль/л), максимальная в осенний период ($1,1 \pm 0,03$ нмоль/л). В летний период концентрация кадмия в сыворотке крови высокопродуктивных коров достоверно выше минимальных значений весной на 13%, ниже максимальных осенних значений на 16%. В зимний период концентрация кадмия в сыворотке крови высокопродуктивных коров выше минимальных значений весной на 10%, ниже максимальных осенних значений на 18 %. Следует отметить, что полученные результаты не превышали предельно допустимых концентраций (ПДК). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в разные сезоны года потребности организма в минеральных элементах меняются, что необходимо учитывать при создании рационов для разных групп животных. Так зимний период, характеризующийся гиподинамией, нарушением параметров микроклимата и алиментарным стрессом, является у высокопродуктивных коров наиболее стрессогенным, что подтверждается изменением клинико-физиологических показателей и сопровождается глубокими метаболическими нарушениями, характеризующимися, в том числе, и развитием нарушения минерального обмена, проявляющегося развитием остеодистрофии, микроэлементозов, накоплением тяжелых металлов.

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ИНКУБАЦИИ НА КОНФОРМАЦИОННОЕ СОСТОЯНИЕ ГЕМОПОРФИРИНА ГЕМОГЛОБИНА ЭРИТРОЦИТОВ

М.И. Мартынова, Н.В. Громова, В.В. Ревин, К.В. Просникова, Н.А. Мельникова, Э.С. Ревина, А.И. Сейкина

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, Саранск, Россия

Кислородтранспортная функция является основной для эритроцитов человека. Определяется она в первую очередь конформацией гемоглобина, которая может изменяться под влиянием различных факторов. Одним из таких факторов является температура, определяющая скорость биохимических процессов и, тем самым, регулируя стабильность биологических структур и процессов, протекающих на молекулярном уровне. Целью нашей работы явилось изучение влияния различных температур инкубационной среды на конформацию гемопорфирина гемоглобина эритроцитов человека. Изменение конформации гемопорфирина гемоглобина исследовали методом спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) на рамановском спектрометре *in via Basis* с короткофокусным высокосветосильным монохроматором (фокусное расстояние не более 250 мм). Для анализа конформации гемопорфирина гемоглобина (Гб) использовали характерные полосы спектров КР (указаны положения максимумов): 1172, 1355, 1375, 1548, 1550, 1580, 1618, 1668 см^{-1} . Как показали исследования, при 30°C инкубации эритроцитов в течение 5 мин наблюдается увеличение сродства гемоглобина к кислороду и относительной способности гемоглобина связывать лиганды по сравнению с контролем. Также наблюдается снижение колебаний пиррольных колец. При этом относительное количество оксигемоглобина и способность сбрасывать лиганды остается в пределах контрольных значений. Однако с увеличением времени инкубации до 20 мин наблюдается только снижение колебаний пиррольных колец, остальные показатели остаются в пределах контрольных значений. При 40°C инкубации эритроцитов в течение 5 мин наблюдается снижение относительной способности гемоглобина связывать лиганды, и сродства гемоглобина к кислороду. При этом относительное количество оксигемоглобина, относительная способность сбрасывать лиганды и выраженность симметричных и асимметричных колебаний пиррольных колец практически не изменяются. При инкубации в течение 20 мин наблюдается увеличение способности гемоглобина выделять лиганды, другие показатели остаются в пределах контроля. Изучение влияния различных факторов, в том числе и температуры инкубации, на процесс связывания кислорода гемоглобином является очень важным с точки зрения понимания механизма кислородтранспортной функции эритроцитов.

ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА НА МИТОХОНДРИИ КАРДИОМИОЦИТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

И.В. Федотов, В.А. Самохвалов, Е.В. Бобылева, В.Б. Бородулин

Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского МЗ России, Саратов, Россия

Известно, что хроническая эндотоксемия приводит к существенному ухудшению сердечных функций. Бактериальный липополисахарид (ЛПС) – широко распространенный токсин, вызывающий хронические заболевания воспалительной природы.

ды. При этом основную роль в развитии хронических заболеваний играет нарушение митохондриальной активности пораженных клеток. Особенно чувствительными к повреждающему действию ЛПС являются митохондрии терминально дифференцированных клеток, в частности кардиомиоцитов. В этой связи, хроническое воздействие низких концентраций ЛПС на кардиомиоциты играет существенную роль в патогенезе и развитии сердечно-сосудистых заболеваний. В данной работе мы исследовали изменение биогенеза и основных функций митохондрий сердца у мышей в условиях 4-недельной экспериментальной эндотоксемии. Хроническая эндотоксемия воспроизводилась путем имплантации осмотических помп, заполненных ЛПС экспериментальным мышам в течение 4 недель. Митохондриальный биогенез определялся по транскрипционной активности белка NRF1/2 с использованием иммуноферментного анализа. Митохондриальное дыхание было определено в изолированных сердечных волокнах с использованием полярографа. Измерения проводились с использованием малата и глутамата как дыхательных субстратов. АДФ добавлялась для измерения дыхательного контроля.

Транскрипционная активность NRF1/2 в миокарде была увеличена, что свидетельствует об усилении митобиогенеза. В то же время, анализ митохондриального дыхания показал резкое снижение дыхательного контроля за счет выраженного усиления поглощения кислорода без АДФ – стимуляции, что свидетельствует о разобщении дыхательной цепи митохондрий и их способности осуществлять биоэнергетические функции. Таким образом, хроническая эндотоксемия вызывает усиление митобиогенеза, вследствие которого, вероятно, образуются дефектные митохондрии, что может существенно изменять активность кардиомиоцитов и приводить к снижению ими синтеза АТФ. Данное исследование выявляет кардиотоксичность ЛПС через его способность вызывать неполноценный биогенез митохондрий, что, в свою очередь, может приводить к истощению функционального резерва сердца и развитию сердечной недостаточности.

БИОИНЖЕНЕРИЯ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ И ПРИЛОЖЕНИЯ

ИНЖЕНЕРИЯ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФУНКЦИОналиЗИРОВАННЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

А.Ю. Гулевич, А.Ю. Скороходова, В.Г. Дебабов

ГосНИИгенетика, Москва, Россия

Замена веществ, получаемых нефтехимическим синтезом, продуктами микробных биотехнологий является важной частью стратегий рационального природопользования и ресурсосбережения промышленно развитых стран. Среди промышленно значимых продуктов микробиологического синтеза особая роль отводится веществам, потенциально способным служить в качестве “строительных блоков” в последующем химическом синтезе целого спектра веществ с высокой добавленной стоимостью, включая растворители и полимеры для использования в лакокрасочной, текстильной, автомобильной, фармакологической и других отраслях промышленности. Повышенное внимание в данной связи привлекают функционализированные органические кислоты, т. е. соединения, содержащие, помимо карбоксильной, другие функциональные группы. Так, янтарная, яблочная, фумаровая и 4-гидроксимасляная кислоты могут быть использованы в качестве замены малеинового и фталевого ангидридов в крупнотоннажном синтезе растворителей, полимеров и пластификаторов, включая 1,4-бутандиол, гамма-бутиролактон, тетрагидрофуран, полибутиленсукцинат и др. 3-гидроксипропионовая кислота, как полупродукт в синтезе акриловой кислоты, обладает исключительным рыночным потенциалом для использования в лакокрасочной промышленности, а также при изготовлении сорбентов и флокулянтов для очистки воды. 4-аминомасляная кислота, помимо фармакологического, может найти применение в синтезе биоразлагаемых полимеров, в частности, бионейлона полибутиролактама.

В общем случае, данные вещества не являются секретируемыми метаболитами известных микроорганизмов. Таким образом, микробиологический синтез указанных соединений с использованием природных продуцентов затруднен или невозможен. При этом химический синтез этих продуктов весьма не экологичен, а также ресурсо- и энергозатратен. Вместе с тем, с биохимической точки зрения, все перечисленные соединения могут быть рассмотрены как продукты ограниченного числа реакций с участием ключевых интермедиатов центрального метаболизма множества микроорганизмов, а именно щавелевоуксусной кислоты и ацетил-КоА. Более того, в большинстве случаев соответствующие кислоты являются прямыми интермедиатами цикла трикарбонных кислот или же их относительно простыми производными.

В последние годы значительный прогресс в создании рекомбинантных продуцентов ряда функционализированных органических кислот, таких как янтарная, яблочная и 3-гидроксипропионовая, был достигнут в результате направленной метаболической инженерии традиционной для промышленной биотехнологии бактерии *Escherichia coli*. Вместе с тем, при внесении множественных модификаций, в особенности затрагивающих ферменты центральных биохимических путей, в результате выраженного перераспределения потоков углерода в клетках модифицированных штаммов, метаболизм организма зачастую претерпевает значительные и трудно предсказуемые изменения, серьезно осложняющие дальнейшее рациональное конструирование целевых продуцентов. Подобные изменения, связанные, в частности, с активацией латентных метаболических путей и проявлением побочных активностей известных и ранее охарактеризованных ферментов, обуславливают необходимость углубленного изучения особенностей метаболизма множественно модифицированных штаммов промышленно значимых микроорганизмов. *Работа поддержана грантом РНФ № 16-14-10389.*

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ДРОЖЖЕЙ – ПРОДУЦЕНТОВ МОЛОЧНОЙ И ЯНТАРНОЙ КИСЛОТ

Т.В. Юзбашев, С.П. Синецкий

Национальный биоресурсный центр – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, ГосНИИгенетика, Москва, Россия

Микробиологическое производство ценных химических соединений на основе растительной биомассы получило название «белой» биотехнологии. Существуют как экологические, так и экономические предпосылки замены нефтехимии на белую биотехнологию. Детальный анализ химической промышленности, использующей нефтепродукты в качестве исходного сырья, позволил определить список из 30 биопродуктов, являющихся потенциальными строительными блоками для синтеза

огромного разнообразия соединений, производимых этой отраслью. Центральное место в этом списке занимают молочная и янтарная кислоты. Молочная кислота является доступным химическим предшественником таких крупнотоннажных соединений как пропиленгликоль и акриловая кислота. Янтарная кислота может быть конвертирована в 1,4-бутандиол, пирролидон, тетрагидрофуран, 1,4-диаминобутан и γ -бутиролактон. Из них, в свою очередь, могут быть получены многие полимерные материалы, резины, смолы, пластификаторы, растворители, антифризы, детергенты, поверхностно-активные вещества и т. д. Обе органические кислоты позволяют синтезировать ценные биodeградируемые полимеры (полилактат и полибутилен-сукцинат), которые уже сейчас приходят на смену неподдающимся гниению полипропилену и полиэтилену. В природе, обе кислоты являются продуктами брожения, что подразумевает использование анаэробных условий культивирования. Вместе с тем, микробный синтез органических кислот экономически целесообразно вести при низких значениях pH. Данный факт объясняет тенденцию по замещению в этой отрасли бактериальных штаммов-продуцентов дрожжевыми. Неизбежным следствием биосинтеза при низких значениях pH является повышенный расход метаболической энергии на поддержание градиентов между средой и клеткой, что, напротив, требует активного дыхания и аэробных условий культивирования. На данный момент существует ряд возможных решений возникшего противоречия в выборе между аэробным и анаэробным процессом. Большинство из них требуют экспериментального подтверждения и находятся в состоянии научных разработок. *Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки России (Уникальные идентификаторы проектов - RFMEFI62514X0005 и RFMEFI57914X0013).*

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ОБРАЗОВАНИЯ СЕРОВОДОРОДА У БАКТЕРИЙ

А.С. Миронов, Т.А. Серегина, М.О. Нагорных, Р.С. Шакулов

ГНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва, Россия

Ранее мы показали, что ферменты цистеинаминотрансфераза (CAT), и 3-меркаптопируватсульфотрансфераза (3MST), кодируемые генами *aspC* и *sseA*, соответственно, играют важную роль в генерации H_2S в клетках *E. coli* и выполняет защитную функцию от действия широкого спектра антибиотиков. В настоящей работе проведен структурно-функциональный анализ регуляторной области гена *sseA*. Выявлено наличие в регуляторной области гена *sseA* двух промоторов P1 и P2, разделенных спейсерным участком размером 86 пн и продемонстрирована их функциональная активность *in vivo* и *in vitro*. В результате проведенного делеционного анализа и сайт-направленного мутагенеза выявлен вклад промоторов P1 и P2 в экспрессию гена *sseA*. Установлена ведущая роль промотора P2 в транскрипции гена *sseA*. Выявлена функциональная значимость спейсерного участка между промоторами P1 и P2 в качестве потенциальной мишени для белка Fur. Выявлена взаимосвязь между уровнем генерации H_2S и регуляцией экспрессии генов метаболизма цистеина. Кроме того, показано, что H_2S увеличивает жизнеспособность бактерий *E. coli* в условиях окислительного стресса под действием перекиси водорода (H_2O_2) путем связывания свободного железа и ограничения реакции Фентона, приводящей к образованию агрессивного гидроксил-радикала.

ИСКУССТВЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ГЕНОВ НИТРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА РИЗОБИЙ

Ан.Х. Баймиев, Е.С. Иванова, Р.С. Гуменко, Ал.Х. Баймиев

Институт биохимии и генетики, Уфимский научный центр РАН, Уфа, Россия

Азотный запас биосферы в основном находится в химически инертной молекулярной форме. *nif*-гены, которые кодируют синтез и регуляцию нитрогеназы, комплекса ферментов, осуществляющий процесс фиксации атмосферного азота, имеются лишь у некоторых прокариот. Наиболее продуктивными азотфиксаторами являются бактерии группы ризобий в симбиозе с бобовыми растениями. К сожалению, данные микроорганизмы не способны к фиксации азота в свободноживущем состоянии, поскольку экспрессия генов нитрогеназного комплекса у этих бактерий включается только при симбиотическом взаимодействии с макросимбиотом. У ризобий, как и у несимбиотических азотфиксаторов, транскрипция структурных генов нитрогеназы активируется геном *nifA*. Нами были проведены исследования по возможности изменения статуса азотфиксации ризобий в свободноживущем их состоянии за счет искусственной регуляции гена *nifA*. Для этого были созданы генно-инженерные конструкции, содержащие ген *nifA* под управлениями различных промоторов, индуцируемых первичными и вторичными метаболитами растений. В первом случае был использован промотор PBAD, индуцируемый арабинозой, во втором случае – P_{trn}, индуцируемый метилбензойной кислотой. В качестве объекта были выбраны бактерии *Rhizobium leguminosarum* – симбионты гороха посевного. Были получены трансформированные созданными конструкциями штаммы данной бактерии. Исследования азотфиксирующей активности полученных штаммов показали, что привнесение в бактерии искусственно регулируемой копии гена *nifA* приводит к появлению способности к фиксации азота у испытываемых штаммов при выращивании их в культуральной среде на уровне свободноживущих азотфиксирующих бактерий. Кратковременное культивирование в бескислородной среде приводит к увеличению азотфиксирующей активности испытываемых штаммов в 2–3 раза. Таким образом, за счет привнесения в ризобий искусственно регулируемой копии гена *nifA* появляется возможность к изменению азотфиксирующего статуса этих бактерий. В настоящее время проводятся работы по сравнению эффективности азотфиксации рекомбинантных штаммов несущих ген *nifA* под управлением промоторов PBAD и P_{trn} с диким штаммом. *Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 26 16-34-00278/16 мол. а..*

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ЭКОСИСТЕМ

А.В. Марданов, В.В. Кадников, А.В. Белецкий, О.В. Карначук, Н.В. Равин

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, ²Томский государственный университет, Томск, Россия

Анаэробные условия, повышенное давление и высокая температура характерны для глубоких подземных экологических ниш. В настоящее время данные о микроорганизмах обитающих в таких условиях весьма ограничены. В работе мы проанализировали микробные сообщества подземных термальных вод из заброшенных нефтепоисковых скважин. Были использованы два подхода для характеристики микробного сообщества: (1) идентификация микроорганизмов на основе амплификации и последующее пиросеквенирование фрагментов генов 16S рРНК и (2) секвенирование полной метагеномной ДНК микроб-

ного сообщества. Нефтепоисковая скважина ЗР была пробурена около пятидесяти лет назад, в Западной Сибири предположительно в горных породах мезозойского периода. Термальная вода (температура 46–51°C) выходит с глубины 2800 метров. Таксономический анализ на основе фрагментов генов 16S рРНК показал преобладание Firmicutes, представленных сульфат-редукторами родов *Desulfovibrio* (47% 16S-последовательностей) и *Desulfotomaculum* (1,3%), а также микроорганизмов, близких к *Thermacetogenium* (17%). Среди последовательностей имеющих гомологию с археями большая часть относилась к метаногенным археям рода *Methanothermobacter* (24%). Расшифровка метагеномной ДНК позволил идентифицировать гены, их функциональную и таксономическую принадлежность. Проведенный анализ показал, что для микробного сообщества скважины ЗР характерен хемолитотрофный тип метаболизма на основе окисления водорода и низкомолекулярных органических соединений в процессе сульфатредукции. Состав микробного сообщества второй скважины, расположенной вблизи поселка Белый Яр (температура воды 40–45°C, в 2,6 км глубиной источник), значительно отличался от скважины ЗР. Он был более разнообразным, включал представителей Firmicutes, Deltaproteobacteria, Chloroflexi и Nitrospira, а также несколько некультивируемых бактериальных родов. Археи не обнаружены. Следует отметить, что около 33% 16S рРНК не были классифицированы даже на уровне филы; представляя новые бактериальные клоны. В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что составы микробных сообществ подземных вод значительно отличаются по составу и разнообразию микроорганизмов в зависимости от окружающих условий в подземных водных горизонтах.

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ВЕЧНОМЕРЗЛЫХ ОТЛОЖЕНИЙ АРКТИКИ – ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ПАЛЕОРЕКОНСТРУКЦИЙ

Е.М. Ривкина¹, Л.Е. Петровская², Т.А. Вишневская¹

¹Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Ранее было обнаружено, что эпикриогенные отложения озерного и морского происхождения, содержат биогенные метан, в то время как в синкриогенном позднеплейстоценовом ледовом комплексе на территории Колымо-Индигирской низменности метан либо отсутствовал, либо присутствовал в следовых концентрациях. Из озерных и морских отложений были выделены метаногенные археи, в то же время синкриогенные породы ледового комплекса не продуцировали метан и отсюда не удалось выделить метанобразующие микроорганизмы. Для того что бы выяснить, почему в ледовом комплексе нет метана и оценить потенциальный вклад этих отложений в процесс метанообразования при деградации мерзлоты мы сравнили метагеномы двух «контрастных» образцов, представляющих собой соответственно ледовый комплекс (IC8) и озерные отложения (IC4), радиоуглеродный возраст которых весьма близок, ~ 30000 лет. Анализ метагенома IC4 в отличие от IC8, продемонстрировал возможность протекания многих физико-химических реакций: денитрификации, восстановления железа, сульфатредукции, которые способствовали понижению редокс потенциала и возникновению восстановительных условий, благоприятных для развития метаногенных архей и метанообразования. В образце IC8, представляющем ледовый комплекс, условия оказались менее благоприятными для таких процессов. Отложения, представителем которых является образец IC8, формировались в менее восстановительных условиях, которые не способствовали метанообразованию. Полученные результаты демонстрируют, что метагеномный анализ микробных сообществ вечной мерзлоты может представлять собой новый инструмент для палеорекопекструкций и может быть использован для понимания того, как микроорганизмы тех или иных мерзлых отложений будут реагировать на потепление климата. Работа поддержана грантом РФФИ 14-14-01115.

МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ЭКОСИСТЕМ; МЕТАГЕНОМНЫЙ ПОДХОД

С.Е. Пельтек¹, А.В. Брянская¹, Ю.Е. Уварова¹, А.С. Розанов¹, Т.В. Иванисенко¹, Т.К. Малуп¹, В.А. Иванисенко¹, Е.В. Лазарева², О.В. Сайк¹, С.М. Жмодик², О.П. Таран³, Н.М. Слынько¹, С.В. Шеховцов¹, В.Н. Пармон³, Н.Л. Добрецов², Н.А. Колчанов¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН; ²Институт геологии и минералогии им. В.С. Соболева СО РАН; ³Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, Новосибирск, Россия

На территории России находится множество природных объектов, микробиологическая изученность которых по-прежнему является недостаточной. В данной работе исследованиями были охвачены микробные сообщества малоизученных в микробиологическом отношении экосистем: соленых озер Новосибирской области и Алтайского края, гидротерм Северного Прибайкалья и Камчатки. Всего методами метагеномного анализа изучен состав более чем 50 озер и термальных источников. Так, например, исследования, проведенные в кальдере Узон и Долине гейзеров (Камчатка) позволили описать состав и структуру широкого спектра микробных сообществ, установить закономерности в распределении микроорганизмов в зависимости от комплекса геохимических параметров. Подробное изучение нефтяной площадки кальдеры Узон, представляющей собой небольшой участок термального поля, характеризующийся проявлениями нефтяной пленки на поверхности растворов, позволило выявить более 300 тыс. последовательностей длиной не менее 250 пар нуклеотидов. Отдельных таксонов в исследуемых пробах выявлено более 1,4 тыс. Подробный анализ микробного состава исследуемых сообществ нефтяного поля показал, что в них присутствуют микроорганизмы, обладающие способностью метаболизировать углеводороды. Проведен корреляционный анализ по факторам среды и заполненности метаболических путей. Установлено, что в среднем, пути, имеющие отношение к биодegradации углеводородов имеют наибольшую положительную корреляцию с биоразнообразием исследуемых сообществ. Кальдера вулкана Узон может представлять собой природную лабораторию современного образования нефти из органического вещества осадков. И в условиях высоких температур, значительного колебания Eh-pH и высокого содержания сульфидов, мышьяка, сурьмы и ртути формируются сообщества микроорганизмов, адаптировавшиеся к жизни в присутствии углеводородов, и являющиеся потенциальными источниками уникальных генов и ферментов. Проведенные исследования позволяют в целом заключить, что в исследованных природных экосистемах формируются сообщества микроорганизмов, адаптировавшиеся к жизни в экстремальных условиях, являющиеся перспективными объектами как для фундаментальных, так и для прикладных исследований. Работа поддержана грантом Министерством образования и науки РФ (Соглашение № 14.616.21.0053 (RFMEFI61615X0053)).

ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНОВ У ТЕРМОФИЛЬНЫХ ПРОКАРИОТ: РАЗНООБРАЗИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ И ПРАКТИЧЕСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ

С.Н. Гаврилов¹, И.М. Елизаров¹, И.В. Кубланов¹, О.А. Подосокорская¹, Т.Г. Соколова¹, А.И. Слободкин¹, Т.В. Тихонова², А.В. Марданов³, С.А. Лопатин³, С.В. Тощак⁴, Е.А. Бонч-Осмоловская¹ ¹Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ²Институт биохимии им. А.Н. Баха, ³Институт биоинженерии – ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; ⁴Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

Внеклеточный перенос электронов (ВПЭ) является уникальным свойством прокариот, позволяющим получать энергию для роста за счёт восстановления нерастворимых неорганических соединений, таких как минералы Fe(III), Mn(IV), S(0), As(V). Из них, соединения Fe(III) являются наиболее распространёнными нерастворимыми акцепторами электронов в осадочных термальных экосистемах, где низкая растворимость кислорода и большая плотность минеральной фазы способствуют эволюции механизмов ВПЭ прокариот. В настоящее время изучение этих механизмов у мезофильных бактерий привело к описанию процессов направленной биотрансформации минералов переменновалентных элементов и открытию электрокаталитических свойств микроорганизмов. Последний феномен уже дал начало новой области биотехнологии – разработке биоэлектрохимических систем для получения электричества или высокоэнергетических продуктов. Однако широкое разнообразие процессов взаимодействия термофильных прокариот с минералами в природных и антропогенных термальных экосистемах остаётся мало изученным. Мы представляем обзор результатов наших исследований механизмов ВПЭ у нескольких филогенетически и физиологически различных термофилов. За последние несколько лет нами выявлено 2 ключевых механизма железоредукции у термофильных грамположительных бактерий – (1) с использованием клеточных выростов (пилей), образующих сеть, связывающую минеральные частицы с клетками, и (2) с использованием поверхностных мультигемовых цитохромов с-типа, имеющих низкое сходство с описанными ранее. Для представителей р. *Carboxydotherrmus* показана электрокаталитическая активность и возможное участие в ней одного из описанных цитохромов. Впервые выявлены гены цитохромов с, обуславливающие способность к ВПЭ у железовосстанавливающей археи. На примере гипертермофильной археи впервые показано использование полисахарида ксилана в качестве хелатора Fe(II) в процессе «железного дыхания». У граммотрицательной бактерии, представляющей новый филум *Ignavibacteriae*, выявлена ключевая роль нового периплазматического цитохрома с в восстановлении Fe(III). С учётом метаболического разнообразия исследуемых организмов, наши данные открывают возможности разработки новых технологий биоремедиации, биокатализа, получения энергии в процессах биодеградации.

ПЕРВАЯ КСИЛАНОЛИТИЧЕСКАЯ ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНАЯ АРХЕЯ *THERMOCOCCUS* SP. 2319X1: ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКИ, АНАЛИЗ МУЛЬТИДОМЕННОЙ МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛАЗЫ/КСИЛАЗЫ

И.В. Кубланов¹, К.С. Заюлина¹, С. Stracke², V. Kallnik², K. Jensen³, P. Menzel⁴, A. Slesarev⁵, C. Bräsen², X. Peng⁴, Е.А. Бонч-Осмоловская¹, B. Siebers² ¹ФИЦ «Биотехнологии» РАН, Москва, Россия; ²University of Duisburg-Essen, Германия; ³Novozymes A/S, Bagsværd, Дания; ⁴University of Copenhagen, Дания; ⁵Zylecta Corporation, Gaithersburg, США

Термостабильные гидролазы могут быть использованы в различных промышленных процессах, например, в целлюлозно-бумажной и пищевой промышленности (Unsworth et al., 2007), производстве биотоплива и т. д. Археи доминируют при температурах выше 80°C, однако среди известных к настоящему времени гипертермофильных архей на полисахаридах могут расти единицы. Для выделения гипертермофильных архей, способных расти на полисахаридах и продуцирующих термостабильные гликозидазы (GH) мы использовали подход, основанный на получении *in situ* накопительных культур (Kublanov et al., 2009), инкубируя пробирки с ксиланом непосредственно в горячем источнике, расположенном в прибрежной зоне о. Кунашир, Курильские острова. Полученная накопительная культура стала источником выделения двух штаммов гипертермофильных архей, растущих на ксилане при 85°C и pH 7.0. Один из них, *Thermococcus* sp. штамм 2319x1, помимо ксилана оказался способен расти на карбоксиметил целлюлозе (КМЦ), аморфной целлюлозе, ксиланогукане, альгинате, лихенане, крахмале, а также различных моно- и дисахаридах. Фракции поверхностных белков клеток штамма 2319x1, выращенного на полисахаридах, проявили эндоксиланазную и эндоглюканазную активности при 85–92°C. Геном данного микроорганизма был секвенирован и полностью собран. В ходе анализа генов, кодирующих GH, был выявлен один, кодирующий уникальный мультидоменный белок (1303 аминокислот, 143 КДа), который состоял из 3 каталитических и 2 связывающих доменов, расположенных следующим образом: GH5-GH12-GH12-CBM2-CBM2. Филогенетический анализ каждого каталитического домена выявил их различное происхождение и одинаковую наиболее вероятную функцию – эндоглюканазную. Весь ген, а также его неполные копии были клонированы и экспрессированы в *E. coli*, и получившиеся рекомбинантные белки охарактеризованы. Все варианты оказались высоко активны по отношению к КМЦ, β-глюкану и лихенану и в меньшей степени по отношению к другим поли- и олигосахаридам (Gavrilov et al., 2016), при этом спектр гидролизимых субстратов оказался довольно широким и включал не только глюкозиды, но и ксилозиды и маннозиды.

1. Gavrilov et al. *Frontiers Microbiol.* 2016, 7:552.
2. Kublanov et al., *AEM* 2009, 75:286-291.
3. Unsworth et al., *FEBS J.* 2007, 274:4044-4056.

ВНУТРИ- И МЕЖВИДОВАЯ КОНКУРЕНЦИЯ СРЕДИ СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ *VIRIDANS*: ЧТО НАПИСАНО В ГЕНОМАХ?

Л.Н. Икрянникова¹, М.В. Малахова¹, Г.Г. Ломинадзе², И.Ю. Карпова¹, Е.С. Кострюкова¹, Н.А. Маянский², А.Н. Круглов³, Е.А. Климова⁴, Е.Н. Ильина¹, В.М. Говорун¹

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА; ²Научный центр здоровья детей МЗ РФ; ³ООО «НАКФФ»; ⁴Московский государственный медицинский стоматологический университет им. А.И. Евдокимова МЗ РФ, Москва, Россия

Одним из инструментов успешной колонизации и высокой конкурентоспособности микроорганизма в своей экологической нише является секреция бактериоцинов – небольших по размеру пептидов, которые, взаимодействуя с клеткой-«конкурентом», провоцируют ее гибель. В последнее время бактериоцины часто рассматривают как возможную альтернативу существующим антибактериальным препаратам. В настоящей работе исследована бактериоциногенная активность штаммов стрептококков подгруппы *mitis* группы *viridans* (*S. pneumoniae*, *S. pseudopneumoniae* и *S. mitis*) – частых колонизаторов

носоглотки человека. Оценка бактериоциногенной активности, как взаимной, так и в отношении представителей других родов, традиционными культуральными методами сопровождалась *in silico* скринингом и исследованием геномных локусов, содержащих бактериоцин-кодирующие гены. Показано, что пневмококки, как и их близкие родственники, демонстрируют значительный потенциал для проявления бактериоциногенных свойств. Помимо хорошо известного *blp*-оперона, в геномах штаммов стрептококков обнаружены и другие генные кластеры, включающие как собственно бактериоцин-кодирующие гены, так и возможный аппарат их процессинга и секреции: гены, кодирующие регуляторные, модификаторные и транспортные протеины, а также белки иммунитета к собственным бактериоцинам. Лизис клеток-мишеней штаммом, продуцирующим бактериоцины, не только помогает конкурировать за ресурсы, но также создает условия для инкорпорации генетического материала лизируемой клетки, обеспечивая большую пластичность генома и улучшая тем самым адаптивные свойства микроорганизма. Дополнительный вклад в обмен генетическим материалом между штаммами стрептококков вносят процессы, контролируемые *com*-регулоном, в число которых входит развитие состояния компетентности и последующая продукция эффекторов аллолизиса (фратрицида), имеющие целью лизис некомпетентных клеток. Есть предположение, что *blp*- и *com*-регуляторные пути могут быть взаимосвязаны, что может обеспечить штамму-продуценту еще большее селективное преимущество за счет расширения списка потенциальных «доноров» ДНК. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант №15-15-00158).

ГЕНОМИКА БИФИДОБАКТЕРИЙ, УНИКАЛЬНЫЕ ГЕНЫ И ГЕНЫ КОММУНИКАЦИИ

Н.В. Захаревич, А.С. Ковтун, О.В. Аверина, В.З. Незаметдинова, В.Н. Даниленко

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва; Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

В последнее время всё больше внимания уделяется исследованиям оси микробиота-кишечник-мозг. Бифидобактерии представляют собой важную составляющую микробиоты кишечника человека, и взаимодействуют с центральной нервной системой (ЦНС) при помощи нервных, нейроэндокринных, нейроиммунных и гуморальных механизмов. Проведено секвенирование трёх бифидобактериальных штаммов: *Bifidobacterium longum subsp. longum* GT15 (CP006741), *Bifidobacterium angulatum* 102 (CP014241) и *Bifidobacterium adolescentis* 150 (LBHQ00000000) (Zakharevich et al., 2015). Штаммы 102 и 150 продемонстрировали способность синтезировать и секретировать гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК), которая является важным тормозным нейромедиатором ЦНС млекопитающих (Dyachkova et al., 2015). Различные геномные и биоинформатические подходы, позволили нам изучить свойства штаммов, обуславливающие их взаимодействие и общение с клетками хозяина. Были проанализированы различные гены, принимающие участие в процессах адаптации и коммуникации, в том числе гены, кодирующие белки, участвующие в метаболизме нейромедиаторов, а также гены – кандидаты в нейроактивные соединения. Во всех исследуемых штаммах бифидобактерий был идентифицирован ген моноаминоксидазы, важного фермента, участвующего в метаболизме серотонина и дофамина. Гены, кодирующие гистидиновые киназы и серин-треониновые протеинкиназы (СТПК), в качестве потенциальных датчиков нейроактивных соединений, секретируемых клетками-хозяина, также были изучены. Геномы бифидобактерий имеют в своём составе от 5 до 6 генов СТПК, и порядка 10 генов двухкомпонентных систем (Nezametdinova et al., 2014). Были обнаружены уникальные гены, присутствующие в исследуемых штаммах, но отсутствующие в геномах штаммов того же вида, или даже рода. Так, например, геном штамма GT15 содержит 35 уникальных генов, часть из которых, расположена рядом друг с другом, образуя кластеры. В исследуемом геноме было обнаружено 7 таких кластеров, некоторые из них окружены мобильными генетическими элементами, и имеют ГЦ состав, отличный от геномного, что может свидетельствовать об их приобретении за счёт горизонтального переноса. Результаты исследования способствуют пониманию механизмов адаптации и коммуникации, обеспечивающих взаимосвязь между бифидобактериальными клетками и организмом хозяина.

ИЗУЧЕНИЕ ОТВЕТА БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА НЕТЕРМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ТЕРАГЕРЦОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

С.Е. Пельтек¹, И.А. Мещерякова¹, Е.В. Демидова¹, Т.Н. Горячковская¹, А.И. Семенов², Е.А. Демидов¹, В.М. Попик², Г.Н. Кулипанов², Н.А. Колчанов¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН; ²Институт ядерной физики им. А.Н. Будкера СО РАН, Новосибирск, Россия

Изучение влияния терагерцового излучения на живые объекты имеет большое значение в связи со все более широким применением терагерцового излучения в практике. Объектом являлись рекомбинантные бактериальные штаммы *E. coli* или геносенсоры, содержащие плазмиды на основе тестируемого стресс-реактивного промотора и гена репортерного белка *gfp*. Облучение осуществляли на специально оборудованной биологической станции терагерцового лазера на свободных электронах Сибирского центра синхротронного и терагерцового излучения, позволяющей контролировать температуру и регулировать точную дозу облучения. При помощи геносенсоров на основе промоторов генов *katG*, *copA* и *emrR* показано, что в ответе на однократное нетермическое воздействие терагерцового излучения задействованы системы окислительного стресса и гомеостаза ионов меди, а система детоксикации противомикробных агентов не задействована. Впервые показано, что жидкие культуры геносенсоров *E. coli/pKatG-GFP*, *E. coli/pCopA-GFP* и *E. coli/pGlnA-GFP*, помещенные в облученную минимальную среду М9, демонстрируют ту же динамику синтеза репортерного белка GFP, что и жидкие культуры геносенсоров, непосредственно облученные терагерцовым излучением. Изучение протеомного ответа клеток *E. coli* на воздействие терагерцового излучения позволило установить гены быстрого и медленного ответа на нетермическое воздействие терагерцового излучения. Изучение быстрого ответа позволило выявить ген *glnA*, реагирующий на облучение резким повышением экспрессии. Геносенсор *E. coli/glnA-gfp* индуцируется при воздействии терагерцового излучения и может быть использован в качестве его детектора. Сравнение профилей индукции генов *E. coli* при воздействии естественных индукторов (H_2O_2 , $CuSO_4$, салициловой к-ты) и облученной среды М9 позволило выделить гены, специфически меняющие экспрессию в ответ на облучение среды. Проведенный биоинформатический анализ генов, специфически реагирующих на нетермическое воздействие терагерцового излучения, выявил как отдельные гены (каталазы), так их системы (система поддержания гомеостаза переходных металлов). Построена общая модель нетермического воздействия терагерцового излучения на генетические системы контроля метаболизма *E. coli*. Работа поддержана грантом ФЦП (Соглашение № 14.616.21.0053 (RFMEFI61615X0053).

РАЗНЫЕ ТИПЫ РУБИСКО В ГОРЯЧЕМ ИСТОЧНИКЕ КАЛЬДЕРЫ УЗОН

Н.А. Черных, Е.Н. Фролов, И.В. Кубланов, Ф.И. Дубин, А.В. Марданов, А.В. Лебединский, Е.А. Бонч-Осмоловская

Лаборатория гипертермофильных микробных сообществ, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Работа посвящена исследованию разнообразия форм ключевого фермента автотрофной фиксации CO₂ цикла Кальвина (Рубиско) в термальном источнике Солнечный на основании анализа данных метагенома. Этот метагеном состоит из 193,319 контигов или 92,5 миллионов нуклеотидов (Menzel et al., 2015). Анализ показал, что в данном источнике представлены все формы Рубиско. Примерно 45% от всех Рубиско составляет форма III, характерная для архей и, в частности, для недавно описанной некультивируемой филои *Bathyarchaeota*. Как показывают литературные данные (Wrighton et al., 2015) форма III у архей участвует в карбоксилировании рибулезо-1,5-бисфосфата, происходящего из нуклеозидов, и считается, что эта форма Рубиско не участвует в цикле Кальвина. Однако нам удалось показать, что форма III в данном источнике встречается и у бактерий, например, представителей рода *Ammonifex*, *A. thiophilus*, где, скорее всего, принимает участие в фиксации CO₂ через цикл Кальвина (Berg et al., 2011). Второй по частоте встречаемости была участвующая в цикле Кальвина форма I (около 30%), представленная в данном источнике фирмикой *Brokia lithotrophica* (Perevalova et al., 2013) и, что оказалось сюрпризом, представителями филои *Thermus-Deinococcus*, в которой не известно автотрофов. Форма II/III (около 15%) была представлена как метаногенами, так и представителями некультивируемой филои *Peregrinibacteria*. Рубиско этой формы по своей функции ближе всего к форме III, т. е. скорее всего, не участвует в цикле Кальвина. Участвующая в цикле Кальвина форма II (около 10%) в основном была представлена организмами, близкими к *Acidithiobacillus*. Форма IV Рубиско представляет менее 1%. Эта форма не обладает способностью к карбоксилированию, а участвует в метаболизме метионина у ряда фирмик и протеобактерий. В работе представлены данные по филогенетическому анализу гена Рубиско. Обсуждается эволюционные отношения разных форм Рубиско.

1. Menzel P. et al. Microb Ecol. 2015, 70:411-24.
2. Hanson, T. E. & Tabita, F. R. 2001 Proc. Natl Acad. Sci. USA 98, 4397–4402.
3. Berg I.A. Appl Environ Microbiol. 2011, 77:1925-36
4. Perevalova A.A., Kublanov I.V., Baslerov R.V., Zhang G., Bonch-Osmolovskaya E.A., 2013.. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 63,2,479-483.
5. Miroshnichenko M.L., Tourova T.P., Kolganova T.V., Kostrikin N.A., Chernych N., Bonch-Osmolovskaya E.A., 2008. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 58, 12,2935-2938.

ТЕРМОФИЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ, ДИСПРОПОРЦИОНИРУЮЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ СЕРЫ, – НОВАЯ ГРУППА ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ ПРОКАРИОТ

А.И. Слободкин

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Микроорганизмы, диспропорционирующие серные соединения, такие как тиосульфат, сульфит и элементарная сера являются потенциально важным звеном в биогеохимическом цикле серы современной биосферы и вероятно играли активную роль в древних микробных сообществах. Неорганическое брожение серы позволяет клетке получать энергию для роста за счёт использования лишь одного простого соединения в качестве, как донора, так и акцептора электронов. Термодинамические расчёты показывают, что процессы диспропорционирования серных соединений энергетически более выгодны при повышенных температурах. Несмотря на обильное присутствие элементарной серы в современных гидротермальных системах, до наших исследований термофилы, способные диспропорционировать элементарную серу, были неизвестны. Нами из глубоководных и мелководных морских гидротерм и наземных горячих источников выделены в чистую культуру и охарактеризованы новые таксоны термофильных анаэробных бактерий. Все выделенные организмы являются хемолитоавтотрофами и способны получать энергию для роста за счёт диспропорционирования элементарной серы, тиосульфата или сульфита, образуя в результате сульфид и сульфат. Процесса диссимиляционного восстановления сульфата не выявлено. Новые изоляты представлены как экстремально, так и умеренно-термофильными микроорганизмами. Филогенетически, выделенные штаммы образуют новые роды в классах *Thermodesulfobacteria* и *Deltaproteobacteria*. Геномные данные показывают наличие метаболических путей восстановления соединений серы, азота, а также восстановительного ацетил-КоА пути фиксации CO₂. Способность к автотрофии и высокая скорость роста новых изолятов указывает на важную роль процесса микробного диспропорционирования серы в первичной продукции органического вещества в термальных местообитаниях. Биотехнологические аспекты микробного диспропорционирования соединений серы включают процессы десульфуризации резины, очистки отходящих газов и топлива.

БИОДЕГРАДАЦИЯ НЕФТИ И ГЕНЫ ДЕГРАДАЦИИ Н-АЛКАНОВ *alkB* И *ladA* У ТЕРМОФИЛЬНЫХ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ РОДОВ *GEOBACILLUS* И *AERIBACILLUS*

Т.П. Турова¹, Д.Ш. Соколова¹, Е.М. Семенова¹, А.В. Коршунова², Т.Н. Назина¹, А.Б. Полтараус²

¹Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Впервые на матрице ДНК термофильных бактерий рода *Geobacillus* с помощью ПЦР были амплифицированы несколько различающихся последовательностей, гомологичных генам *alkB* рубредоксин зависимой алкан-монооксигеназы, окисляющей н-алканы со средней длиной углеродной цепи. В ДНК отдельных штаммов геобацилл выявлено от 3 до 7 гомологов, среди которых только 2 являлись универсальными для всех штаммов. Анализ последовательностей генов-гомологов *alkB* геобацилл выявил их сходство с генами *alkB*, обнаруженными ранее у некоторых штаммов родококков, что свидетельствует о том, что *alkB*-гены могли попасть в геном геобацилл путем межвидового горизонтального переноса. Для определения функциональной роли генов-гомологов у штамма *G. subterraneus* К была исследована транскрипция этих генов (образование мРНК гомологов *alkB*) в экспоненциальную и стационарную фазы роста культуры при 60°C при использовании н-алканов с разной длиной цепи (н-С16 и н-С22). Показано, что независимо от использованных субстратов, в экспоненциальную и стационарную фазу транскрибировались разные гены-гомологи *alkB*. Выявлена способность к деградации н-алканов нефти у новых штаммов *G. toebii* В-1024, *Aeribacillus pallidus* 8m3 и *Geobacillus* sp. 1017, выделенных из нефтяных пластов. Штамм

В-1024 использовал наиболее широкий спектр н-алканов нефти, включая C10–C30 н-алканы, штамм 1017 использовал C10,11 и C13–C19,22 н-алканы, а штамм 8m3 деградировал C11–C29 н-алканы. При проведении ПЦР-амплификации у этих штаммов был выявлен универсальный для геобацилл ген-гомолог *alkB-geo1*. У новых штаммов были амплифицированы также гены, гомологичные гену *ladA*, детерминирующему флаavin-зависимую алкан-монооксигеназу. Последовательности этих генов были практически идентичны последовательностям генов *ladAa*, *ladAb* и *ladB*, впервые обнаруженным у штамма *G. thermoleovorans* B23, для которого была показана активность соответствующих ферментов при окислении длинноцепочечных н-алканов. Таким образом, впервые у ряда представителей родов *Aeribacillus* и *Geobacillus* было показано одновременное присутствие генов *alkB* и *ladAB*, кодирующих алкан-монооксигеназы, окисляющие н-алканы со средней длиной углеродной цепи и длинноцепочечные н-алканы, соответственно. *Исследование выполнено при поддержке РНФ (грант № 16-14-00028) и РФФИ (грант № 15-04-02622)*

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДВУХ ГЕНОМОВ *BACILLUS PUMILUS*

А.А. Тойменцева, Д.С. Баранова, Е.А. Булыгина, М.И. Маркелова, М.Р. Шарипова

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Штамм бактерий *Bacillus pumilus* 7P известен как продуцент рибонуклеазы и сериновых протеиназ. Ранее был получен производный штамм 3-19, устойчивый к стрептомицину, который приобрел способность к повышенному синтезу гидролитических ферментов. Целью работы явилось изучение и сравнение геномов двух штаммов *Bacillus pumilus*. Полногеномное секвенирование проводили на платформах Ion Torrent и GS Junior с 23-х (7P) и 30-и (3-19) кратным покрытием. С помощью геномного ассемблера Newbler 3.0 геномы штаммов 7P и 3-19 собраны в 9 и 8 скаффолдов длиной >500 п.н. и загружены в базу данных NCBI под номерами JOJX00000000.2 и JHUD00000000.2, соответственно. Аннотацию геномов проводили с использованием программ NCBI PGAAP и Prokka 1.11. Для подтверждения филогенетической принадлежности штаммов 7P и 3-19 рассчитывали значение средней нуклеотидной идентичности (ANI) между анализируемыми геномами и 9 закольцованными геномами других штаммов *B. pumilus*. Геном штамма *B. pumilus* SH-B9 выбрали в качестве референсного (значение ANI 95.17%) для картирования и поиска SNP в геномах штаммов 7P и 3-19. Идентифицировали 3828 несинонимичных SNP для штамма 7P и 862 – для 3-19. Из них 20 SNP в геноме штамма 3-19 приводили к радикальной замене аминокислот и отсутствовали в геноме штамма 7P. Среди них обнаружили потенциальную причину устойчивости штамма 3-19 к стрептомицину – мутацию в 56 кодоне гена *grsL* (кодирующего белок S12 30S рибосомы). Деградом (полный спектр протеолитических ферментов) штаммов 7P и 3-19 определяли в программе MEROPS. В исследуемых геномах мы идентифицировали по 143 генов протеиназ, среди которых 12 генов кодируют внеклеточные ферменты. Потенциал двух геномов, в отношении продукции антибиотиков и вторичных метаболитов определяли, используя сервер antiSMASH 3. В геномах штаммов 7P и 3-19 идентифицировали 2 типа кластеров, кодирующих поликетиды (T1pks, T3pks), 3 кластера генов кодирующих терпеноид-подобные соединения, кластеры биосинтеза микроцина и бактериоцина, продукты которых обладают антибиотическими свойствами. Таким образом, выявили различия в геномах штаммов *B. pumilus*, которые могли привести к изменению свойств в связи с приобретением антибиотикоустойчивости. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №31 16-34-60198 мол_а_дк.*

СИНТЕЗ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ ПРИ НИЗКИХ ЗНАЧЕНИЯХ PH *YARROWIA LIPOLYTICA*

С.С. Мокрова, П.Ю. Бондаренко, С.П. Синецкий

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва, Россия

Производство янтарной кислоты – одно из приоритетных направлений современной биотехнологии, которое является разумной альтернативой нефтехимическому. Применение бактериальных культур имеет существенный недостаток, т. к. накопление кислоты требует добавления больших объемов дорогостоящих нейтрализующих агентов в ходе культивирования. Дрожжи являются наиболее подходящими кандидатами для этих целей, так как в отличие от бактерий обладают способностью адаптироваться к низким значениям pH среды. Исключение из процесса культивирования нейтрализующего агента позволяет более чем на треть снизить себестоимость янтарной кислоты и, соответственно, увеличить конкурентоспособность биотехнологического продукта. Ранее нами был сконструирован штамм *Yarrowia lipolytica*, лишенный активности сукцинатдегидрогеназы, который накапливает до 17,5 г/л янтарной кислоты в условиях без подпитровки щелочью при росте на богатой среде с глицерином. В данной работе был получен производный мутант Y-3460, накапливающий 40,5 г/л за 36 ч с выходом 0,32 г/г глицерина. Тем не менее, штамм Y-3460, как и предшественники, оказался не эффективен при использовании глюкозы в качестве единственного источника углерода. В связи с этим был применен подход метаболической эволюции в сочетании с классическими методами индуцированного мутагенеза. Полученный штамм ВКПМ Y-4215 эффективно утилизирует глюкозу, не требует использования нейтрализующих агентов и накапливает 50,2 г/л янтарной кислоты за 54 ч с выходом 0,43 г/г. Анализ метаболических потоков с применением [1,6–13C2]глюкозы показал, что не менее 35% глюкозы утилизируется через пентозофосфатный путь, в то время как ≥84% янтарной кислоты образуется из окислительной ветви цикла трикарбоновых кислот. *Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта - RFMEFI62514X0005).*

ОБРАТИМОЕ ПОДАВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ РЕПАРАЦИИ НЕСПАРЕННЫХ ОСНОВАНИЙ КАК ИНСТРУМЕНТ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА *ESCHERICHIA COLI*

Д.М. Бубнов, Т.В. Юзбашев, С.П. Синецкий

Национальный биоресурсный центр – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, ГосНИИГенетика, Москва, Россия

Наиболее эффективным инструментом редактирования геномной последовательности ДНК *Escherichia coli* является гомологичная рекомбинация, контролируемая Red генами бактериофага λ – *gam*, *bet*, *exo*. Продукты генов *gam* и *bet* способны осуществлять рекомбинацию между хромосомальной ДНК и одонитевыми синтетическими олигонуклеотидами длиной от 25 оснований, несущими мутацию (замену, делецию или инсерцию одного или нескольких нуклеотидов). При этом количество рекомбинантных клеток может достигать от 1 до 25% среди трансформантов, что дает возможность отбирать мутант-

ные клоны без прямой селекции путем ПЦР-скрининга. Высокая частота рекомбинации позволяет модифицировать одновременно несколько мишеней на хромосоме и затем анализировать эффект различных сочетаний мутаций. Успешное использование такого подхода было продемонстрировано при конструировании штамма-продуцента ликопина. Основное препятствие для широкого использования данного метода – активность клеточного механизма репарации, контролируемого генами *mutHLS*. При этом различные мутации подвержены репарации в разной степени. Поэтому не удастся добиться высокой частоты при получении любых типов мутаций без специальных подходов. К ним, в первую очередь, относится делеция гена *mutS*. Однако это приводит не только к получению высокой частоты для любого типа замен, но и к генетической нестабильности штамма из-за увеличения скорости накопления спонтанных мутаций в 500–1000 раз. Другие способы либо не универсальны, либо недостаточно эффективны. В ходе нашей работы были рассмотрены возможные решения этой проблемы. Наиболее эффективным оказалось использование доминантного негативного аллеля гена *mutS* из *Salmonella typhimurium* LT2, содержащего аминокислотную замену K622A. Нами была сконструирована хелперная плазмида, содержащая гены *gam*, *bet*, *exo* и *mutSK622A* в составе одного оперона под контролем регулируемого промотора. В отсутствие индукции штамм, несущий плазмиду, характеризуется нормальной интенсивностью спонтанного мутагенеза, в то время как индукция оперона приводит полной, но обратимой инактивации *MutS* совместно с экспрессией *Red* генов. На модельной системе нами было показано, что штамм дикого типа, несущий полученную хелперную плазмиду, сравним по частоте рекомбинации со штаммом, в котором по гену *mutS* была получена делеция.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ И СИНТЕТИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ ВСЕРОССИЙСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ ПРОМЫШЛЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ (ВКПМ)

Д.С. Спасская, И.Т. Гвилава, Т.В. Юзбашев, С.П. Синеокий Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва, Москва, Россия

Синтетическая биология – новое направление экспериментальной биологии, обобщающее достижения генетической инженерии и биохимии. Основной задачей синтетической биологии является создание организмов с заданными свойствами, чему способствует постоянно расширяющийся арсенал молекулярных инструментов для манипуляций с геномом, регуляции экспрессии генов и клеточного метаболизма. Для того чтобы обеспечить исследователям быстрый доступ к генетическому инструментарию, создаются репозитории, осуществляющие его депонирование, хранение и выдачу. Национальный биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (БПЦ ВКПМ) предоставляет платформу для сбора, хранения и обмена инструментами для синтетической биологии. В ВКПМ представлен широкий набор средств для конструирования генетически модифицированных микроорганизмов – бактерий, дрожжей и грибов. Это современные инструменты для модификации генома (*LambdaRed*, *Cre-lox*, *CRISPR-Cas*), транспозонные векторы (*miniMu* и *PiggyBac*), бактериофаги для генетической модификации бактерий путем неспецифической трансдукции (*P1* и *T4*). Также в коллекции представлен набор базовых векторов для клонирования с различными типами репликационных систем для наработки рекомбинантных белков. Раздел штаммов для генетической инженерии включает в себя штаммы-реципиенты для сборки рекомбинантных молекул ДНК, для продукции белка, модельные объекты, такие как *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus nidulans*. Цель ВКПМ – обеспечение коллективов российских исследователей доступом к современным технологиям генетической инженерии, а также создание информационно-методического и образовательного ресурса. ВКПМ приглашает к сотрудничеству лаборатории, работающие в области молекулярной биологии, генной инженерии и биотехнологии, для депонирования и запроса плазмид и штаммов, а также для обмена методиками по их использованию.

НОВЫЕ ТЕРМОФИЛЬНЫЕ АРХЕИ ИЗ ГОРЯЧИХ ИСТОЧНИКОВ КАМЧАТКИ

А. Перевалова, Т. Кочеткова, Е. Таранов, А. Дубин, О. Подосокорская, А. Лебединский, А. Меркель, Е. Бонч-Осмоловская Институт им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Археи представляют собой так называемый Третий Домен жизни и являются важным компонентом микробиоты, в особенно значительных количествах они встречаются в экстремальных местообитаниях. Работы с применением методов молекулярной экологии выявили широкое распространение архей как в высокотемпературных гидротермах, так и в низкотемпературных местообитаниях (Hug и др., 2016). Однако, большинство архей детектируемых молекулярными методами, не поддаются культивированию. Недавний прогресс в геномных технологиях секвенирования и современные методы микробной экологии позволили предсказывать метаболизм микроорганизмов так называемых “некультивируемых” архейных линий (Evans и др., 2015; Lazar и др., 2016). Было проанализировано двадцать горячих источников Камчатки с различными температурами и pH с помощью методов высокопроизводительного секвенирования. В результате было детектировано большое количество новых групп некультивируемых архей, среди них метаногены порядка *Methanomassiliicoccales*, некультивируемые *Thermoplasmatales* и новая линия архей *Bathyarchaeota*. В некоторых изученных горячих источниках количество представителей двух последних групп было достаточно высоким. Для того чтобы получить информацию о метаболических свойствах новых некультивируемых архей, была сделана попытка получить их в лабораторных культурах. Для мониторинга накопительных культур использовали ПЦР со специфическими праймерами на 16S рРНК гены, и на гены ключевых ферментов. Нам удалось получить несколько устойчивых накопительных культур *Methanomassiliicoccales* и *Bathyarchaeota*, растущих при температурах 55–60°C. Эти результаты помогут пролить свет на метаболизм новых термофильных архей, понять экологическую роль и значимость этих микроорганизмов в природных местообитаниях, а также выявить их метаболический потенциал и возможности применения в биотехнологии. Работа была выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ №14-24-00165.

1. Hug, L.A., B.J. Baker et al., and J.F. Banfield. 2016. *Nature Microbiology Letters* 16048 | DOI: 10.1038/NMICROBIOL.2016.48.
2. Evans, P.N., D.H. Parks, et al., V.J. Orphan, S.D. Golding, and G.W. Tyson. 2015. *Science* 350:6259.
3. Lazar, C.Sara, B.J. Baker, et al., and A.P. Teske. 2016. *Environmental Microbiology* doi:10.1111/1462-2920.13142.

ПЕРВЫЕ ТЕРМОФИЛЬНЫЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ ФИЛУМА *PLANCTOMYCETES*

Г.Б. Слободкина, Е.А. Бонч-Осмоловская, А.И. Слободкин

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Планктомицеты представляют глубокую линию в домене Bacteria и включают в себя большую группу микроорганизмов с уникальными свойствами, не характерными для других бактерий: они размножаются почкованием, обладают внутренними цитоплазматическими мембранами, которые делят клетку на отсеки. Несмотря на то, что планктомицеты известны довольно давно, по сравнению с другими микроорганизмами, населяющими природные экосистемы, они еще очень слабо изучены. Валидно описаны и полно охарактеризованы менее трех десятков видов, и все они являются нейтрофилами и мезофилами. Нами были выделены и охарактеризованы первые термофильные представители филума *Planctomycetes*. Новые микроорганизмы были выделены из подземного и морского местообитаний. Штамм SBP2T был получен из образца трещинных вод, отобранных в действующей золотодобывающей шахте Беатрикс (ЮАР) на глубине 1375 м. Штамм SVX8T был выделен из мелководной морской гидротермы, расположенной на острове Вулкано (Италия). Оба изолята имели оптимум роста при температуре выше 50°C и значениях pH и солености, близких к соответствующим параметрам в их местообитаниях. Полученные организмы росли в анаэробных условиях с моно-, ди- и полисахаридами в качестве донора электронов и нитрата или серы в качестве акцептора. Штамм SBP2T восстанавливал нитрат в аммоний, штамм SVX8T – в нитрит. Кроме того, оба штамма могли расти микроаэробно или без внешнего акцептора электронов, за счет брожения. На основании филогенетического положения и фенотипических свойств, штаммы SBP2T и SVX8T описаны нами как представители новых видов и родов, *Thermogutta hypogea* gen. nov. sp. nov. и *Thermostilla marina* . gen. nov. sp. nov.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОФИЛЬНОГО БАКТЕРИОФАГА *AERIBACILLUS PALLIDUS* AP45, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ПОЧВЫ ДОЛИНЫ ГЕЙЗЕРОВ

Ю.Н. Козлова, О.В. Боковая, В.В. Морозова, И.В. Бабкин, А.Ю. Юнусова, Н.В. Тикунова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Интерес к микроорганизмам геотермальных систем, понятен как с научной, так и с практической стороны. Термофильные и термотолерантные микроорганизмы обладают высокой биохимической активностью и находят применение в биотехнологии, в пищевой промышленности, генной инженерии, медицине и сельском хозяйстве. При этом в отличие от бактериальных сообществ, бактериофаги многих экстремальных местообитаний до сих пор мало исследованы. Из почвенных образцов Долины гейзеров на Камчатке были выделены термофильный бактериофаг AP45 и его микроорганизм-хозяин *Aeribacillus pallidus*. По данным электронной микроскопии бактериофаг AP45 был отнесен к семейству *Siphoviridae*. Биологические свойства фага AP45: на газоне чувствительной культуры продуцирует бляшки размером 0,5–1 мм с ореолом. Фаг стабильно хранится при 55–65°C, сохраняет жизнеспособность при нагревании в течение 2 часов при температуре 95°C, чувствителен к хлороформу. Размер генома AP45 составил 51606 н.п. Анализ полученной последовательности выявил 73 предполагаемых ОРТ. Геном содержит ОРТ, кодирующие белки рекомбинации и регуляции ДНК метаболизма, белки лизиса бактериальной клетки, структурные белки, а также 41 ОРТ, кодирующих белки с неизвестными функциями. Наибольшее сходство (36%) среди геномных последовательностей бактериофагов было обнаружено с термофильным фагом D6E [GU568037] в кластере структурных белков. Большинство ОРТ неструктурных белков фага AP45 имеют сходство с ОРТ термофильных микроорганизмов, относящихся к семейству *Bacillaceae*. Способность к лизогенному пути развития была предположена благодаря наличию нескольких белков рекомбинации и подтверждена индукцией выхода профага из клеток культуры *Aeribacillus pallidus* КЭМТК 656. Таким образом, впервые были выделены и охарактеризованы термофильный бактериофаг AP45 и его хозяин *A. pallidus*. Бактериофаг AP45 способен как к литическому, так и к лизогенному путям развития. Для последовательностей, кодируемых неструктурными ОРТ фага, не обнаружено аналогичных последовательностей бактериофагов в существующих базах данных.

ГЕНОМ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ *Y. PESTIS* ИЗ СРЕДНЕВЕКОВОГО Г. БОЛГАРА (ТАТАРСТАН, РОССИЯ)

Р. И. Тухбатова^{1,2}, М. Спиру³, К. Бос³, А. Г. Ситдинов², Д. К. Нурғалиев¹, И. Р. Газимзянов², А. Хербиг³, Й. Краузе³

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; ²Институт археологии им. А.Х. Халикова АН РТ, Казань, Россия;

³Институт науки об истории человечества сообщества Макса Планка, Йена, Германия

Чума как заболевание имеет долгую историю сосуществования с людьми. Самые ранние подтвержденные случаи заболевания относятся еще к бронзовому веку. Наиболее крупной вспышкой инфекции принято считать «черную смерть» в середине XIV века, которая унесла жизни от 30 до 50% населения Европы за каких-то 5 лет. На сегодняшний день накоплено много доказательств того, что дочерние популяции «черной смерти» существовали в Европе в последующие 400 лет, вызывая новые вспышки заболевания. Кроме того, недавно было высказано предположение о том, что одна из этих дочерних популяций мигрировала в Юго-Восточную Азию и от этой популяции произошли штаммы чумы 19 века и многие другие современные штаммы. Геномные данные имеют большое значение для определения путей распространения патогена после «черной смерти», а также для определения потенциальных источников последующих эпидемий. В данном исследовании мы представляем реконструированный геном возбудителя чумы *Y. pestis*, полученный из захоронений XIV века на территории города Болгар (Татарстан, Россия). Филогенетический анализ показал, что этот геном относится к ветви 1, как и геномы чумы, полученные из захоронений средневекового Лондона в исследовании К. Бос в 2011 г., но имеет некоторые отличия. Кроме того, этот геном является важным связующим звеном между второй и третьей пандемиями чумы.

АНАЛИЗ ГЕНОМА *TSUKAMURELLA TYROSINOSOLVENS* PS2 – ДЕСТРУКТОРА АЛКАНОВ И ПРОДУЦЕНТА БИОПАВ

А.В. Лайков, В.А. Романова, М.Н. Синягина, С.Ю. Маланин, Т.В. Григорьева

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Бактерии, способные метаболизировать алканы, описаны среди представителей класса *Actinobacteria*. Ферментные системы этого процесса обнаружены, например, у некоторых штаммов видов *Rhodococcus ruber*, *R. opacus*, *R. erythropolis*. Однако, при анализе микробного населения химического шлама ПАО «Казаньоргсинтез» нами обнаружено, что до 50% пред-

ставителей культивируемого сообщества алкан-окисляющих бактерий составлял другой представитель актинобактерий – *Tsukamurella tyrosinosolvens* PS2. Результаты лабораторных исследований продемонстрировали способность выделенного штамма утилизировать гексадекан и продуцировать поверхностно-активные вещества. В литературе встречаются эпизодические упоминания присутствия данного вида в составе сообществ нефтезагрязненных объектов, но особенности метаболизма и регуляции клеточных процессов в присутствии углеводов для данного вида изучены недостаточно. Для поиска генетических детерминант, позволяющих метаболизировать различные источники углерода и энергии нами расшифрована нуклеотидная последовательность генома штамма *T. tyrosinosolvens* PS2. В геноме исследуемого штамма обнаружены гены системы первичной атаки алкановой цепи: алкан-1-монооксигеназа, рубредоксин и рубредоксин-редуктаза. Также обнаружены гены пути бета-окисления жирных кислот, алкоголь- и альдегид-дегидрогеназ, что дает возможность штамму осуществлять полное окисление алканов до ацетил-КоА. Помимо этого, найдены гены, расширяющие метаболические возможности штамма по отношению к производным алканов: алкансульфонат монооксигеназа и галоалкан дегалогеназы. Некоторые моносахариды могут быть метаболизированы по пентозофосфатному пути, а также по пути гликолиза. Обнаружены гены двух путей синтеза трегалозы, а также гены обуславливающие транспорт экзогенной трегалозы. Присутствие нескольких систем, обеспечивающих клетку трегалозой, вероятно, свидетельствуют о важной роли данного дисахарида в клеточных процессах. Исходя из наличия генов, кодирующих ферменты синтеза миколовых кислот, а также наличия генов миколитрансфераз мы предполагаем, что продуцируемые штаммом биоПАВ являются миколатами трегалозы. Полученные данные о метаболических системах, закодированных в геноме, дают мишени для дальнейшего воздействия с целью повышения активности исследуемого штамма.

ПРОФИЛИРОВАНИЕ МЕТАБОЛИТОВ *PHYSCOMITRELLA PATENS* ПРИ ПОРАЖЕНИИ ФИТОПАТОГЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Е.Д. Егорова, С.В. Виноградова Институт биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Исследования взаимодействий в модели растение-патоген необходимо для изучения молекулярных механизмов формирования иммунитета у растений, а также изучения происхождения паразитизма у фитопатогенных бактерий. *Physcomitrella patens* – низшее растение, представляющее собой эволюционное звено между зелеными водорослями и цветковыми растениями. Сообщения о взаимодействии на основе взаимной регуляции метаболических и транспортных систем *P. patens* и специализированных бактериальных патогенов отсутствуют. Гаметофоры *P. patens* культивировали на агаризованной питательной среде Кнопа и инокулировали суспензиями (OD 0,4) фитопатогенных бактерий *Xanthomonas arboricola*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas viridiflava*. Из гаметофоров на 2-ой, 5-ый, 10-ый, 17-ый и 30-ый дни после инокуляции выделяли и определяли метаболиты методами газовой хроматографии и масс-спектрометрии. Были обнаружены 75 метаболитов, относящиеся к различным группам: аминокислоты, сахара, фосфата, стериды и многоатомные спирты. В образцах гаметофоров, инокулированных бактериями, по сравнению с контролем было отмечено снижение накопления жирных кислот: арахионовая кислота, пальмитолеиновая и др., а также уменьшение содержания стеридов (стигмастерин и ситостерин), которые входят в состав клеточных мембран, локализируются во внутриклеточных органеллах и совместно с фосфолипидами стабилизируют мембраны и контролируют их проницаемость. Кроме того, было отмечено накопление соединений, участвующих в системном устойчивости растений, таких как токоферол, кампастерол и стигмастерол по сравнению с контролем. Таким образом, все исследованные бактерии индуцировали накопление соединений, участвующих в системном устойчивости растений и необходимых для размножения бактерий в растениях.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 13-04-40104 и Гранта Президента РФ МК-7138.2015.4.

МЕТАБОЛИЗМ САХАРОВ ДВУХ НОВЫХ ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНЫХ АРХЕЙ РОДОВ *THERMOCOCCUS* И *PYROBACULUM*

К.С. Заюлина¹, С.Н. Гаврилов¹, И.М. Елизаров¹, Д.А. Кожевникова¹, О.А. Подосокорская¹, С.В. Тошаков², Е.А. Бонч-Осмоловская¹, И.В. Кубланов¹

¹ФИЦ «Биотехнологии» РАН, Москва; ²Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

Большинство органотрофных гипертермофильных архей растут на различных пептидных субстратах, способных расти на сахарах известно намного меньше и особенно мало было выделено тех, которые могут разлагать полисахариды и расти на продуктах их гидролиза. Из пробы, отобранной из горячего источника острова Кунашир, на среде с ксиланом в качестве единственного источника углерода и ферригидритом в качестве акцептора, были выделены два штамма 2319x1 и 2319x2, которые позже на основании анализа последовательности генов 16S рРНК были отнесены к родам архей *Thermococcus* и *Pyrobaculum*. Геномы обоих микроорганизмов были секвенированы и аннотированы. Нами была проверена субстратная специфичность штамма *Thermococcus* 2319x1, в результате чего был выявлен широкий спектр используемых этим организмом сахаров, включая аморфную целлюлозу и ксилан. Это способность побудила нас провести тщательный поиск генов, кодирующих ферменты разложения сахаров, в ходе которого было выявлено 18 генов, кодирующих гликозидазы различных семейств. Из них только одна предположительно могла участвовать в разложении целлюлозы и ксилана. Это предположительно секретиремый белок, обладающий уникальной доменной организацией: GH5-GH12-GH12-CBM2-CBM2. Были получены гидролитические активности фракции поверхностных белков, смываемых с помощью Твин 80 штамма 2319x1 по отношению к ксилану, ксиланоглюкану, аморфной целлюлозе, карбоксиметилцеллюлозе и бета-глюкану [1]. Известные представители рода *Pyrobaculum* не обладают способностью утилизировать не только поли-, но и дисахариды. Помимо ксилана выделенный нами штамм *Pyrobaculum* 2319x2 рос на крахмале, целлобиозе, ксилане и мальтозе, таким образом, он является первым представителем рода, растущим на сахарах, в том числе и на полисахаридах. С помощью функциональной аннотации генома штамма 2319x2 были предложены пути разложения крахмала и ксилана. Также нами была показана амилолитическая и ксиланазная активность фракции поверхностных белков данного штамма.

1. Gavrillov et al, 2016. Isolation and Characterization of the First Xylanolytic Hyperthermophilic Euryarchaeon *Thermococcus* sp. Strain 2319x1 and Its Unusual Multidomain glycosidase. *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2016.00552

АНАЛИЗ ГЕНОМА ТЕРМОФИЛЬНОГО ПЛАНКТОМИЦЕТА *THERMOGUTTA TERRIFONTIS*

А.Г. Ельченинов¹, Р. Menzel², S.R. Gudbersdottir², A. Krogh², Е.А. Бонч-Осмоловская¹, И.В. Кубланов¹

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия; ²University of Copenhagen, Copenhagen, Дания

Бактерия *Thermogutta terrifontis* [1] была описана в 2015 году, став первым термофильным представителем филума Planctomycetes. Позже был секвенирован и полностью собран геном этого микроорганизма (размер генома составил примерно 4,8 млн п.н.). Как и большинство известных планктомицетов *T. terrifontis* растет на разнообразных сахарах – от монодо полисахаридов. Данная работа посвящена *in silico* исследованию ферментов, участвующих в разложении сахаров. В ходе анализа генома *T. terrifontis* мы обнаружили более 100 генов, кодирующих гликозидазы, и 13 генов, кодирующих полисахаридазы, что обуславливает возможность *T. terrifontis* использовать различные ди-, олиго- и полисахариды в качестве единственного источника углерода, разлагая их до моносахаридов. Нами были реконструированы реакции деструкции олиго- и полисахаридов, на которых был показан рост данного планктомицета [1]: трегалоза, сахароза, целлобиоза, крахмал, пектин, ксилан и ксантановая камедь. Образующиеся моносахариды в дальнейшем разлагаются в ходе реакций гликолиза (гексозы) и пентозофосфатного пути (пентозы). Нами были обнаружены все гены, кодирующие ферменты, участвующие в гликолизе. Образующийся в результате гликолиза пируват далее окисляется с помощью пируватдегидрогеназного комплекса до ацетил-КоА, который либо поступает в цикл трикарбоновых кислот, либо превращается в ацетат. Также в геноме *T. terrifontis* были найдены все гены, за исключением гена трансальдозы, ответственные за синтез белков, которые катализируют реакции пентозофосфатного цикла. В том случае если в среде нет акцептора, *T. terrifontis* может бродить, продуцируя ацетат, лактат и водород. Помимо этого данный микроорганизм обладает способностью к аэробному или анаэробному дыханию в присутствии внешнего акцептора электронов (кислорода или нитрата, соответственно). Последнее свойство также является необычным для известных планктомицетов и детерминруется нитратредуктазой Nar и нитритредуктазой Nrf, гены которых также были выявлены в геноме данного микроорганизма.

1. Slobodkina et al., 2015. *Thermogutta terrifontis* gen. nov., sp. nov. and *Thermogutta hypogea* sp. nov., thermophilic anaerobic representatives of the phylum Planctomycetes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 65, 3, 760-765.

ЭКСПРЕССИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОЙ ЭСТЕРАЗЫ С GCSAG МОТИВОМ, ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ МЕТАГЕНОМНОЙ БИБЛИОТЕКИ ОБРАЗЦОВ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ОСАДОЧНЫХ ПОРОД

К.А. Новотоцкая-Власова¹, Л.Е. Петровская², Е.М. Ривкина¹

¹Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Вечная мерзлота представляет собой уникальную экологическую нишу, содержащую значительное количество разнообразных микроорганизмов. Структурная и функциональная характеристика белков этих микроорганизмов представляет собой уникальную возможность для выявления механизмов их адаптации к экстремальным условиям и оценки пригодности использования обитателей мерзлоты в различных экологических и биотехнологических целях. В наших предыдущих работах мы получили и охарактеризовали несколько липолитических ферментов психротрофной бактерии *P. cryohalolentis* K5T, выделенной из вечной мерзлоты. Результаты наших исследований показали, что эти белки обладают уникальными свойствами, включая активность в широком диапазоне и повышенную стабильность. Абсолютное большинство почвенных микроорганизмов представляют собой некультивируемые в лабораторных условиях формы и непосредственное исследование их протеомов и геномов затруднено. Конструирование и скринирование метагеномной библиотеки, полученной из природных источников, позволяет существенно увеличить разнообразие исследуемых объектов. Задачей нашей работы было получение и скринирование на наличие генов, кодирующих липолитические ферменты, метагеномной ДНК-библиотеки из обогащенных микроросов многолетнемерзлых образцов. В результате скрининга библиотеки нами был обнаружен и клонирован ген, кодирующий новый липолитический фермент PMGL2, принадлежащий к HSL семейству липаз и содержащий новый вариант (GCSAG) ранее описанного GTSAG мотива. Рекомбинантный PMGL2 был получен, очищен и охарактеризован. Проведенные исследования показали, что PMGL2 относится к эстеразам. Фермент обладает максимальной активностью при 45°C и достаточно высокой активностью при более низких температурах. Белок обладал низкой стабильностью при температурах выше 45°C. Неионные детергенты и органические растворители снижали активность фермента. Таким образом нами был получен и исследован новый фермент PMGL2, имеющий необычный GCSAG мотив, обладающий высокой липолитической активностью. Результаты проведенных исследований позволяют утверждать, что вечная мерзлота является уникальным генетическим ресурсом, перспективным для получения различных ферментов. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 14-14-01115.

РЕКОМБИНАНТНЫЙ N-КОНЦЕВОЙ ДОМЕН ИМПОРТЕРА МЕДИ ЧЕЛОВЕКА ХЕЛАТИРУЕТ ИОНЫ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ К ИХ ТОКСИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ

Т.П. Санькова^{1,2}, Ю.А. Орлов^{1,2}, А.Н. Савельев¹, Л.В. Пучкова^{1,2}

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого; ²Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия

Медь является компонентом активных центров ряда жизненно важных ферментов и вторичным мессенджером. Биологическая незаменимость меди сочетается с ее высокой токсичностью. Ионы меди могут катализировать реакции, провоцирующие оксидативный стресс, вызывающий развитие сердечнососудистых, раковых и нейродегенеративных заболеваний. Для лечения этих заболеваний используют хелаторы меди, которые, к сожалению, обладают побочными эффектами. Белок СТЯ1 человека принадлежит семейству высоко аффинных импортеров меди и является универсальным транспортером меди из внеклеточной среды. Его внеклеточный домен (NdCTR1) содержит три металлсвязывающих сайта, способных координировать Cu(I), Cu(II), Ag(I), электронный двойник Cu(I), и Pt(II) в составе цисплатина, эффективного противоопухолевого препарата. В работе для оценки хелатирующих свойств NdCTR1 он был клонирован стандартными методами в клетках *E. coli* в составе белка, слитого с глутатион трансферазой (GST). Показано, что рекомбинантный белок прогрессивно накапливается в цитоплазме в процессе индукции IPTG и не обнаруживает цитотоксических свойств. Его идентичность природному белку

подтверждена прямым секвенированием соответствующего участка ДНК и методом иммуноблотинга с антителами к CTR1. После обработки токсичными концентрациями солей меди или серебра бактерии, экспрессирующие GST-NdCTR1, демонстрируют колониеобразующую способность на несколько порядков выше, чем экспрессирующие GST клетки. По данным гель-фильтрации, экспрессируемый бактериями GST формирует функциональные гомодимеры, с которыми атомы серебра не связываются. Слитый белок на гель-хроматограмме распределяется как гомодимер (примерно 70 кДа) и гомотетрамер (больше 132 кДа). В лизате клеток, предварительно обработанных раствором AgNO₃, активность GST и наличие ионов серебра выявлены в димерах и олигомерах слитого белка. Антитела к CTR1 преципитируют слитый белок, атомы серебра содержатся в иммунопреципитате. Тотальная концентрация серебра в клетках, экспрессирующих GST-NdCTR1, в 2 раза выше, чем в клетках, экспрессирующих GST, при этом выживаемость первых повышена на три порядка. Обсуждаются возможные механизмы интеграции NdCTR1 в систему метаболизма меди у прокариотов и перспективы использования хелатирующих свойств NdCTR1. (Грант РФФИ № 15-04-06770-а).

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕЛЕЦ ВКЛЮЧЕНИЯ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ЭКСПРЕССИИ МЕМБРАННОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ A1 *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*, В *ESCHERICHIA COLI*

С.И. Бахолдина, Е.В. Сидорин, М.П. Исаева, Н.Ю. Ким, А.В. Реунов, Л.А. Лапшина, Т.Ф. Соловьева

Тихоокеанский институт биорганической химии им Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

Продукция рекомбинантных белков в штамме-продуcente часто сопровождается формированием так называемых телец включения (ТВ), представляющих собой агрегаты белков, для растворения которых необходимы высокие концентрации денатурантов. Именно получение труднорастворимых ТВ является основной причиной неэффективного рефолдинга и низкого выхода рекомбинантного белка в нативной конформации. Недавно было установлено, что структура ТВ, помимо природы образующего их белка, определяется комбинацией различных параметров процесса экспрессии, манипулируя которыми можно получать биологически активные белки. В данной работе мы изучили влияние различных концентраций индуктора (ИПТГ) и времени индукции на уровень экспрессии, морфологию, агрегатное состояние и биологическую активность ТВ фосфолипазы A1 *Y. pseudotuberculosis*. Экспрессию ТВ проводили в *E. coli* BL21 (DE3), трансформированной плазмидой pET32/mPldA, с использованием 0,5 мМ ИПТГ в течение 1 (ТВ-1) и 3 часов (ТВ-2) и 1 мМ ИПТГ в течение 3 часов (ТВ-3). Было установлено, что при увеличении времени экспрессии с 1 до 3 часов возрастает в 1,7 раза общее количество клеток штамма-продуцента и в 2 раза уровень экспрессии фосфолипазы. Однако максимальное количество целевого белка в клетках синтезируется при 0,5 мМ ИПТГ. Все полученные образцы ТВ по данным трансмиссионной электронной микроскопии имеют сферическую форму и шероховатую поверхность, диаметр частиц возрастает в ряду ТВ-1, ТВ-2, ТВ-3. Методом динамического светорассеивания установлено для ТВ-1 мультимодальное распределение частиц с гидродинамическим диаметром 86–760 нм, а для ТВ-3 – мономодальное в интервале 680–940 нм. Показано, что все исследуемые ТВ медленно разрушаются протеиназой К, концентрация мочевины, растворяющая 50% агрегатов, для ТВ-1 и ТВ-3 составляет 5 и 6 М соответственно. По данным связывания с Конго красным содержание амилоидов в ТВ-3 было наибольшим, по сравнению с ТВ-1 и ТВ-2. Эти данные свидетельствуют о том, что с увеличением концентрации индуктора от 0,5 до 1 мМ ТВ увеличиваются в размерах, уменьшается их гетерогенность и растворимость в мочеvine, возрастает доля амилоидных агрегатов. Как следствие, очищенный белок из ТВ-3 проявляет более чем в 10 раз меньшую ферментативную активность, в сравнении с белком из ТВ-1 и в 2 раза – в сравнении с таковым из ТВ-2. Таким образом, уменьшение концентрации индуктора при экспрессии мембранной фосфолипазы A1 *Y. pseudotuberculosis* в *E. coli* является оправданным приемом для увеличения выхода белка в биологически активной форме. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант 16-08-00679).

***THERMOSULFURIMONAS LITORALIS*, SP.NOV. – НОВАЯ, АНАЭРОБНАЯ ТЕРМОФИЛЬНАЯ СЕРО-ДИСПРОПОРЦИОНИРУЮЩАЯ БАКТЕРИЯ ИЗ МЕЛКОВОДНЫХ МОРСКИХ ГИДРОТЕРМ**

А.А. Фролова, Г.Б. Слободкина, А.И. Слободкин

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологий» РАН, Москва, Россия

Микробное диспропорционирование неорганических соединений серы – это хемолитотрофный процесс, где такие вещества, как элементарная сера, тиосульфат или сульфит служат одновременно и донорами, и акцепторами электронов, в результате чего происходит образование сероводорода и сульфата, как конечных продуктов. Термофильные серо-диспропорционирующие микроорганизмы представляют собой филогенетически разнообразную группу и относятся к классам *Thermodesulfobacteria* и *Deltaproteobacteria*. Известные к настоящему времени серо-диспропорционаторы выделены либо из глубоководных морских гидротерм, либо из наземных горячих источников. Из мелководных морских гидротерм о. Кунашир нами выделена термофильная, анаэробная бактерия (штамм SU872), диспропорционирующая соединения серы. Клетки штамма SU872 представляют собой подвижные, грамм-отрицательные овальные или короткие палочки. Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S rRNA штамма SU872 показал 97,8% сходства с типовым штаммом *Thermosulfurimonas dismutans*. ДНК-ДНК гибридизация штамма SU872 и типового штамма *Thermosulfurimonas dismutans* составила 48%. Штамм SU872 растет при температуре от 50 до 79°C с оптимумом роста 74°C. Оптимальное значение pH – 7,0, при значениях pH 4,0 и 8,5 роста не наблюдается. Оптимальные значения солёности 1,5–4,5%, при значениях солёности 0,5 и 5,5 рост отсутствует. Штамм SU872 растет хемолитоавтотрофно за счет диспропорционирования элементарной серы, тиосульфата или сульфита; единственным источником углерода служит CO₂/бикарбонат. Сульфат не используется в качестве акцептора электронов. Различные органические субстраты, такие как пептон, пируват, формат, лактат, ацетат, метанол, этанол, бутират, не используются в качестве доноров электронов с элементарной серой в качестве акцептора электронов.

На основании фенотипических характеристик и данных филогенетического анализа мы предлагаем отнести штамм SU872 к новому виду рода *Thermosulfurimonas*, *Thermosulfurimonas litoralis* sp. nov. *Thermosulfurimonas litoralis* – первый серо-диспропорционирующий микроорганизм, выделенный из мелководных морских гидротерм.

РАСТЕНИЕ КАК ДРАЙВЕР РИЗОСФЕРНОГО МИКРОБИОМА

Е.Е. Андронов, А.А. Иголкина, Е.Р. Чирак, В.В. Копать, А.К. Кимеклис, В.И. Сафронова, А.А. Белимов, Н.А. Проворов

ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

Начало XXI века в биологии ознаменовалось существенными технологическими прорывами, обеспечивающими недоступную ранее глубину анализа как отдельных организмов, так и целых сообществ. Прежде всего, это касается технологий высокопроизводительного секвенирования и сопряженных с ними методов биоинформатики. Рождаются совершенно новые научные направления, такие, как метагеномика. Основные закономерности эволюционных процессов, о которых ранее приходилось судить (а чаще всего только догадываться) лишь по фрагментарным данным, сегодня становятся вполне очевидными. Поразительные процессы природной генетической и эволюционной инженерии, приводящие к возникновению сложнейших конструкций, таких, как например, бобово-ризобийный симбиоз, оставляют далеко позади все достижения искусственных генно-инженерных технологий. Понимание природных эволюционных механизмов, обеспечивающих высочайший адаптивный потенциал природных систем, рождает очевидный вопрос о том, могут ли эти механизмы быть использованы в реальной практике сельскохозяйственного производства. В настоящем докладе будут представлены результаты исследований почвенного микробиома и эволюционных механизмов, которые обеспечивают его адаптационный потенциал на нескольких уровнях организации: метагеномном, геномном и генном. По данным, полученным в ходе исследования почвенного микробиома, будут продемонстрированы эффекты, связанные с воздействием среды, а также гораздо более направленные и точно ориентированные эффекты, связанные с растениями. Последние ясно свидетельствуют о том, что растение является одним из самых мощных факторов, формирующих почвенные микробиомы, и затрагивающих все уровни организации генетического материала. Наиболее ярко эти закономерности проявляются в эволюции тесно интегрированных симбиотических систем, таких как бобово-ризобийный симбиоз. Вполне возможно, что агробиотехнологии, вооруженные пониманием естественных адаптационных механизмов, могли бы сделать существенный вклад в развитие эффективного и устойчивого сельскохозяйственного производства. *Работа поддержана грантом РНФ № 14-26-00094.*

УТИЛИЗАЦИЯ ФИТОГОРМОНОВ СИМБИОТИЧЕСКИМИ БАКТЕРИЯМИ

А.А. Белимов¹, Н.Е. Гоголева², А.И. Шапошников¹, Ю.В. Гоголев², О.С. Юзихин³, Я.В. Пухальский¹, И.С. Додд⁴, В. Дэвис⁴

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург; ²Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань; ³Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет им. С.М. Кирова; ⁴Университет г. Ланкастер, Великобритания

Способность бактерий, образующих симбиоз с растениями, продуцировать фитогормоны (ауксины, цитокинины и гибберелины) была описана в многих публикациях. Показано, что это свойство лежит в основе важного механизма растительно-микробных взаимодействий – стимуляции роста и повышения адаптации растений к факторам окружающей среды фитогормонами бактериального происхождения. Описаны основные гены и ферменты, участвующие в биосинтезе вышеуказанных фитогормонов. Гораздо меньше известно о микроорганизмах, способных к деструкции и утилизации фитогормонов благодаря наличию специфических ферментов. Наиболее изученными в данном отношении являются бактерии, содержащие фермент 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат (АЦК) дезаминазу. АЦК служит предшественником в биосинтезе фитогормона этилена, который в растениях образуется благодаря действию АЦК оксидазы. Этилен играет важную роль во многих метаболических процессах растений, но в стрессовых условиях он особенно интенсивно синтезируется и ингибирует рост растений. Бактериальная АЦК дезаминаза гидролизует АЦК до α -кетобутирата и NH_4 без образования этилена, благодаря чему в растениях снижается концентрация этилена. Это приводит к стимуляции роста растений. В докладе обсуждается распространение АЦК дезаминазы у ассоциативных и клубеньковых бактерий, и роль этого фермента в мутуалистическом взаимодействии бактерий с растениями, особенно в стрессовых условиях. Описывается также значение АЦК дезаминазы для фитопатогенных микроорганизмов (бактерий и грибов), которые могут маскировать атаку на растения благодаря снижению сигнала, обусловленного этиленом. Проведен обзор данных об утилизации бактериями других фитогормонов (цитокинины, гиббереллины и жасмоновая и салициловые кислоты). Авторами доклада впервые выделены и охарактеризованы ассоциативные бактерии, утилизующие абсцизовую кислоту в качестве единственного источника углерода, и снижающие концентрацию этого фитогормона в инокулированных растениях. Представлены результаты поиска у данных бактерий генов и ферментов, ответственных за деструкцию абсцизовой кислоты, проведенного методами метаболомного анализа в сочетании с методами сравнительной и функциональной геномики.

Работа поддержана грантами РФФИ (13-04-01655-а, 15-04-09023-а), РНФ (14-16-00137) и the Royal Society.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ СПЕЦИФИЧНОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.) С КЛУБЕНЬКОВЫМИ БАКТЕРИЯМИ

В.А. Жуков¹, А.С. Сулима¹, А.М. Афонин^{1,2}, И.А. Тихонович^{1,2} *¹ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии; ²Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет, Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербург, Россия*

Растения семейства Бобовые (Fabaceae) способны формировать азотфиксирующий симбиоз с клубеньковыми бактериями. Данный симбиоз характеризуется крайне высокой специфичностью, основанной на биохимических механизмах, – симбиотические пары макро- и микросимбионтов образуются, если структура сигнальной молекулы, выделяемой бактериями (Nod-фактора), строго соответствует специфическому рецептору растения. Рецепторы Nod-фактора, идентифицированные у различных бобовых растений, представляют собой белки семейства рецепторных киназ, содержащие LysM-домены. Молекулярно-генетический анализ мутантов гороха с нарушениями развития начальных этапов азотфиксирующего симбиоза, а также природных генотипов гороха с различной специфичностью взаимодействия с клубеньковыми бактериями, позволил нам выявить последовательности генов Sym37 и Sym2 гороха, кодирующих рецепторы, распознающие структуру Nod-фактора. Было установлено, что аллельное состояние гена Sym2 ассоциировано со способностью растения вступать в симбиоз с широким либо узким спектром штаммов клубеньковых бактерий, причем предполагаемая белковая последовательность рецепторного домена различается по одной или сразу по трем аминокислотным остаткам. На основании полученных данных нами предложена модель, в соответствии с которой сложная структура Nod-фактора (представляющего собой липохитооли-

госахарид) распознается рецепторным комплексом, в котором белок Sym37 связывает нередуцирующий конец Nod-фактора, а Sym2 – его редуцирующий конец. Внесение определенных аллелей гена Sym2 в новые сорта гороха позволит избирательно создавать высокоэффективные пары макро- и микросимбионта в естественных условиях, что обеспечит максимально эффективное применение биопрепаратов, содержащих клубеньковые бактерии, благодаря исчезновению конкурентного действия аборигенной почвенной микрофлоры. *Исследование поддержано грантами РНФ (14-24-00135 и 16-16-00118) и РФФИ (14-04-01442, 15-29-02737 и 16-04-01859).*

БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗРАБОТКИ СОВРЕМЕННЫХ СРЕДСТВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

А.О. Берестецкий *Всероссийский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия*

Защита растений – неотъемлемая часть растениеводческих технологий. В нее входят такие разделы, как мониторинг (в том числе, с применением феромонов насекомых) и диагностика вредных организмов, профилактические (агротехника, устойчивые сорта, предпосевная обработка семенного материала, применение индукторов иммунитета и другие) и искореняющие (использование пестицидов) мероприятия. Здесь невозможно переоценить роль химических средств защиты растений, которые в свое время обеспечили «зеленую революцию» и позволили резко поднять урожайность различных культур и повысить их сохранность при хранении. Однако слишком их широкое и частое применение или ошибки в их использовании дорого обходятся окружающей среде: загрязняются почва и грунтовые воды, остатки пестицидов обнаруживаются в корме и продуктах питания, появляются резистентные к ним формы вредных организмов. Поэтому ведутся поиски способов и методов снижения зависимости растениеводства от биоцидных препаратов, а также разработка и внедрение биорациональных средств защиты растений, структура действующих веществ которых базируются на природных соединениях. Еще одна важная задача в современной защите растений – борьба с популяциями сорных растений, фитопатогенов и фитофагов, резистентных к пестицидам. Основной путь решения этой проблемы – разработка действующих веществ с новыми механизмами действия. Однако за последние 20 лет в мире, например, не внедрено ни одного гербицида с новым механизмом действия. Следует отметить расширение ассортимента биологических препаратов для защиты растений, что в развитых странах поддерживается на законодательном уровне. Как следствие, многие химические компании приобретают успешные биотехнологические производства биопестицидов (БП) или разрабатывают собственные препараты. Основные недостатки БП, которые ограничивают их широкое внедрение, – недостаточная эффективность, непродолжительные сроки хранения, отсутствие четких критериев качества. В настоящее время актуальным является изучение биохимии продуцентов БП в связи с их вирулентностью и термотолерантностью. Наименее изучена эта проблема для микроорганизмов, являющихся действующим началом микогербицидов. *Исследования поддержаны грантом РНФ (проект № 16-16-00085).*

АНАЛИЗ СПОСОБНОСТИ LYSM-РЕЦЕПТОРНЫХ КИНАЗ ГОРОХА *PISUM SATIVUM* L. РАЗЛИЧАТЬ СИГНАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ РИЗОБИЙ NOD-ФАКТОРЫ

Е.А. Долгих, А.Н. Кириенко, Ю.Б. Порозов, И.А. Тихонович *ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии; Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия*

В основе специфичности симбиоза между бобовыми растениями и бактериями пор. Rhizobiales (ризобиями) лежит способность растений различать структурные особенности липохитоолигосахаридных сигнальных молекул Nod-факторов, выделяемых ризобиями. Выполненные ранее эксперименты по влиянию бактериальных мутантов, выделяющих измененные Nod-факторы, на развитие симбиоза позволили предположить, что у гороха *Pisum sativum* L. узнавание Nod-факторов может зависеть от двух типов рецепторов, отличающихся по специфичности к структуре этих молекул. Выявление мутантов гороха по генам, кодирующим два разных типа LysM-рецептор-подобных киназ (LysM-РПК) Sym10 и Sym37, с разными фенотипическими проявлениями и блокированных на разных этапах развития симбиоза соответствовало этому предположению. Вместе с тем, у LysM-РПК Sym10, необходимой для инициации симбиоза, киназный домен не является активным. Это указывает на наличие дополнительного компонента в рецепторном комплексе, работающего совместно с Sym10, но до настоящего времени остающегося не выявленным у гороха. В нашей работе была изучена новая LysM-RLK K1, которая может быть таким дополнительным компонентом в рецепторном комплексе. Молекулярное моделирование с лигандом показало, что K1 может быть потенциальным рецептором к Nod-факторам. Анализ экспрессии гена с помощью количественной ПЦР, совмещенной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), показал, что ген K1 экспрессируется на ранних стадиях развития симбиоза совместно с Sym10. Возможность формирования комплекса между K1 и Sym10 была показана с помощью дигибридной дрожжевой системы, а также при совместном синтезе белков в листьях *Nicotiana benthamiana*. В связи с тем, что способность формировать комплекс была показана также и для рецепторов Sym10 и Sym37, нами была проверена способность двух LysM-РПК K1 и Sym37 функционально замещать друг друга с помощью теста на комплементацию. Для выяснения функции LysM-РПК K1 из коллекции TILLING мутантов был получен мутант по данному гену и проведен его анализ. На основании анализа взаимодействия между рецепторами, обсуждается возможная модель рецепции Nod-факторов у гороха. *Работа была поддержана грантом РНФ 16-16-10043.*

THE POWER OF NETWORKING: DERIVING BENEFITS FROM PLANT MICROBIOMES FOR AGRICULTURE AND HUMAN HEALTH

Daria Rybakova and Gabriele Berg *Institute of Environmental Biotechnology, Graz University of Technology, Graz, Austria*

The importance of microbial root inhabitants for plant growth and health was recognized as early as 100 years ago. Since that time, much has been learned about microorganisms and their close symbiotic relationship with plants (Berg *et al.* 2014). Comparable to humans and other eukaryotic hosts, plants may also be described as metaorganisms that harbor a “second genome”. These advances in understanding have been driven by both “omics”-technologies, guided by next-generation sequencing, and by microscopic insights. Collectively known as the plant microbiome, plant-associated microbes can help plants fend off disease, stimulate growth, occupy space that would otherwise be taken up by pathogens, promote stress resistance, and influence crop yield and quality (Berg *et al.* 2015). Therefore, the plant microbiome is a key determinant of plant health and productivity. Plant microbiome discoveries could fuel progress in sustainable agriculture, such as the development of microbial inoculants as biofertilizers, biocontrol, or stress protection

products (Berg 2009). Although we are aware of a growing market for bio-products, their applications are still limited by factors such as e.g., short shelf-life, inconsistent effects under field conditions, and risk predictions. For example, changes in plant growth conditions may result in a reverse effect of bacteria on the host plant as shown by the example of *Paenibacillus polymyxa* Sb3-1 applied to the seeds of the oilseed rape (Rybakova et al. 2015a and b). The application of “omics”-technologies has allowed for enormous progress in the development of so-called next-generation bio-products (Köberl et al. 2012). New tools may have an impact on (i) the detection of new bio-resources for biocontrol and plant growth promoting agents as demonstrated by exploration of moss and lichen microbiomes for advanced biocontrol technologies (Bragina et al. 2012, Zachow et al. 2013), (ii) development of the new predictable biocontrol strategies as shown by thoughtful study of lettuce microbiome (Erlacher et al. 2015; Grube et al. 2015), (iii) understanding of mode of action of the microorganisms and (iv) risk assessment studies for biotechnological applications as shown by the example of a successful biocontrol agent *Stenotrophomonas rhizophila* P69 (Alavi et al. 2013). Advances in the understanding of these aspects of microbial research may open new perspectives for sustainable agriculture through the development of high impact next-generation bio-products (Berg et al. 2013).

1. Alavi, P., Starcher, M.R., Zachow, C., Müller, H., and G. Berg. 2013. Root-microbe systems: the effect and mode of interaction of Stress Protecting Agent (SPA) *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405T. *Frontiers Plant Science* 4: 141.
2. Berg, G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84: 11–18.
3. Berg, G., Grube, M., Schlöter, M., Smalla, K. 2014. Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Front. Microbiology* 5: 148.
4. Berg, G., Rybakova, D., Grube, M., Köberl, M. 2015. The plant microbiome explored: implications for experimental botany. *J. of exp. Botany*, 66: 466.
5. Berg, G., Zachow, C., Müller, H., Philipps, J., Tilcher, R. 2013. Next-Generation Bio-Products Sowing the Seeds of Success for Sustainable Agriculture. *Agronomy* 3: 648–656.
6. Bragina, A., Berg, C., Cardinale, M., Shcherbakov, A., Chebotar, V., Berg, G. 2012. *Sphagnum* mosses harbour highly specific bacterial diversity during their whole lifecycle. *ISME J.* 6: 802–813.
7. Erlacher, A., Cernava, T., Cardinale, M., Soh, J., Sensen, C. W., Grube, M., & Berg, G. 2015. Rhizobiales as functional and endosymbiotic members in the lichen symbiosis of *Lobaria pulmonaria* L. *Front. Microbiology* 6.
8. Grube, M., Cernava, T., Soh, J., Fuchs, S., Aschenbrenner, I., Lassek, C., Wegner, U., Riedel, K., Sensen, C.W., Berg, G. 2014. Exploring functional contexts of symbiotic sustain within lichen-associated bacteria by comparative omics. *ISME*. doi:10.1038/ismej.2014.138.
9. Köberl, M., Ramadan, E.M., Roßmann, B., Staver, C., Fürnkranz, M., Lukesch, B., Grube, M., Berg, G. 2012. Using ecological knowledge and molecular tools to develop effective and safe biocontrol strategies. In: *Pesticides in the Modern World/Book 5*, E-book: Rijeka, Croatia.
10. Rybakova, D., Schmuck, M., Wetzlinger, U., Varo-Suarez, A., Murgu, O., Müller, H., Berg, G. 2015a. Kill or cure? The interaction between endophytic *Paenibacillus* and *Serratia* strains and the host plant is shaped by plant growth conditions. *Plant and Soil*: 1–15.
11. Rybakova, D., Cernava, T., Köberl, M., Liebminger, S., Etemadi, M., & Berg, G. 2015. Endophytes-assisted biocontrol: novel insights in ecology and the mode of action of *Paenibacillus*. *Plant and soil*, 1–16.
12. Zachow, C., Müller, H., Tilcher, R., Donat, C., Berg, G. 2013. Catch the best: Novel screening strategy to select Stress Protecting Agents for crop plants. *Agronomy* 3(4): 794–815.

BIODIVERSITY OF TOXIGENIC FUNGI AND MULTI-MYCOTOXINS IN PLANT DISEASES AND MYCOKEY EFFORTS TO HARMONIZE STRATEGIES FOR THEIR REDUCTION

Antonio F. Logrieco *Institute of Sciences of Food Production (ISPA), Research National Council (CNR), Bari, Italy*

Fusarium and *Aspergillus* genera represents two of main mycotoxigenic fungi responsible of various plant, animal and human diseases. These two genera include complexes of pathogenic and opportunistic species able to produce a large number of toxic secondary metabolites (mycotoxins) in infected tissue. Environmental conditions that exist in the various agro-eco-systems in which plants are cultivated are of particular interest in biodiversity studies because such conditions can influence fungal populations associated with these crops, fungal-plant interactions, and production of biologically active secondary metabolites, including mycotoxins. *Fusarium* ear rot of maize, *Fusarium* Head blight and *Aspergillus* rot of grape are three examples of important plant diseases caused by complexes of species of mycotoxigenic fungi. These complexes of species tend to be closely related, produce different classes of mycotoxins, and can induce disease under different environmental conditions. The infection of maize, wheat and grape with multiple fungal species and the resulting production of large classes of mycotoxins is an example of mutual aggressiveness of microorganisms toward host species as well as to humans and animals that eat feed or food derived from the infected and contaminated plants. To know the biodiversity of mycotoxigenic fungi, their mutual benefit and how they follow each other is of great importance both for risk assessment and for control/reduction strategies.

In this context, MYCOKEY, a project approved within the Horizon 2020 s (<http://www.mycokyeu.eu/>), will generate innovative and integrated solutions that will a) support stakeholders in effective and sustainable mycotoxin management along food and feed chains and b) promote a network of cooperation-interaction with the whole scientific community in order to optimize and rationalize the efforts for studying the mycotoxigenic fungi at global level and developing strategic solutions for reducing mycotoxin contamination in major crops. *Acknowledgements. This work was supported by EU MYCOKEY-678781.*

РОЛЬ ГЕНОВ KNOX В РАЗВИТИИ СИМБИОТИЧЕСКИХ КЛУБЕНЬКОВ У ЛЮЦЕРНЫ

Махбубех Азарахш, М.А. Лебедева, Л.А. Лутова

Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Гены KNOX кодируют транскрипционные факторы с гомеодоменом, которые играют важную роль в развитии растений. Известно, что мишенями транскрипционных факторов KNOX (KNAT1, STM) в меристеме побега являются гены, кодирующие изопентинилтрансферазы (IPT), ферменты биосинтеза цитокинина. TF KNOX активируют экспрессию генов биосинтеза цитокинина – гормона, который играет важную роль в контроле клеточных делений в апикальной меристеме побега. Гены IPT контролируют первую стадию биосинтеза цитокининов — синтез изопентинил-нуклеотидов из АТФ или АДФ и диметилаллилпирофосфата (DMAPP). Для образования активных форм цитокининов из цитокининовых нуклеотидов путем дефосфорилирования и дерибозилирования необходимы ферменты другого семейства LONELY GUY (LOG). Гены LOG также экспрессируются в меристеме. Данные о влиянии TF, в частности KNOX, на экспрессию генов LOG не известны. Гормон цитокинин играет важную роль в развитии меристем другого типа – в развитии азотфиксирующих клубеньков, формирующихся на корнях бобовых растений при симбиозе с почвенными бактериями ризобиями. На основании анализа мутантов с потерей

и приобретением функции гена рецептора цитокинина показано, что цитокинины являются необходимыми и достаточными для активации кортикальных клеточных делений, необходимых для органогенеза клубеньков.

В связи с этим мы изучили роль генов *KNOX* в развитии симбиотического клубенька, а также и их роль в активации биосинтеза цитокинина при клубенькообразовании. С помощью анализа экспрессии генов *KNOX* мы показали, что именно ген *KNOX3* вовлечен в развития симбиотического клубенька. Кроме того, выявлены гены семейства *IPT* {*IPT_1g110590(2)*} и *LOG* (*LOG 4g-40*, *LOG 1g-60*), экспрессия которых усиливается в ответ на инокуляцию ризобиями. На основании данных по временной динамике экспрессии генов и данных об изменении экспрессии предполагаемых генов-мишеней на фоне РНК-интерференции *KNOX3* мы заключили, что экспрессия генов *LOG* контролируется ТФ *KNOX3*. Таким образом, ген *KNOX3* контролирует образование активных форм цитокининов при развитии клубенька.

Исследование поддержано грантами: РФФИ - № 15-34-2071 и № офу-м 15-29-02737, РНФ - №16-16-10011.

ГОМЕОБОКС-СОДЕРЖАЩИЕ ГЕНЫ В СОМАТИЧЕСКОМ И ЗИГОТИЧЕСКОМ ЭМБРИОГЕНЕЗЕ У *MEDICAGO TRUNCATULA*

В.Е. Творогова, Ю.А. Федорова, Л.А. Лутова

Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Гены *WOX* кодируют транскрипционные факторы с гомеодоменом, регулирующие множество процессов в развитии растения, связанных с пролиферацией и дифференцировкой клеток. В частности, в ходе зиготического эмбриогенеза некоторые транскрипционные факторы *WOX* определяют дифференцировку отдельных клеток зародыша и детерминируют развитие из этих клеток отдельных частей растения, таких как корень или побег. Соматический эмбриогенез – это один из видов регенерации растений, при котором эмбрионы формируются из клеток соматических тканей. Он может наблюдаться в природе, однако у большинства видов растений этот процесс требует специальных условий культивации *in vitro*, при которых возможно развитие эмбрионного каллуса. Для ряда генов *WOX* показано участие и в этом процессе, однако вопрос о механизмах их работы в ходе соматического эмбриогенеза остаётся открытым.

Нами были найдены три гена семейства *WOX* (*STENOFOLIA*, *MtWOX9-1* и *MtWOX11-like*), которые характеризуются повышенным уровнем экспрессии в ходе развития соматических эмбрионов, а также в семязачатках, что говорит об их участии как в зиготическом, так и в соматическом эмбриогенезе. Локальный анализ экспрессии показал, что промоторы генов *STENOFOLIA* и *MtWOX9-1* активны непосредственно в соматических эмбрионах, а также в ассоциированных с ними зонах каллуса. Сверхэкспрессия *STENOFOLIA* и *MtWOX9-1* приводит к повышению эмбриогенности каллусов, что сопровождается изменениями в уровнях экспрессии ряда генов, ассоциированных с соматическим эмбриогенезом.

Мы планируем более детально изучить механизмы работы вышеперечисленных генов *WOX* в соматическом эмбриогенезе с помощью локализации кодируемых ими белков, поиска мишеней, а также анализа мутантов по этим генам. *Работа поддержана грантом РФФИ 15-34-20071 и грантом СПбГУ 1.42.1288.2014.*

РАСТЕНИЯ КАК БИОФАБРИКИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТИВОГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН

Е.С. Марданова¹, Е.А. Блохина¹, Р.Ю. Котляров¹, G.P. Lomonosoff², Л.А. Степанова², Л.М. Цыбалова², Н.В. Равин¹

¹Институт биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия; ²НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия; ³Department of Biological Chemistry, John Innes Centre, Великобритания

Использование растений в качестве «биофабрик» для получения рекомбинантных белков медицинского назначения является конкурентоспособной альтернативой традиционным технологиям, основанным на использовании бактерий, дрожжей или клеток животных. В последние годы были разработаны методы быстрой и высокоэффективной транзientной экспрессии белков в нетрансгенных растениях, основанные на использовании рекомбинантных фитовирусных векторов. Задачей работы являлось создание системы экспрессии в растениях кандидатной противогриппозной вакцины широкого спектра действия. Традиционные противогриппозные вакцины создаются на основе поверхностных белков вируса гриппа – нейраминидазы и гемагглютинина, высокая изменчивость которых требует создания новых вакцин для вновь появляющихся штаммов. Консервативный М2 белок вируса гриппа является одним из кандидатов для создания «универсальной» вакцины. Однако для создания эффективной вакцины этот белок должен быть присоединен к высокоиммуногенному носителю. В качестве таких носителей мы используем флагеллин бактерии *Salmonella typhimurium*, являющийся лигандом TLR5 рецепторов и эффективным мукозальным адъювантом, и вирусоподобные частицы (ВПЧ), образуемые ядерным антигеном вируса гепатита В (НВс). Разработана система экспрессии в растениях кандидатной противогриппозной вакцины на основе внеклеточного домена М2 белка (М2е) вируса гриппа, присоединенного к флагеллину. На основе генома вируса Х картофеля создан фитовирусный вектор, обеспечивающий экспрессию этого белка в листьях растений *Nicotiana benthamiana* на уровне 30% общего растворимого белка т. е. около 1 мг/г ткани листа. Рекомбинантный белок проявлял высокую иммуногенность при интраназальном введении и защищал иммунизированных мышей от летальной инфекции различными штаммами вируса гриппа. В рамках второго направления работ созданы фитовирусные векторы для экспрессии в растениях НВс антигена с присоединенным к нему М2е пептидом. Уровень Этот белок, М2еНВс, экспрессировался на уровне около 2% общего белка и образовывал вирусоподобные частицы *in vivo*. Таким образом, полученные в растениях вакцинные белки на основе М2е, присоединенного к высокоиммуногенному адъюванту могут стать основой перспективной кандидатной противогриппозной вакцины. *Работа поддержана грантом РНФ 15-14-00043.*

ВИРУСЫ РАСТЕНИЙ КАК ОСНОВА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НОВЫХ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ

О.В. Карпова, Н.А. Никитин

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

Вирионы и вирусоподобные частицы (ВПЧ), полученные на основе белков оболочки вирусов растений, в последнее время стали рассматривать как основу для создания биотехнологий, в том числе и новых биомедицинских препаратов. Вирусы растений абсолютно безопасны для млекопитающих (человека), могут накапливаться в больших количествах в растениях, выделение и очистка препаратов не требует больших временных и материальных затрат. Одной из основных проблем при

создании вакцин является проблема иммуностимуляторов (адьювантов), поскольку применяемые в настоящее время адьюванты, как правило, либо токсичны, либо недостаточно эффективны. Вирусы растений и ВПЧ являются высоко иммуногенными и, таким образом, могут быть использованы в качестве компонентов новых вакцин. Частицы фитовирусов могут служить удобными и крайне перспективными матрицами для образования иммуногенных комплексов с антигенными детерминантами инфицирующих агентов или адьювантами, входящими в состав вакцинных препаратов. Мы показали, что структурно модифицированные сферические частицы (СЧ), полученные при кратковременном нагревании палочковидного спирального вируса табачной мозаики могут служить платформой с уникальными адсорбционными свойствами для презентации рекомбинантных антигенов и играть роль безопасного эффективного адьюванта. Использование структурно модифицированных вирусов растений, декорированных рекомбинантными антигенами инфекционных агентов, позволяет смоделировать безопасную вирусную частицу. Они способны заменить аттенуированные вирионы патогенов, которые используются в препаратах большинства вакцин. На основе СЧ созданы образцы кандидатных вакцин против краснухи, гриппа, ротавирусной инфекции и др. Нами исследованы адьювантные свойства вирионов и вирусоподобных частиц (ВПЧ) нитевидных вирусов со спиральной симметрией и СЧ. Иммунный ответ на модельный антиген в присутствии вирионов, ВПЧ или СЧ значительно возрастал. Анализ изотипов антител в полученных сыворотках свидетельствует о стимуляции сбалансированного Th1/Th2-иммунного ответа. *Работа поддержана грантом Российского научного фонда (№ 14-24-00007).*

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

А.А. Кочеткова, В.А. Саркисян

Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия

Обеспечение качества и безопасности пищевой продукции является важнейшей составляющей профилактики инфекционных заболеваний, укрепления здоровья, увеличения продолжительности и повышения качества жизни населения страны. Несмотря на это, единого определения термина, характеризующего качество пищевых продуктов в настоящее время нет. Специализированная пищевая продукция как продукция с заявленными требованиями к содержанию и соотношению отдельных компонентов, заявленным лечебным или профилактическим действием имеет свои специфические, отличные от традиционных, требования к качеству и безопасности. По своему определению специализированная пищевая продукция обладает отличительными признаками, наличие которых и обуславливает необходимость применения дополнительных требований к их качеству и безопасности. Среди них – обязательное декларирование содержания биологически активных веществ в составе пищевого продукта (в качестве критерия качества), а также регламентирование содержания данного вещества ниже верхнего допустимого уровня потребления (в качестве критерия безопасности). Другими критериями качества и безопасности данных продуктов является присутствие в их составе пищевых ингредиентов, представляющих факторы риска для здоровья (насыщенные жиры, соль, сахар, холестерин и т. п.). К особенностям специализированных пищевых продуктов относится также и необходимость их обязательной государственной регистрации. При этом в рамках требований государственной регистрации особое внимание уделяется этикетированию специализированных продуктов. Техническим регламентом Таможенного союза установлены точные формулировки сведений об отличительных признаках, которые на добровольной основе можно выносить на этикету пищевого продукта, а также требования для подтверждения соответствия этим заявленным признакам. В докладе будут освещены основы развития современной системы нормативного регулирования в области оценки качества и безопасности специализированной пищевой продукции. На примере научных разработок, выполненных при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-36-00041), будет рассмотрено введение отличительных признаков для разработки новых видов специализированных пищевых продуктов, предназначенных для алиментарной коррекции отдельных нарушений метаболизма.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОТЕОМНЫХ МЕТОДОВ И БЕЛКОВЫХ БИОМАРКЕРОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ И КАЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ

Л.И. Ковалев, М.А. Ковалева, А.В. Иванов, И.А. Каменихина, Т.Ю. Исаякина, С.С. Шишкин, И.М. Чернуха

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; Медицинский институт РУДН; ВНИИ мясной промышленности им. В.М. Горбатова, Москва, Россия

Проблемы, связанные с поступлением на рынок продуктов питания недостаточного качества, являются весьма актуальными. Для обеспечения контроля качества мясных продуктов традиционно применяется ряд подходов и методов, включающих мониторинг фактического состава, определение присутствия белковых добавок растительного и животного происхождения, а также установление степени соответствия нормативной документации для продуктов, вырабатываемых в соответствии с ГОСТ и ТУ. В настоящее время отдельными зарубежными авторами для указанных целей начато использование протеомных технологий (двумерного электрофореза, масс-спектрометрии и др.). В нашей работе было проведено протеомное исследование белкового состава ряда образцов мясного сырья (говядина, свинина и др.), а также вареных колбас. В результате идентифицированы маркеры, пригодные для определения количества использования видоспецифичного мясного сырья (тропомиозины, альдолаза А, легкие цепи миозина и др.), ненормативных добавок другого типа мяса (β-енолаза птиц), а также превышения норм добавок белков растительного (глицинины) и молочного (казеин CSN2) происхождения. По полученным данным количество использованного мясного сырья в отдельных коммерческих образцах, закупленных в торговых сетях, оказалось заниженным на 20–40% по сравнению с эталонными. Более того, в ряде образцов были идентифицированы белки мяса птицы, не аннотированные в ГОСТ и ТУ для этих типов продукции, а также выявлены примеры превышения добавок белков молока. Таким образом, показана целесообразность и перспективность применения протеомных технологий для выявления белковых биомаркеров, позволяющих оценить качество мясной продукции по белковому составу, определению видовой принадлежности в коммерческой продукции мышечных белков и присутствия белковых добавок немускульного происхождения.

ЭКСПРЕССНЫЕ СИСТЕМЫ ИММУНОДЕТЕКЦИИ ТОКСИЧНЫХ КОНТАМИНАНТ ДЛЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

Б.Б. Дзантиев, А.В. Жердев *Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологий» РАН, Москва, Россия*

Расширение научных знаний об ассоциированных с продуктами питания факторах риска и возрастающий общественный интерес к вопросам пищевой безопасности обусловили необходимость в новых средствах мониторинга токсичных контаминант на всех этапах производства пищевых продуктов. В докладе рассмотрены иммунохимические тест-системы с применением неорганических наночастиц в качестве носителей и маркеров, обеспечивающие возможность экспрессного мультипараметрического определения различных классов контаминант. Представлены данные по влиянию размеров наночастиц и состава их комплексов с иммунореагентами на характеристики аналитических методов. Рассмотрены закономерности иммобилизации антител на поверхности нанодисперсных частиц, разработаны методики количественной характеристики состава и функциональной активности получаемых комплексов. На примерах детекции антибиотиков показаны преимущества применения флуоресцентных наночастиц (квантовых точек) в качестве маркеров антител. Обсуждается влияние поверхностной плотности антител, иммобилизованных на частицах коллоидного золота, на процессы образования детектируемых иммунных комплексов и результаты анализа. Дается математический анализ иммунохимических взаимодействий и разработанные на его основе рекомендации по направленной оптимизации аналитических систем. Представлены новые решения для проведения иммунохроматографического анализа, обеспечивающие существенное (до двух порядков) снижение предела определения. Реализованные на основании данных разработок тест-системы для детекции антибиотиков, микотоксинов, пестицидов, пищевых красителей позволяют за 10–20 мин. контролировать присутствие токсичных контаминант (в том числе в режиме одновременного определения нескольких соединений) в нанограммовом диапазоне в соответствии с установленными уровнями их допустимой концентрации. Охарактеризованы возможности количественной оценки содержания токсичных контаминант при проведении анализов во внелабораторных условиях и использовании экспрессных тестов в сочетании с портативными фото- и флуориметрическими детекторами.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-14-01131).

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ НА ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИЦАХ ПРЕПАРАТЫ ИНУЛИНАЗ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

М.Г. Холявка¹, А.Р. Каюмов², Д.Р. Байдамшина², М.С. Кондратьев³, В.Г. Артюхов¹ *¹Воронежский государственный университет, Воронеж; ²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; ³Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия*

Инулиназа (2,1-β-D-фруктан-фруктаногидролаза, КФ 3.2.1.7) расщепляет инулин и другие фруктосодержащие полимеры до фруктозы. Целью работы был поиск лигандов для иммобилизации инулиназы методами компьютерного моделирования и их экспериментальная проверка. В качестве модели фермента в банке данных Protein Data Bank была выбрана структура инулиназы из *Aspergillus ficuum* (код 3SC7). На основе сравнительного анализа энергий и мест связывания лигандов, а также литературных данных о строении каталитического центра инулиназы, были выдвинуты представления о локализации и механизмах взаимодействия предложенных нами матриц для иммобилизации с молекулой фермента. На моделях фермента инулиназы, лигандов и фрагментах матриц для иммобилизации была определена степень аффинности связывания и на основании этого сделаны выводы о перспективности экспериментального тестирования некоторых из соединений в качестве иммобилизационных агентов для инулиназы. В качестве экспериментально протестированных матриц выступали ионообменные смолы и волокна. Следует отметить, что в указанном ряду лигандов наибольшей аффинностью к мишени обладала матрица катионообменной смолы КУ-2, расчет показал величину сродства – 7,3 ккал/моль. Все иммобилизационные агенты, по данным расчетов гибкого докинга, связываются с инулиназой в области торца ее N-домена, что стерически не модифицирует активный центр фермента. Расчетные результаты хорошо согласуются с экспериментальными данными: при иммобилизации инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus* процент сохранения активности у гетерогенных препаратов тем выше, чем выше аффинность фермента к матрице носителя. Предложенный нами адсорбционный способ иммобилизации фермента позволил сохранить его первоначальную каталитическую активность на ~ 80% для инулиназы растительного происхождения и на 75,5% для энзима из дрожжей. Показано, что исследованные сорбенты, нативные и иммобилизованные инулиназы не проявляют мутагенной, ДНК-повреждающей и цитотоксической активности, что позволяет рекомендовать их для использования в качестве катализаторов для пищевой промышленности.

ЭКЗОМЕТАБОЛИТЫ *TRICHODERMA ATROBRUNNEUM* КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ В АГРОТЕХНОЛОГИЯХ

Н.Е. Павловская, И.А. Гнеушева, А.В. Лушников, О.А. Маркина, М.А. Полякова, И.Ю. Солохина *Орловский государственный аграрный университет, Орёл, Россия*

Приоритетным направлением биоинженерии является создание агротехнологий производства полноценной, экологически чистой и сельскохозяйственной продукции при использовании биопотенциала растений и микроорганизмов, проявляющих биологическую активность.

Род грибов *Trichoderma* Spp. имеет особое значение в сельскохозяйственной практике, так как является ценным биоагентом при регулировании многих видов фитопатогенных микроорганизмов (Agrios, 2005). Коммерческие продукты на основе штаммов *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens* доступны на мировом рынке и используются для защиты или в качестве стимулятора роста растений (Hermosa, 2000; Chaverri, 2015). Микромицеты являются богатым источником вторичных метаболитов с выраженной биологической активностью. Среди них не только потенциальные антибиотики (пептаинолы), но и трихотеценовые микотоксины, более 100 метаболитов с антибиотической активностью (поликетиды, терпены и др.). В последнее время интерес к разработкам новых биопрепаратов на основе метаболитов *Trichoderma* Spp. растет (Harman, 2006).

Исследования в ЦКП «Орловский региональный центр сельскохозяйственной биотехнологии» направлены на изучение биологического потенциала штамма *Trichoderma atroviride* (Chaverri et al, 2015) (первая публикация о штамме 28.01.2015). Для подтверждения видовой принадлежности микромицета проведена молекулярная идентификация нуклеотид-

ных последовательностей (Druzhinina et al., 2005). Выделены и идентифицированы экзометаболиты штамма. Выявлена их антагонистическая активность в отношении фитопатогенных, условно-патогенных и патогенных микроорганизмов. Показаны механизмы ростстимулирующего действия антибиотически активных экзометаболитов на горохе посевном.

Применение в агротехнологиях биопрепаратов на основе экзометаболитов *Trichoderma atroviride* позволяет наиболее полно реализовать потенциальные возможности сельскохозяйственных растений, заложенные в геноме природы.

ТЕХНОЛОГИЯ СОЗДАНИЯ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРИРОДНЫХ МЕХАНИЗМОВ ДВОЙНОГО ОПОЛОДОТВОРЕНИЯ И ПЕРЕНОСА ДНК АГРОБАКТЕРИЯМИ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ И ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ

М.И. Чумаков, Е.М. Моисеева, Ю.С. Гусев, И.В. Волохина

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

В первой части доклада рассматриваются молекулярные механизмы агробактериальной трансформации и двойного оплодотворения у растений [1], лежащие в основе технологий создания трансгенных растений путем трансформации генеративных клеток [2]. Во второй части доклада приведены экспериментальные данные по созданию новой технологии введения агробактериальной Т-ДНК в клетки женского гаметофита кукурузы, используя природный механизм двойного оплодотворения, что позволяет получать трансгенные растения без стадии культуры тканей и регенерации [3], а также приведены примеры реализации разработанной технологии для изменения агрономически важных свойств растений [4]. В частности, изменение путей метаболизма пролина и белков, вовлеченных в процесс слияния мембран гамет кукурузы путем переноса бессмысловых конструкций фрагментов функциональных генов в составе агробактериальной Т-ДНК. Благодарности: работа частично поддержана грантом РФФИ 15-04-08413.

1. Чумаков М.И. Белковый аппарат, реализующий горизонтальный перенос Т-ДНК из агробактерий в эукариотические клетки (обзор) // Биохимия. 2013. Т. 78, вып. 12. С. 1670 – 1683.
2. Чумаков М.И., Моисеева Е.М. Технологии агробактериальной трансформации растений in planta // Биотехнология 2012. № 1. С. 8-20.
3. Великов В.А., Мамонтова Е.М., Волохина И.В., Чумаков М.И. Агробактериальная трансформация генеративных клеток кукурузы in planta // Биотехнология. 2010. №3. С.56-63.
4. Moiseeva Y.M., Velikov V.A., Volokhina I.V., Gusev Yu.S., Yakovleva O.S., Chumakov M.I. Agrobacterium-mediated transformation of maize with anti-sense suppression of the proline dehydrogenase gene by an in planta method // British Biotech. J. 2014. V.4. P.116-125.

БАКТЕРИАЛЬНЫЙ АДГЕЗИН RAPA1 КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ СОЗДАНИЯ АССОЦИАТИВНЫХ СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ DE NOVO

З.Р. Вершинина, Е.Ю. Антонова, А.М. Лавина, Л.Р. Нигматуллина, Ал.Х. Баймиев

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

Для создания новых ассоциативных симбиозов применяются различные подходы, в том числе и создание трансгенных растений, которые вырабатывают в корнях вещества, играющие ведущие роли на стадии узнавания макросимбионтом микросимбионта. Одним из таких веществ является белок-адгезин RapA1, участвующий в адсорбции бактерий на поверхности корневых волосков растений. Ранее кодирующая часть гена rapA1 (727 п.н.) была амплифицирована из ДНК штамма *R. leguminosarum* PVu5, выделенного из клубеньков фасоли обыкновенной, с помощью Pfu-полимеразы. Далее ген rapA1 был клонирован в бинарный вектор для трансформации растений pCambia1301 вместе с лидерным пептидом (110 п.н.) гена лектина гороха посевного psI под управлением конститутивного 35S промотора вируса мозаики цветной капусты. В проведенных экспериментах были получены трансгенные растения табака, стабильно продуцирующие белок RapA1, что было, в том числе, доказано с помощью Вестерн-блот анализа белков. Кроме того, проведен иммунофлуоресцентный анализ, показывающий локализацию целевого белка RapA1 на поверхности корней трансгенного табака. Далее проводили проверку адгезии бактерий к корневым волоскам трансгенных растений. Для этого корни растений табака, трансгенных по гену rapA1, а также контрольных растений, в возрасте одного месяца инокулировали ризобиями *R. leguminosarum* TPr4 (штамм, выделенный из клубеньков клевера лугового) или *E. coli* XL1-Blue. Данные штаммы предварительно маркировали красным флуоресцентным белком (RFP). После инкубации корней с бактериями (24 часа) проводили подсчет числа адгезированных клеток на корнях контрольных и трансгенных растений. Анализ показал, что на корнях растений табака, трансгенных по гену rapA1, сорбировалось в среднем в 10 раз больше бактерий *E. coli*, по сравнению с контрольными растениями, а количество адгезированных бактериальных клеток *R. leguminosarum* увеличилось в 2 раза. Полученные данные не оставляют сомнений в том, что бактериальный адгезин RapA1 из *R. leguminosarum* возможно использовать в качестве инструмента для создания ассоциативных симбиотических систем de novo. При этом спектр штаммов не ограничивается ризобиями, так как данный адгезин не обладает строгой специфичностью по отношению к данным микросимбионтам.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АТФ-МЕТРИИ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИНЫ БЦЖ В ЦЕЛЯХ УЛУЧШЕНИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПРОДУКЦИИ

Г.Ю. Ломакина, Н.Н. Угарова *Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова; ООО «Люттек», Москва, Россия*

Вакцина БЦЖ, медицинский препарат на основе живого аттенуированного штамма *Mycobacterium bovis*, широко используется во всем мире для иммунопрофилактики туберкулеза. Основным показателем качества вакцины является специфическая активность – численность живых микроорганизмов или жизнеспособность. В настоящее время контроль качества осуществляется с использованием трудоемких и плохо воспроизводимых методов, длительность которых составляет 28–30 суток, что существенно осложняет производственный процесс. Оперативное определение специфической активности вакцинного штамма позволит стандартизировать контроль субстанции на всех стадиях ее производства и поддерживать постоянство качества конечного продукта. АТФ – основной метаболит живых клеток, в случае их гибели или повреждения быстро исчезает. БиOLUMиНесцентный метод определения АТФ, основанный на люциферазной реакции, является альтернативным и быстрым методом определения специфической активности микробных клеток по содержанию внутриклеточного АТФ. Достоинства метода – короткое время анализа, простота, хорошая воспроизводимость, высокая чувствительность, широкий линейный диапазон определяемых концентраций. Метод незаменим для анализа медленно растущих микроорганизмов, к

которым относится штамм *M. bovis*, а также клеточных агрегатов и биопленок. В данной работе разработан быстрый и надежный метод дифференцированного определения общего и внутриклеточного АТФ в жидкой субстанции вакцинного штамма БЦЖ (время анализа 10 мин) и в лиофилизованном конечном препарате (время анализа менее 2 часов, включая прободготовку образца). Показана эффективность применения апиразы для удаления внеклеточного АТФ, что позволило получить хорошую корреляцию между содержанием внутриклеточного АТФ и количеством живых клеток (КОЕ). Рассчитано удельное содержание АТФ в живой клетке, которое является чувствительным индикатором на любые стрессовые воздействия химической и физической природы. Метод позволяет быстро определять численность живых клеток в клеточной суспензии, оценивать их метаболический статус, содержание живых и разрушенных клеток на всех стадиях производства клеточной субстанции (культивирование клеток – сепарация – промывка) и готового лиофилизованного продукта (розлив – заморозка – лиофилизация – тестирование конечного препарата).

ЭКСПРЕССИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ФИТАЗЫ *PANTOEAGGLOMERANS* РАСТЕНИЯМИ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Л.Р. Валеева¹, Д.С. Трошагина¹, Ч. Нямсүрэн¹, М.Р. Шарипова¹, Е.В. Шакиров^{1,2} ¹Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия; ²Техасский университет в Остине, США

Проблема дефицита фосфора в питании растений и животных остается не решенной из-за отсутствия эффективных путей преодоления фосфорного недостатка. В то время как в окружающей среде содержание неорганических фосфатов, доступных для растений и животных, сокращается, в почве и донных отложениях идет накопление органических форм фосфора. Фитат составляет большую часть фосфора почв и семян растений, но не может быть усвоен вегетирующими растениями и животными и является серьезным фактором снижения их роста и развития. Однако свободный фосфат из фитата может быть получен благодаря действию специфических ферментов – фитаз, обнаруженных у микроорганизмов. Таким образом, использование фитаз бактерий представляет собой перспективный способ решения проблемы недостатка фосфора. Наряду с непосредственным использованием бактериальных фитаз как кормовых добавок, существует альтернативный путь экспрессии рекомбинантных фитаз растениями. Тем самым растения смогут расти на почвах с фитатом в условиях дефицита неорганического фосфата. Целью работы является получение растений *Arabidopsis thaliana*, синтезирующих активную бактериальную фитазу PaPhyC из *Pantoea agglomerans*. Нами получены гомозиготные линии растений *A. thaliana* с интегрированным геном фитазы. Ген фитазы экспрессируется растениями на уровне транскрипции и трансляции белка. Показана способность модифицированных растений расти на средах с фитатом в качестве единственного источника фосфора. При росте на среде с фитатом площадь листьев, диаметр листовой розетки, сухая масса побегов и корней, общее содержание фосфора в тканях модифицированных растений больше ($p < 0,05$), чем у контрольных растений. Фитазная активность модифицированных растений также выше в 2,6–2,9 раза ($p < 0,05$), чем у растений дикого типа. Таким образом, нами получены растения, экспрессирующие бактериальную фитазу и способные усваивать фосфор из труднодоступного фитата. Анализ полученных растений позволит разработать пути решения проблемы фосфорного дефицита растений и животных для повышения эффективности сельского хозяйства. Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержана грантом РФФИ 16-08-00583А.

ПРИМЕНЕНИЕ ТУБЕРКУЛИНА, КОНЬЮГИРОВАННОГО С НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА, ДЛЯ ВАКЦИНАЦИИ ЖИВОТНЫХ

Л.А. Дыкман, С.А. Староверов, А.С. Фомин, В.А. Богатырев

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

В работе предложены новые подходы к получению антител на туберкулин с использованием адъювантных свойств наночастиц золота. Данный подход позволил получить антитела, детектирующие 0,78 нг туберкулина. Были охарактеризованы специфичность и чувствительность полученных антител. Показано, что конъюгаты наночастиц золота с туберкулином влияют на дыхательную и бактерицидную активность перитонеальных макрофагов. Полученные антитела предложено использовать для иммунодиагностики микобактерий туберкулеза с использованием твердофазных, свето- и электронно-микроскопических методов. Предложенная стратегия получения антител на туберкулин с использованием наночастиц золота в качестве носителя и адъюванта, позволяет получить специфичные антитела, которые могут быть использованы в различных методах иммунодиагностики туберкулезной инфекции у животных и, возможно, у человека. Золотые наночастицы за счет проникновения во внутриклеточное пространство частично снимают токсический эффект оказываемый туберкулином на перитонеальные макрофаги крыс. Это способствует более активному развитию гуморальной реакции и выработке антител на туберкулин. Приведены результаты вакцинации конъюгатом наночастиц золота с туберкулином морских свинок. Конъюгат и раствор наночастиц вводили животным подкожно однократно (1 мл на животное). Контрольной группе животных вводили вакцину БЦЖ. Через 20 дней после последней инъекции у морских свинок проводили взятие крови для определения концентрации интерлейкинов и титра антител на туберкулин. Отмечено значительное повышение уровня выработки интерферона, IL-1 и IL-6 у животных, иммунизированных конъюгатом. Заражение животных проводили интраназально через 42 дня после взятия крови. Показан протективный эффект как конъюгата, так и (что удивительно) собственно наночастиц золота. В дальнейшем адъювантные свойства наночастиц золота планируется использовать для создания туберкулиновой противотуберкулезной вакцины.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИКАНЦЕРОГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

В.А. Устинов, А.Е. Студенников, В.А. Вавилов, И.С. Гребенщиков, К.В. Арнст, М.В. Костяно, В.А. Титов, Н.Е. Вержбицкая, А.Н. Глушков

Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН, Кемерово, Россия

Общепризнано, что 80–90% случаев онкологических заболеваний человека обусловлено действием химических канцерогенов из окружающей среды и особенностями образа жизни. Одной из групп таких химических канцерогенов являются по-

лициклические ароматические углеводороды (ПАУ), характерным представителем которых является бензо[а]пирен (БП). Анализ литературы дает основание утверждать, что индукция специфического иммунного ответа против ПАУ с помощью специфических антител (АТ) может приводить к угнетению патологического действия ПАУ и, как следствие, снижению онкологического риска. Те же самые АТ применимы для диагностики раковых заболеваний на ранних фазах развития. С целью дальнейшего использования АТ в клинике было получен спектр рекомбинантных АТ против ПАУ. Для этого были применены следующие биотехнологические подходы: скрининг конъюгатом БП с БСА фаговой наивной библиотеки человеческих АТ для получения идиотипических одноцепочечных АТ (АТ1). Из мышинной гибридомы была получена и клонирована ДНК АТ против ПАУ и было наработано мышинное одноцепочечное АТ1 в бактериях. Его использовали для скринирования той же фаговой библиотеки АТ для получения антиидиотипических одноцепочечных АТ (АТ2) против ПАУ. В результате получены уникальные АТ: одно мышинное АТ1, семь человеческих АТ1 и семь человеческих АТ2. Были построены компьютерные модели АТ1, модели взаимодействия ПАУ с АТ1 и модели взаимодействия между АТ1 и АТ2. На основании компьютерных данных были определены предполагаемые аминокислотные остатки АТ, участвующие в связывании с ПАУ и АТ. Мышиное АТ1, по два человеческих АТ1 и АТ2 были детально охарактеризованы и результаты работы опубликованы. Методом ИФА получены первичные данные по уровню АТ1 и АТ2 у мышей, иммунизированных БП, и в сыворотках больных раком легкого в сравнении со здоровыми людьми.

Работа выполнена по Госзаданию № 0355-294-0001 и по гранту РНФ № 76.00.00.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИОКСИНОВ И ДИОКСИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ В ТКАНЯХ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ DR CALUX®

Е.Н. Зарудная, К.С. Прокушина

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина, Москва, Россия

Химическое загрязнение окружающей среды оказывает вредное влияние на экосистемы, здоровье людей и животных. Особую тревогу вызывают стойкие органические загрязнители, входящие в группу опасных ксенобиотиков, диоксины (ДО) и диоксиноподобные вещества (ДПВ). К ним относится обширная группа полихлорированных полициклических соединений: дибензо-п-диоксины, дибензофураны и бифенилы, образующихся в качестве побочного продукта отдельных видов промышленности. Нормы допустимого поступления ДО/ДПВ в среду обитания и организм устанавливают на основании токсикологических исследований. ДО/ДПВ – кумулятивные яды высокой липофильности, накапливающиеся, прежде всего в гепатоцитах и адипоцитах. С продуктами животного происхождения данные токсиканты легко попадают в организм человека. Материалом для исследований служили пробы печеночной и мышечной ткани, полученные непосредственно после убоя 30 клинически здоровых бычков черно-пестрой породы массой около 500 кг, принадлежащих ЗАО "Воскресенское" МО. ДО/ДПВ определяли на базе ФГБУ ЦНМВЛ по методу DR CALUX®, позволяющему исследовать широчайший спектр матриц в сжатые сроки, с высокой производительностью, точностью и чувствительностью. Принцип метода DR CALUX® основан на использовании специализированных генно-модифицированных клеток опухоли печени крысы со встроенным геном светлячка. ДО связываются в клетке с цитоплазматическим арилгидрокарбоновым рецептором, образовавшийся комплекс переносится в ядро и взаимодействует со специфической последовательностью ДНК. Это запускает процесс экспрессии генов фермента люциферазы. Затем клетки лизируют, освобождая тем самым люциферазу, и добавляют пигмент люциферин. Он инициирует свечение люциферазы, интенсивность которого пропорциональна содержанию диоксинов в исследуемой пробе. В результате эксперимента было показано, что в исследованных пробах мышечной ткани содержание ДО/ДПВ колеблется в пределах от 0,84 до 2,73 нг ТЭК ВОЗ/кг жира (при норме 4,0 нг ТЭК ВОЗ/кг жира); в исследуемых пробах печени – в пределах от 0,67 до 6,89 нг ТЭК ВОЗ кг жира (при норме 10 нг ТЭК ВОЗ/кг жира). Во всех исследуемых пробах содержание диоксинов и ДПВ сопоставимо с нормативными, утвержденными регламентом комиссии ЕС №1259/2011.

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ (проект №14-16-00046).

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО ОДНОЦЕПОЧЕЧНОГО ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО АНТИИДИОТИПИЧЕСКОГО АНТИТЕЛА К ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИМ АРОМАТИЧЕСКИМ УГЛЕВОДОРОДАМ

К.В. Арнст, А.Е. Студенников, В.В. Морозова, Н.В. Тикунова, А.Н. Глушков, В.А. Устинов

Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН, Кемерово, Россия

Антиидиотипические антитела (АТ2) специфичны к активным центрам идиотипических антител (АТ1), могут функционально и структурно заменять антиген и вызывать иммунный ответ. На этом основано использование АТ2 и создание противоопухолевых вакцин. Например, предлагается применять антиидиотипические антитела для иммунизации больных при раке яичников, при раке толстого кишечника, при меланоме. Для снижения иммунореактивности и неспецифического иммунного ответа чаще используют одноцепочечные антитела (scFv). Целью данной работы было получение человеческого АТ2 scFv к полициклическим ароматическим углеводородам (ПАУ) в частности к бензо[а]пирену (БП), как наиболее представителю члену семейства ПАУ, канцерогенов, образующегося при пиролизе органических соединений. В дальнейшем предполагается использовать АТ2 scFv БП для создания иммунно профилактических и иммунно диагностических препаратов и тест-систем. В ходе скринирования наивной фаговой библиотеки, созданной из лимфоцитов здоровых людей, мы получили антиидиотипическое одноцепочечное антитело к БП, названное В5. Анализ нуклеотидной и аминокислотной последовательностей В5 показал, что оно является уникальным и не похожим на известные антитела. В5 было экспрессировано двумя способами: с белком-носителем целлюлоза связывающим доменом и с His-хвостами. Первое очищено на целлюлозе, второе – на Ni-смоле. С помощью иммуноферментного анализа показано, что В5 связывало моноклональные, поликлональные, мышинные и человеческие одноцепочечные рекомбинантные антитела, специфические к БП, в прямом и конкурентном ИФА. На основании этого было доказано, что В5 является антиидиотипическим антителом и связывает активный центр идиотипических антител против БП. Нами была предложена модель связывания В5 с антителами к БП.

Работа выполнена по Госзаданию № 0355-294-0001 и по гранту РНФ № 76.00.00.

БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕСТЕРОИДНЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ В БИОРЕЛЕВАНТНЫХ СРЕДАХ

А.В. Кривошей, В.И. Бархатов, О.А. Пономарева, И.С. Филимонов, П.В. Вржеш

Международный учебно-научный биотехнологический центр, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) являются сильнодействующими биологически активными агентами. По объёму мирового потребления НПВП занимают одно из первых мест среди лекарственных препаратов. Применение НПВП в производстве продуктов питания животного происхождения требует контроля их уровня в кормах для животных, в тканях и жидкостях самих животных. Вследствие роста производства неизбежным является накопление НПВП в окружающей среде, и становится актуальным определение этих ксенобиотиков в почвах, речном иле, других природных средах. Всё это объясняет актуальность задачи по разработке тестов для определения НПВП в средах сложного состава. Современные методы определения НПВП (хроматография, масс-спектрометрия, спектрофотометрия, флуориметрия) основаны на их физико-химических свойствах. Однако концентрация НПВП далеко не всегда коррелирует с их биологической активностью, к тому же для каждого вещества требуется отдельная методологическая и приборная база. Биологической мишенью действия НПВП в организме млекопитающих является фермент простагландин-Н-синтаза (PGHS). НПВП ингибируют циклооксигеназную реакцию PGHS с высокой селективностью. Специфичность реакции создаёт предпосылки к разработке универсального биокаталитического метода определения НПВП в средах сложного состава. В настоящем исследовании разработана методика определения индометацина (в диапазоне концентраций 0,1–0,7 мкМ), напроксена (0,2–1 мкМ) и ибупрофена (1–5 мкМ) в аналогах кишечных (SIF, FaSSIF, FeSSIF) и желудочных (SGF, FaSSGF, FeSSGF) сред человека, а также в крови млекопитающих и коровьем молоке. Методика является достаточно чувствительной, позволяет оценить концентрацию для известных ингибиторов и может быть применена для различных сред сложного состава. К преимуществам данной методики можно отнести то, что, даже если мы заранее не знаем, какой конкретно ингибитор находится в образце, то можно измерить воздействие этого ингибитора на биологическую мишень.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-04-00737 А.

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ИНГИБИТОРА СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ ИЗ ГРЕЧИХИ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА И ИХ СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА

Н.В. Хадеева¹, Е.Ю. Яковлева¹, К.В. Сидорук², В.Г. Богущ², Я.Е. Дунаевский³, М.А. Белозерский³

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН; ²Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов; ³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Проводили скрининг коллекций трансгенных растений табака сорта Самсун с защитным геном ингибитора сериновых пептидаз из семян гречихи BWI-1a в составе векторных конструкций разного дизайна и их семенного потомства F1, F2 и F3. Конструкции содержали либо 1 ген ингибитора сериновых пептидаз (ISP), либо тот же ген с двумя или четырьмя генами спидроина (белка паутины паука) в прямой и обратной ориентации в качестве возможного энхансера. Отмечены затруднения в процессе регенерации растений, трансформированных векторной конструкцией с 4-мя повторами гена спидроина. Анализ полученных семян на сохранение трансгенной вставки с помощью ПЦР и высева на среду с канамицином всех проанализированных линий показал наличие/сохранение трансгенной вставки. Методом мультиплексной ПЦР показано сохранение экспрессии целевого гена даже через 10 лет пассирования растений в асептической культуре без селективного давления, полученном из них каллусе, а также семенном потомстве, по крайней мере, в течение трех поколений. Экстракты тканей трансгенных растений всех вариантов подавляли в опытах *in vitro* рост фитопатогенных бактерий (*Pseudomonas syringae*, *Erwinia carotovora*, *Clavibacter michiganensis*) и прорастание спор грибов (*Alternaria alternata*, *Aspergillus nidulans*). Степень подавления патогена не снижалась в поколениях. Все проанализированные линии трансгенных растений табака с геном ингибитора сериновых протеиназ (ISP) из гречихи были более устойчивы к действию грибной инфекции – фузариозному увяданию (*Fusarium oxysporum*). Разницы в степени фитопатогенной активности тканей между исходными линиями и линиями с 2-мя и 4-мя генами спидроина не выявлено. В настоящее время проводится анализ семенного потомства F4 5 трансгенных линий табака и фитопатогенной активности трансгенных растений коллекции в опытах *in vivo*. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 15-04-08523).

СОЗДАНИЕ РАСТЕНИЙ-БИОРЕАКТОРОВ ДЛЯ ПРОДУКЦИИ БЕЛКОВ-ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ ПТИЦ И МЛЕКОПИТАЮЩИХ

В.В. Емельянов, М.С. Бурлаковский, М.В. Падкина, Л.А. Лутова

Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Использование растительных систем в качестве биореакторов приобретает все большее значение в современной биотехнологии. С помощью трансгенных растений получают множество веществ, в том числе используемых в фармацевтике. Преимуществом растений являются биобезопасность продукта и меньшие затраты на его производство по сравнению с традиционными биопродуцентами – микроорганизмами и клеточными культурами. Одним из перспективных направлений в получении растений-продуцентов является создание “съедобных вакцин и адъювантов” на основе гетерологичных антигенов и иммунорегуляторных цитокинов. Подобные биопродуценты можно непосредственно использовать в пищу, избегая дорогостоящей процедуры очистки целевого белка. На кафедре генетики и биотехнологии СПбГУ проводятся исследования по получению растений-продуцентов, синтезирующих γ -интерфероны птиц и млекопитающих, обладающих антивирусной, антимикробной, противоопухолевой и иммуномодулирующей активностью, что обуславливает возможность его широкого применения в медицине и ветеринарии. Нами получены линии-продуценты трансгенного табака с постоянной экспрессией гена *Bt-sIFNG*, кодирующего γ -интерферон быка. Исследования показали стабильное наследование и экспрессию целевого гена, а также биологическую активность белка в ряду 6 поколений самоопыления. Мы также продолжаем создание “съедобных адъювантов” на основе культур моркови и гороха с орган-специфичной экспрессией укороченных генов γ -интерферонов курицы и быка, продукты которых устойчивы к протеолизу. Для этих целей модифицирован С-конец молекул интерферонов курицы и быка, а также клонированы промоторы генов гороха, кодирующих запасные белки бобовых – вицилин и леугмин, а

также промотор гена *IbSRD1* батата, обеспечивающий корнеспецифичную экспрессию. Подобные трансгенные растения планируется использовать в качестве съедобных иммунотерапевтических кормовых добавок во время проведения ежегодных профилактических мероприятий совместно или вместо вакцинаций. *Работа поддержана грантом СПбГУ 1.38.229.2014.*

ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ И ГРИБНЫХ МЕТАБОЛИТОВ НА УДЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ СУПЕРОКСИДИСМУТАЗЫ И КАТАЛАЗЫ *E. coli*

Н.Е. Павловская, И.А. Гнеушева, И.Ю. Солохина, А.В. Лушников, О.А. Маркина, М.А. Полякова

Орловский государственный аграрный университет, Орёл, Россия

Актуальным направлением для животноводства является создание биологически активных добавок на основе метаболитов микроорганизмов и растений, обладающих не только кормовыми достоинствами, но и лечебно-профилактическими свойствами. Нами выделены и исследованы вторичные метаболиты овса посевного (*Avena sativa* L.) – тритерпеновые гликозиды, к которым относится авенацин ($C_{55}H_{83}NO_{21}$), найденный в корнях. В зерне ячменя (*Hordeum vulgare* L.) обнаружен гордецин ($C_{25}H_{39}O_7N$), сосредоточенный в алейроновом слое и оболочке. Не меньший интерес представляют полифенольные соединения гречихи (*Fagopyrum esculentum*) – биофлавоноиды, обладающие высокой биологической активностью. Из них получена субстанция, содержащая комплекс рутина и его производных, закрепленная под торговой маркой «РутиФлав». К метаболитам, широко используемым для защиты растений от патогенов, относятся и вещества, выделенные из грибов рода *Trichoderma*. Определяли удельную активность супероксиддисмутазы КФ 1.15.1.1 и каталазы КФ 1.11.1.6 *E. coli* ATCC 25922 под действием водно-спиртовых растворов авенацина, гордецина и биофлавоноидов и спиртового раствора вторичных метаболитов гриба рода *Trichoderma*. Исследования показали, что растворы биофлавоноидов гречихи и грибных метаболитов обладают наибольшим прооксидантным действием, что подтверждается увеличением активности супероксиддисмутазы и каталазы. На основе указанных метаболитов создаются экологически безопасные кормовые добавки, способные корректировать уровень микрофлоры желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных.

СОЗДАНИЕ РАСТЕНИЙ С ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К БАКТЕРИАЛЬНЫМ ПАТОГЕНАМ ЗА СЧЕТ ИНГИБИРОВАНИЯ ФУНКЦИЙ ОТДЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ РНК-АПТАМЕРАМИ

И.А. Абдеева, Л.Г. Малошенок, М.В. Мокрякова, С.А. Брускин

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

В данной работе предлагается оригинальный подход для повышения устойчивости растений-продуцентов к фитобактериальному заражению путем ингибирования функций отдельных белков-эффекторов патогенных бактерий РНК-аптамерами. Фитопатогенные бактерии способны подавлять как основной, так и индуцированный иммунитет растений за счет секретируемых внутрь растительной клетки факторов вирулентности – Avr(авируленс)-белков или белков-эффекторов. Ингибирование функций бактериальных белков-эффекторов может повысить устойчивость растений к заражению. Аптамеры – это молекулы односторонней РНК или ДНК, которые связывают избранную мишень с высокой аффинностью и специфичностью за счет своей вторичной и третичной структур. Аптамеры к белкам часто связываются в функционально важных участках молекулы и таким образом осуществляют ингибирование активности белков-мишеней. Была доказана эффективность применения такого подхода в других системах (например, в качестве терапевтических агентов для человека). В связи с этим снижение или подавление функциональной активности белков-эффекторов в растениях-продуцентах за счет физического взаимодействия с РНК-аптамером представляется оригинальным и эффективным методом. В качестве модельного растения нами были использованы полученные ранее трансгенные растения табака *N. bentamiana*, конститутивно экспрессирующие зеленый флюоресцентный белок GFP. Нуклеотидная последовательность РНК-аптамера, ингибирующего активность белка GFP, была взята из литературных источников. Аптамер против GFP был клонирован в растительный экспрессионный вектор рXCN. Получен агробактериальный штамм, несущий векторную конструкцию рXSN-Apt_GFP, который использовали для проведения агробактериальной инфильтрации GFP-экспрессирующих трансгенных растений *N. bentamiana*. На 2-ой день после инфильтрации путем микроскопического исследования было отмечено снижение интенсивности свечения белка GFP в листьях проанализированных растений, что свидетельствует о взаимодействии РНК-аптамера и белка GFP *in vivo*. Проведенный анализ подтверждает возможность применения нашего подхода для усиления иммунитета растений. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-04-01002 А.*

ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ КОНТРОЛЯ СОДЕРЖАНИЯ АНТИБИОТИКОВ В МОЛОКЕ И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ

Н.А. Таранова, А.Н. Берлина, Е.А. Зверева, Н.А. Бызова, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологий» РАН, Москва, Россия

Определение содержания антибиотиков, широко используемых в ветеринарной практике, играет важную роль при контроле качества пищевой продукции. Избыточное потребление антибиотиков приводит к аллергическим реакциям, дисбактериозу, развитию устойчивых штаммов бактерий. В этой связи крайне востребованными становятся иммунохроматографические тесты, позволяющие контролировать содержание антибиотиков в продуктах питания во внелабораторных условиях, без дополнительных приборов и реагентов. Разработаны иммунохроматографические тест-системы для определения в молоке и молочных продуктах антибиотиков: хлорамфеникола, стрептомицина, тетрациклина, представителей фторхинолонов. В качестве маркеров использовались наночастицы золота. Время детекции анализов с помощью предложенных тест-систем не превышает 15 мин. Тест-система для детекции хлорамфеникола позволяет определять антибиотик с пределом обнаружения 2,4 нг/мл и рабочим диапазоном 8,7–214 нг/мл. Порог детекции левофлоксацина с помощью разработанной тест-системы составляет 0,1 нг/мл, ципрофлоксацина – 0,05 нг/мл. Тест-система для определения тетрациклина позволяет детектировать антибиотик в концентрациях выше 20 пг/мл. С целью повышения чувствительности иммунохроматографического анализа были использованы альтернативные маркеры – квантовые точки (полупроводниковые наноструктуры CdSe/ZnS). При их применении предел обнаружения хлорамфеникола достигает 0,1 нг/мл, рабочий диапазон количественного определения содержания антибиотика – 0,2–20 нг/мл. Предел детекции стрептомицина – 0,2 нг/мл, офлоксацина – 0,3 нг/мл. Время анализа

составляет 15 мин. Использование флуоресцентного маркера обеспечило в среднем 20-кратное снижение пределов детекции антибиотиков. Разработанные иммунохроматографические тест-системы для детекции антибиотиков позволяют получать качественные и количественные результаты, при этом погрешность анализа не превышает 15%. Данные тестирования проб молока в высокой степени коррелируют с результатами иммуноферментного анализа (коэффициент корреляции 0,95–0,98). Аналитические характеристики предложенных тест-систем позволяют применять их в соответствии с отечественными и зарубежными санитарно-эпидемиологическим нормативами. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-16-00149).*

ВЛИЯНИЕ ПРОДУКТОВ ПЧЕЛОВОДСТВА НА КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКУЮ ХАРАКТЕРИСТИКУ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ НОСОВЫХ РАКОВИН КОЗЫ

Е.Д. Тимотиевич, Р.В. Белоусова

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, Москва, Россия

Было изучено влияние маточного молочка (ММ) и 10-гидрокси-2Е-деценной кислоты (10-ГДК), как его компонента, на культурально-морфологические показатели новой диплоидной культуры клеток эпителия носовых раковин козы. Обязательным условием культивирования данной культуры на ранних пассажах было наличие в питательной среде фактора роста, полученного из четверохолмия головного мозга быков. По имеющимся данным, культура на ранних пассажах могла пройти лишь 3 пересева на среде без добавления ростового фактора, затем гибла. Поэтому нами были проведены серии опытов по испытанию биологически активных продуктов пчеловодства на данной культуре в целях изучения их действия. Основная серия опытов проводилась в 24-лучночных планшетах, где клетки культивировали на протяжении трёх пассажей в средах с добавлением различных концентраций ММ и 10-ГДК. Опыт провели в трёх повторениях. В результате проведённых исследований, было выявлено, что наибольшая концентрация (0,015%) как ММ, так и 10-ГДК в питательной среде оказала токсическое действие на данную культуру клеток при длительном пассировании, что проявляется в неполном формировании монослоя к третьим суткам (70%) и сниженным индексам пролиферации ($1,9 \pm 0,11$), по сравнению с контролем. Действие малых доз (0,00015%) тех же веществ на данную культуру клеток на протяжении всех 3-х пассажей было положительным, о чём свидетельствуют индексы пролиферации (10-ГДК: $2,85 \pm 0,01$; ММ: $3,20 \pm 0,18$) и процент формирования монослоя на третьи сутки (100%). Проведенные исследования культуры клеток эпителия носовых раковин козы позволили заключить, что ММ и 10-ГДК не оказывают влияния на цитогенетические показатели клеток данной культуры, а также не влияют на время действия и титр вирусов респираторно-синцитиальной инфекции (штамм 375 Lehmkuhl) и вируса диареи КРС (штамм ВК-1). На основании анализа полученных нами данных, мы полагаем, что присутствие низких концентраций маточного молочка и 10-гидрокси-2Е-деценной кислоты в питательной среде, может быть использовано в качестве замены ростового фактора, процесс получения которого трудоёмкий, для культуры клеток эпителия носовых раковин козы на протяжении нескольких пассажей.

НОВЫЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВНЕЛАБОРАТОРНОГО МОНИТОРИНГА МИКОТОКСИНОВ В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПРОДУКЦИИ

А.Е. Урусов, А.В. Петракова, М.К. Губайдуллина, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Микотоксины, токсичные метаболиты плесневых грибов, являются приоритетными контролируемыми контаминантами пищевой продукции. Современный массовый контроль безопасности продуктов питания и кормов требует внедрения в практику простых, дешёвых, экспрессных и чувствительных методов детекции токсикантов. Крайне перспективным аналитическим средством для таких скрининговых тестирований является иммунохроматография, однако она обычно уступает альтернативным методам по чувствительности. Для преодоления этого ограничения разработан новый формат иммунохроматографического анализа, в котором стадии специфического взаимодействия антиген–антитело и выявления образовавшегося иммунного комплекса разделены благодаря использованию нативных специфических антител и меченых наночастицами золота антивидовых антител. Отказ от применяемого в традиционной иммунохроматографии прямого конъюгирования маркера со специфическими антителами (когда на частице иммобилизуются десятки–сотни иммуноглобулинов) исключает их непродуктивное связывание с аналитом пробы. В новой схеме все взаимодействия с определяемым соединением приводят к снижению связывания метки, что сдвигает рабочий диапазон анализа в область более низких концентраций. Показано, что применение данного формата анализа приводит к 10-20-кратному (по сравнению с традиционными решениями) снижению пределов обнаружения микотоксинов – например, для зеараленона до 7 нг/г, для афлатоксина В1 до 3,2 нг/г. При этом продолжительность тестирования проб не превышает 20 минут, а результаты могут оцениваться визуально, т. е. модификация метода не ограничивает его применение для экспрессного внелабораторного тестирования. По представленной схеме разработаны тест-системы для детекции основных контролируемых микотоксинов – афлатоксина В1, охратоксина А, зеараленона, фумонизина, дезоксиниваленола и Т2-токсина. Их апробация при контроле проб кукурузы показала полноту выявления аналитов не ниже 90%. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности разработанных тест-систем как средств контроля контаминации микотоксинами сельскохозяйственной продукции, кормов и продуктов питания. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-14-01131).*

БЕЗОПАСНОСТЬ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

А.Б. Иванова, Л.Ю. Карпенко *Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, Санкт-Петербург, Россия*

Безопасность пищевой продукции является ключевым моментом для поддержания здоровья населения. В настоящее время наиболее актуально наличие высококачественных безопасных продуктов питания, произведенных на территории Российской Федерации. Материал для исследований отобран в ООО «Сумской лососево-сиговый питомник» в Кингисеппском районе Ленинградской области. Отбор проб производился 4 раза за год: весной, летом, осенью и зимой, каждый раз отбиралось по 10 тушек самок радужной форели в возрасте 4–5 лет живой массой около 1,5 кг. Рыба содержится в огороженных садках в естественном водоеме – Сумском водохранилище. Характер водоснабжения родниковый (скорость 3–5 м³/с), содер-

жание кислорода не опускается ниже 9 мг/л, pH воды составляет 7–8,2. Параллельно проводился общий физико-химический анализ воды Сумского водохранилища. Исследования проводились на базе аккредитованного испытательного лабораторного центра ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург» в соответствии с нормативными документами. Анализируя полученные данные, отмечаем, что содержание тяжелых металлов (свинца и кадмия) не превышает установленные нормы ни в один из сезонов. Содержание железа наименьшее в осенний период, максимальное значение отмечается в зимний период. Содержание марганца минимально в осенний период, максимальных значений достигает в летний период. Содержание меди варьируется в зависимости от сезона года, достигая наибольшего значения весной, наименьшего зимой. Максимальное содержание цинка наблюдается в зимний период, минимальное – весной. Питательные вещества, такие как жир и белок, также имеют зависимость от сезона года. Массовая доля белка максимальна в зимний период, массовая доля жира в летний период, в то время как минимальные значения для обоих показателей выявлены весной. Данные изменения связаны как с различными стадиями выращивания, так и с изменениями погодных условий и, как следствие, изменениями состава воды в водоеме, в котором содержится рыба. Таким образом, проведенные исследования показали, что содержание металлов, жира и белка в тушах радужной форели зависит от сезона года, достигая оптимального соотношения в осенний период.

БИОКАТАЛИЗАТОРЫ С АКТИВНОСТЬЮ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ЛИПАЗЫ ДЛЯ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕЭТЕРИФИКАЦИИ ТРИГЛИЦЕРИДОВ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ

Г.А. Коваленко, Л.В. Перминова, А.Б. Беклемишев *Институт катализа СО РАН, Новосибирск, Россия*

В последнее время пристальное внимание уделяется изучению процессов получения метиловых или этиловых эфиров жирных кислот (биодизель, витамин F) путем ферментативной переэтерификации растительных масел. Для этого используют реагенты – C1-C2 спирты, метил- или этил- ацетаты. Биокатализатором в данном процессе является иммобилизованная липаза. Процесс переэтерификации протекает при 40–50°C в безводной среде, содержащей также органические растворители – гексан, трет-бутанол. Поиск эффективного биокатализатора, а также подбор оптимального состава реакционной среды (масло, реагент, растворитель) представляет непростую научно-практическую задачу. Данная работа посвящена разработке и исследованию эффективных биокатализаторов с активностью термостабильной липазы, а также поиску оптимального состава реакционной среды для проведения процессов переэтерификации растительных масел в эфиры жирных кислот с участием этанола или этил ацетата. Биокатализаторы приготовлены (1) путем включения клеточных лизатов рекомбинантного штамма *E.coli*/lip, продуцирующего липазу из *Thermomyces lanuginosus*, в ксерогель диоксида кремния и его наноглерод-содержащие композиты [1], а также (2) путем адсорбции рекомбинантной липазы из *T. lanuginosus* на макропористом силикагеле и его композитах с поверхностным слоем наноструктурированного углерода. Биокаталитические процессы переэтерификации триглицеридов исследованы как в периодическом реакторе смешения, так и в непрерывном реакторе с неподвижным слоем биокатализатора. Изучена кинетика реакции переэтерификации, оценены константы Михаэлиса (KM) для триглицеридов, этанола и этилацетата. В результате проведенных исследований показано, что этил ацетат является оптимальным ацилирующим реагентом в реакции переэтерификации подсолнечного и льняного масел. В отличие от этанола, этот реагент не инактивирует приготовленные биокатализаторы в течение >1000 ч работы. Константа KM для триглицеридов составляет 0,02 М, для этил-ацетата – 0,75 М. В изученных условиях при мольном соотношении субстрата (подсолнечного масла) и реагента (этил ацетата), равном 1:(20÷25), время полуинактивации биокатализаторов равно более 700 ч при 40°C.

1. Kovalenko G.A., Beklemishev A.B., Perminova L.V. et al. // J.Mol.Catal. B: Enzym. 2013. V. 98. P. 78–86.

THERMO FISHER SCIENTIFIC: СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ

Н.М. Новожилова *Thermo Fisher Scientific*

Синтетическая биология объединяет молекулярную и системную биологию с инженерными принципами, предоставляя ученым новые возможности в проведении молекулярно-генетических исследований. Thermo Fisher Scientific в течение 20 лет разрабатывает уникальные продукты и технологии для геной инженерии. Наши решения включают в себя синтез генов *de novo*, модулирование экспрессии генов с помощью RNAi и, самые последние технологии, GeneArt Precision TALs и CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat). Все необходимое, чтобы отвечать на самые сложные вопросы, которые ставит перед нами природа.

БИОКАТАЛИЗАТОРЫ С АКТИВНОСТЬЮ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ЛИПАЗЫ ДЛЯ СИНТЕЗА СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Л.В. Перминова, Г.А. Коваленко, В.Л. Кузнецов

Институт катализа СО РАН; Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Иммобилизованные липазы находят широкое применение в основном и тонком органическом синтезе, благодаря уникальной способности фермента катализировать в неводных средах различные реакции – переэтерификацию, этерификацию, ацидолиз, алкоголиз, аммонолиз. По сравнению с химическими, процессы с участием биокатализаторов, приготовленных на основе иммобилизованных ферментов, не требуют высоких температур и давления, в них отсутствуют агрессивные и токсичные соединения. Следовательно, такие процессы удовлетворяют всем требованиям «зеленой» химии. Уникальная специфичность фермента обеспечивает высокий выход целевого продукта и низкое содержание побочных соединений, что упрощает очистку. В данной работе систематически исследованы биокатализаторы с активностью рекомбинантной липазы из *Thermomyces lanuginosus*, приготовленные путем адсорбции фермента на поверхности носителей, различающихся химической природой в следующем ряду: макропористый силикагель – наноглерод-силикатные композиты разного строения, в том числе «коричневые» адсорбенты – углеродный аэрогель, полученный из углеродных нанотрубок. Приготовленные биокатализаторы были изучены в реакции этерификации жирных кислот (масляной, каприновой, стеариновой) и спиртов (изопропилового, изо-амилового) с образованием соответствующих сложных эфиров. Исследовано влияние длины цепи кислоты и спирта на скорость этерификации, изучена кинетика Михаэлиса–Ментен, а также определена операционная стабильность приготовленных биокатализаторов в реакции синтеза изо-амилкаприната. В результате проведенных исследований показано,

что свойства (активность и стабильность) приготовленных биокатализаторов в значительной степени зависят от химической природы адсорбентов. Так, величина адсорбции липазы на силикагеле на порядок меньше, чем на углеродном аэрогеле. В то же время, активность биокатализатора и удельная активность липазы, адсорбированной на силикагеле и его композитах, в несколько десятков раз выше, чем на углеродном аэрогеле. Приготовленные биокатализаторы отличаются высокой стабильностью в реакции этерификации. В изученных условиях биокатализатор, приготовленный путем адсорбции липазы на углеродном аэрогеле, полностью сохранил активность после 1090 час в реакции синтеза изоамилакарпината при 40°C.

ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ ДЕСТРУКЦИИ НЕКРАХМАЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

А.П. Сеницын^{1,2}, А.М. Рожкова¹, И.Н. Зоров^{1,2}, Д.А. Мерзлов^{1,2}, О.А. Сеницына², Е.Г. Кондратьева¹, О.Г. Короткова¹

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха;

²Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Злаковые культуры широко применяются для производства кормов, используемых в птицеводстве и животноводстве. Однако, эти источники питательных веществ содержат некрахмальные полисахариды (НПС) – целлюлозу, β-глоканы, ксиланы, которые отрицательно влияют на переваримость корма. Карбогидразы разрушают растворимые и нерастворимые в воде НПС, высвобождают инкапсулированные питательные вещества, увеличивают скорость продвижения корма и делают растительные клеточные компоненты более доступными для собственных пищеварительных ферментов животных и птицы, поэтому ферментные препараты карбогидраз находят широкое применение в качестве кормовых добавок при кормлении сельскохозяйственных животных и птиц. На платформе экспрессионной системы гриба *Penicillium* sp. созданы новые высокопродуктивные рекомбинантные штаммы микроорганизмов – продуцентов комплекса кормовых ферментных препаратов нового поколения в состав которых входит сбалансированный комплекс ферментов карбогидраз (имеющий пониженное содержание «балластных» с точки зрения кормового применения ферментов), обладающих высокой молекулярной активностью по отношению к НПС зерна злаковых культур, повышенной стабильностью к воздействию высокой температуры, применяемой при гранулировании комбикормов и не подверженным ингибированию белковых ингибиторов зерна злаков. *Работа выполнена в соответствии с Государственным заданием по теме «Создание высокоактивных ферментных комплексов целлюлаз и гемицеллюлаз, а также ферментов негидролитической природы, усиливающих гидролитическое действие карбогидраз, для превращения в сахара, спирты и органические кислоты углевод-содержащих отходов промышленности и сельского хозяйства» (Номер государственной регистрации 01201351359).*

EXTREMOPHILIC ENZYMES AND APPLICATIONS IN INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY

Jennifer Littlechild

Henry Wellcome Building for Biocatalysis, College of Life and Environmental Studies, University of Exeter, Stocker Road, Exeter, EX4 4QD, UK

There is an increasing demand for new thermostable enzymes with enhanced performance and/or novel functionalities that provide savings in time, money and energy for industrial processes in the areas of high value chemical production and other "white" biotechnology applications. Two projects HOTZYME and THERMOGENE have been carried out to identify novel hydrolase and transferase enzymes respectively from microorganisms inhabiting naturally hot environments.

A selection of these identified 'high priority' enzymes and their applications for industrial applications will be discussed. These include carboxylesterases (1-3), lactonases (4), aminoacylase (5), epoxide hydrolases (6), transaminases (7) and transketolases. These enzymes have been identified in thermophilic genomes and metagenomes and have been cloned and over-expressed in *Escherichia coli*.

The biochemical and structural properties of the enzymes have been determined in order to understand their stability and potential applications for commercial biocatalysis.

1. Sayer, C, Isupov, M.N, Bonch-Osmolovskaya, E and Littlechild, J. (2015) *Febs Journal*, 282, 2846-2857.
2. Sayer C, Szabo Z, Isupov MN, Ingham C, Littlechild J.A. (2015). *Front. Microbiol.* 11, 1294
3. Sayer C, Finnigan W, Isupov M, Levisson M, Kengen S, van der Oost J, Harmer N, Littlechild J A. (2016) *Scientific Reports*, 6, 25542.
4. Kallnik V, Bunescu A, Sayer C, Bräsen C, Wohlgemuth R, Littlechild J, Siebers B. (2014) *J. Biotechnology*, 190, 11-17.
5. Littlechild, J.A. *Archaea*. (2015), 147671
6. Ferrandi, E, Sayer, C, Isupov, M, Annovazzi, N, Marchesi, C, Lacobone, G, Peng, X, Bonch-Osmolovskaya, E, Wohlgemuth, R, Littlechild, J and Monti, D. (2015) 282, 2879-2894.
7. Sayer, C, Bommer, M, Isupov, M, Ward, J. and Littlechild, J. (2012) *Acta Cryst. D*68, 63-72.

MODULATION OF ENZYME FUNCTIONAL PROPERTIES

D.A. Suplatov, N.K. Panin, K.E. Kopylov, V.K. Švedas *Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

Modulation of enzyme functional properties is one of the challenging tasks of modern biotechnology and bioengineering. It can be done in two principally different ways – by changing protein structure or due to binding of modulating molecules (ligands, effectors, stabilizing agents). Extended substrate profile, increased stereoselectivity or improved enzyme stability is often achieved by implementing selective mutations. It can be rationalized nowadays by exploiting methods of bioinformatics, molecular modeling and computational screening of created in silico libraries of enzyme mutants. The same set of methods can be applied to search for modulating molecules and their binding sites. Until recently, the major interest was focused on studying the active sites of enzymes and search of competitive inhibitors that prevent binding of substrates and cofactors. However, computational structure analysis has revealed that enzymes along with previously annotated active sites possess a significant amount of previously unexplored potential binding pockets with non-identified functional role [Suplatov et al., 2014]. This comes along with the recently made suggestion that allostery – regulation of protein function by binding of low-molecular weight compounds in topologically independent regulatory sites – may be an intrinsic property of virtually all proteins [Gunasekaran et al., 2004]. It is of great interest to identify and characterize new binding sites in protein structures and understand their role in modulation of protein function [Suplatov & Švedas, 2015].

We have developed and evaluated new methodology that combines methods of bioinformatics, molecular modeling, theoretical chemistry and high-performance computing and helps to develop different approaches to modulate enzyme activity, selectivity and

stability. The developed method was applied to understand structure-function relationship in several enzyme families: Ntn-hydrolases, penicillin-binding proteins, α/β -hydrolases. Function-related variable positions in corresponding enzyme families were identified and used as hotspots for mutations to increase stability and synthetic activity of penicillin acylase from *Escherichia coli*, expand substrate specificity of D-aminopeptidase from *Ochrobactrum anthropi* and introduce amidase activity into *Candida antarctica* lipase B [Shcherbakova et al., 2014; Suplatov et al., 2012, 2014, 2015; Khaliullin et al., 2013; 4-8]. Molecular modeling of in silico constructed mutants was used to evaluate effect of substitutions at function-related positions on stability as well as catalytic properties and to select the most promising variants for experimental evaluation. Isolated mutants of penicillin acylase, D-aminopeptidase and lipase B demonstrated significantly improved functional properties. The methodology has been also applied to search for previously unknown binding sites in the structure of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase superfamily of enzymes and design specific inhibitors of these enzymes with a novel mechanism of action. The experimental study has shown that compounds selected by the computer screening are selective inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Mycobacteria* and do not suppress activity of the human homolog. Analysis of the literature and DrugBank database has shown that the identified compounds have never been reported as glyceraldehyde-3-phosphate inhibitors and this property has been demonstrated for the first time. Our methodology can be used as a systematic tool to study structure-function relationship, characterize and rank enzyme binding sites, select function-related positions and use them as hotspots for mutation to rationalize different protein engineering approaches and design enzymes with requested functional properties. *This work was supported by the Russian Science Foundation (grant #15-14-00069)*

БИОИНЖЕНЕРИЯ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ МЕТАЛЛОКАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Т ИЗ *THERMOACTINOMYCES VULGARIS*

В.Х. Акпаров¹, И.Г. Халиуллин², В.И. Тимофеев^{3,4}, И.П. Куранова^{3,4}

¹Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва; ²Московский физико-технический институт, Долгопрудный; ³Институт кристаллографии им. А.Б. Шубникова, ФИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва; ⁴НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

Карбоксипептидаза Т (КПТ) из *Thermoactinomyces vulgaris* является отдаленным гомологом панкреатических карбоксипептидаз А и В, но имеет сходную с ними укладку полпептидной цепи и пространственное строение активного центра. В то время как КПА и КПВ селективно расщепляют субстраты с С-концевыми гидрофобными или положительно заряженными остатками, КПТ расщепляет субстраты обоих этих ферментов. Благодаря наличию двух хорошо изученных эталонных ферментов, КПТ является удобным шаблоном для инженерии карбоксипептидаз с различной субстратной селективностью. Получена первичная и трехмерная структуры как апо-карбоксипептидазы Т, так и её комплексов с ингибиторами – аналогами основного и переходного состояний гидролиза гидрофобных, положительно и отрицательно заряженных субстратов и на этой основе выявлены остатки, образующие S1' и S1 – субсайты. Путем сравнения с аналогичными комплексами узкоспецифичных карбоксипептидаз А и В установлена роль отдельных остатков в дискриминации субстратов КПТ. При этом рассмотрены роли «классических» детерминант, таких как Asp255, обнаружены новые детерминанты среди консервативных (203) и полуконсервативных остатков (247), а также удаленные детерминанты субстратной специфичности, такие как ионы структурного кальция. Прослежены пути передачи конформационных изменений от S1'- субсайта до остатков каталитического центра, и от остатков структурного кальция до остатков активного центра КПТ. Получена 3D структура КПТ с имплантированным S1'-субсайтом КПВ, которая позволяет исследовать структурные основы субстратной специфичности КПТ. С помощью полученных данных о связи структуры активного центра КПТ и её селективности сконструированы варианты, обладающие селективностью по отношению к гидрофобным, положительно и отрицательно заряженным субстратам. Методами рентгеноструктурного анализа и ферментативной кинетики показано, что дискриминация субстратов происходит на уровне продуктивности связывания. Выявлена роль конформационных изменений подвижной петли активного центра и перераспределения фиксированных молекул воды в механизме распознавания субстрата. Полученные результаты находятся в рамках гипотезы индуцированного соответствия. *Работа поддержана грантом РФФИ № 14-08-01245.*

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОЙ АРИСУЛЬФАТАЗЫ МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *FUSARIUM PROLIFERATUM* LE1

С.А. Корбан, К.С. Бобров, С.В. Швецова, О.Л. Власова, Е.В. Энейская, А.А. Кульминская

Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ Курчатовский институт, Гатчина, Россия

Сульфатазы относятся к ферментам класса гидролаз, катализирующих гидролиз эфиров серной кислоты. Известно, что эти ферменты обладают широким спектром биологических активностей [1], а также вовлечены в патогенез многих заболеваний [2, 3]. Именно поэтому сульфатазы привлекают все больший интерес исследователей к изучению их свойств и функций. Ранее нами была обнаружена арилсульфатазная активность у растительного патогена *Fusarium proliferatum* LE1 [4], однако невысокий уровень продукции белка затрудняет его дальнейшие исследования. Поэтому целью работы было получить рекомбинантный фермент арилсульфатазу и осуществить его детальную биохимическую характеристику. В ходе работы нами был секвенирован ген арилсульфатазы мицелиального гриба *F. proliferatum* LE1. Кодирующий фрагмент гена был клонирован и экспрессирован в дрожжевой системе *Pichia pastoris*. В результате очистки рекомбинантной арилсульфатазы (raSFp) по разработанной схеме было получено 10 мг чистого фермента с 1 л культуры. Проведен комплексный анализ физико-химических характеристик raSFp (кинетика гидролиза п-нитрофенил сульфата, зависимость активности и стабильности фермента от влияния температуры, pH, восстанавливающих и хелатирующих агентов, ингибиторов протеаз). Проведенные исследования позволяют утверждать, что впервые клонированная грибная арилсульфатаза является эффективным биокатализатором данного типа. Результаты работы послужат основой для дальнейших исследований фермента и его практической реализации в биотехнологии. *Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-14-00109).*

1. S. R. Hanson et al (2004) *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, vol. 43, no. 43, 5736–5763.
2. G. Diez-Roux and A. Ballabio (2005) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, vol. 6, 355–379.
3. G. Parenti et al (1997) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 7, no. 3, 386–391.
4. S. V. Shvetsova et al (2015) *J. Basic Microbiol.*, vol. 55, no. 4, 471–479.

НАНОПЛЕНКИ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ БИОСЕНСОРНЫХ СИСТЕМ

И.Н. Курочкин *Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва*

Показаны возможности использования наноразмерных фермент-полимерных комплексов для создания высокочувствительных амперометрических сенсоров для определения нейротоксинов, эстераз крови и ферментов-маркеров патологических состояний человека и животных.

Исследованы возможности использования новых метаматериалов, содержащих диэлектрические и плазмонные резонаторы для целей дополнительного усиления сигнала гигантского комбинационного рассеяния и создания нового поколения сенсорных материалов. Достигнуто дополнительное усиление сигнала гигантского комбинационного рассеяния более чем в 200 раз. Рассмотрены вопросы применения нового материала для высокочувствительного определения ферментативной активности и иммунологического анализа.

ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ ГИБРИДНОГО БЕЛКА СТРЕПТАВИДИН-ЛЮЦИФЕРАЗА В СИСТЕМАХ НА ОСНОВЕ БИОТИН-СТРЕПТАВИДИНОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НА ПРИМЕРЕ ДЕТЕКЦИИ ДНК

Д.В. Смирнова, М.Ю. Рубцова, Н.Н. Угарова

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

Одной из важнейших задач современной биохимии и биотехнологии является создание новых реагентов и аналитических систем на их основе, способных отвечать постоянно растущим требованиям медицины и санитарии. Особый интерес представляют стрептавидин-люциферазы, поскольку совмещают в себе высокую чувствительность регистрации люциферазной метки, обусловленную высоким квантовым выходом биолюминесцентной реакции, с высокой специфичностью стрептавидина, что позволяет фиксировать молекулу люциферазы на поверхности мишени с участием высокоаффинных биотин-стрептавидиновых взаимодействий.

С использованием генно-инженерного подхода создана новая система для получения стрептавидин-люциферазы с высокой люциферазной и специфической активностью на основе люциферазы светлячков *L. mingrelica*, и разработана биоаналитическая система с использованием полученного гибрида. Получена плаزمид, содержащая ген гибридного белка His₆-SA-Luc и оптимизирована его структура: взаимное расположение генов, кодирующих термостабильную мутантную люциферазу *L. mingrelica* (Luc), стрептавидин (SA) и полигистидиновую последовательность. Гибридный белок получен экспрессией в клетках *E. coli* и очищен с использованием металлохелатной хроматографии. Данный метод наработки и очистки белка отличается простотой и позволяет получать белок в необходимых количествах. Методом эксклюзионной хроматографии показано, что гибрид нарабатывается преимущественно в тетрамерной форме, обладающей, как высокой люциферазной активностью, так и биотин-связывающей способностью. В данном случае фракция тетрамеров более чем на 95% определяет люциферазную активность и на 92% биотин-связывающую способность гибрида.

Полученный гибрид был использован для селективной детекции ДНК методом гибридизационного анализа на примере биотинилированного фрагмента гена *gadB*, кодирующего глутамат декарбоксилазу клеток *E. coli*. Суть метода состояла в наработке биотинилированной ДНК методом ПЦР, гибридизации полученной ДНК на специфических ДНК-зондах, иммобилизованных на поверхности планшета, и детекции полученных комплексов с использованием гибрида. Олигонуклеотидные зонды иммобилизовали на поверхности лунок планшета, покрытых плюроником. Линейный диапазон определяемых концентраций составил от 0,16 до 15 нМ.

КОНСТРУИРОВАНИЕ НОВЫХ МЕТОДОВ И РЕАГЕНТОВ ДЛЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО ФЕРМЕНТАТИВНОГО АНАЛИЗА

Е.Н. Есимбекова^{1,2}, В.А. Кратасюк^{2,1} *¹Институт биофизики СО РАН; ²Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия*

Демонстрируется применение принципов биоинженерии для создания новых биолюминесцентных ферментативных методов и реагентов. Для решения проблемы обнаружения различных химических токсичных веществ для экологического мониторинга, анализа качества пищевых продуктов и медицинской диагностики предложена Биолюминесцентная ферментативная платформенная технология на основе биферментной системы NADH-FMN-оксидоредуктаза и люцифераза (R + L) светящихся бактерий. Токсические свойства анализируемых веществ и смесей определяют по изменению параметров биолюминесценции в присутствии анализируемых образцов по сравнению с контрольными значениями. Использование различных механизмов сопряжения ферментативных реакций с биферментной системой R + L позволило разработать новые ферментативные методы, отличающиеся по чувствительности к различным классам токсикантов. Ферментативный биолюминесцентный анализ имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными биологическими методами тестирования, в том числе увеличивается точность и чувствительность анализа, сокращается время анализа, появляется возможность проведения анализа при высоком содержании органических веществ.

Для обеспечения высокой активности и стабильности используемых в анализе ферментов было разработано семейство многокомпонентных реагентов «Энзимолюм», различающихся составом компонентов в зависимости от аналитической задачи. В составе реагента «Энзимолюм» присутствуют ферменты NADH:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза и субстраты (миристиновый альдегид и NADH), иммобилизованные в крахмальный или желатиновый гель. Реагент представляет собой диск диаметром 7–8 мм, толщиной 50–60 микрон, сухой вес которого 1,5 мг. Разработаны способы увеличения чувствительности реагента к действию токсических веществ, подобраны условия проведения анализа, позволяющие определять содержание токсических веществ с максимальной эффективностью, соответствующей или ниже их уровня ПДК. Реагент сохраняет высокую ферментативную активность в течение не менее одного года, стабилен по отношению к денатурирующим воздействиям, а также может служить биологической основой для разработки биосенсора для анализа токсичности различных сред. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 15-19-10041.

САМООРГАНИЗАЦИЯ БЕЛОК-ДЕНДРИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ В БИОАКТИВНЫЕ НАНОПЛЕНКИ

Ю.Ю. Стройлова, С.А. Сорокина, П.И. Семенюк, Т. Эртле, В.И. Муронец

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Использование материалов на основе белок-полимерных композиций является перспективным методом решения ряда проблем в области биотехнологии и медицины. Среди преимуществ дендримеров можно назвать точно контролируемые размеры и форму частиц, высокоупорядоченную трехмерную структуру с большим количеством поверхностных функциональных групп, а также наличие в структуре полостей и каналов, что предопределяет их способность образовывать комплексы «хозяин–гость» и взаимодействовать с гидрофобными сайтами белков. В нашей работе были получены нанопленки на основе пиридилфениленовых дендримеров 4-й генерации с полностью пиридиновой периферией, содержащие белковый компонент. Для бета- и каппа-казеинов молока, альфа-лактальбумина, рекомбинантного овечьего приона и лизоцима была обнаружена способность встраиваться в самоорганизующиеся структуры толщиной около 400–700 нм. О включении белка в нанопленку свидетельствует исчезновение белка в растворе после инкубации с дендримером и образования нанопленок. Было обнаружено, что образование нанопленок зависит от соотношения белка и дендримера в исходном растворе. В работе были подобраны оптимальные условия для образования таких структур. Структура полученных нанопленок была исследована с помощью световой и атомно-силовой микроскопии. Полученные наноструктуры были проанализированы на стабильность, устойчивость к изменениям pH и действию детергентов. Было показано, что они стабильны по крайней мере в течении месяца, устойчивы к кипячению в растворе таких детергентов, как додецилсульфат натрия. Кроме того, протеолиз трипсином и пепсином вызывает лишь частичное разрушение нанопленок, а растворить их удалось только при нагревании в 2M соляной кислоте при температуре 65°C. Мы провели *in silico* молекулярное моделирование самоорганизации катионных пиридилфениленовых дендримеров с белками в регулярные наноструктуры и предложили возможную модель пространственной организации молекул. Мы полагаем, что полученные дендример-белковые системы перспективны с точки зрения возможного применения в области разработки новых биоматериалов, систем медицинского назначения и биосенсоров, обладающих высокой стабильностью.

СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА-1 В СОСТАВЕ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ГЛАЗ

О.А. Кост¹, Е.А. Зайцева¹, И.И. Никольская¹, П.В. Бневский¹, Н.Б. Чеснокова², О.В. Безнос², Д. Маникам³, А.Д. Алексашкин¹, Н.Л. Еремеев¹, А.В. Кабанов^{3,1}, Н.Л. Клячко¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия; ²Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия; ³University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA

Воспалительные заболевания глаз сопровождаются развитием окислительного стресса, вызванного избыточным накоплением свободных радикалов кислорода и истощением эндогенных антиоксидантов. Усиление свободнорадикальных процессов установлено при развитии практически всех видов офтальмологической патологии (воспаление, ожоговая болезнь глаз, глаукома, катаракта, внутриглазные кровоизлияния, диабетическая ретинопатия и др.). Одним из подходов к лечению воспалительных процессов, сопровождающих такие заболевания, является использование антиоксидантов, в частности супероксиддисмутазы (СОД). СОД удаляет супероксидные радикалы и предотвращает образование более опасных радикалов: гидроксильного радикала и синглетного кислорода. Важно, что СОД практически нетоксична. Однако при капельном введении только 5–10% фермента проникает через оболочку роговицы и достигает внутриглазных тканей. Включение рекомбинантной СОД1 в полимерные наночастицы на основе шитого 3,3'-дигиобис [сульфосукцинимидил пропионатом] метоксиполи(этиленгликоль)-поли(L-лизин) блок-сополимера с помощью технологии «NanoZYME» [1] позволило значительно усилить терапевтическое действие фермента. На экспериментальной модели иммуногенного увеита у кроликов показано улучшение ряда биохимических показателей течения болезни при местном капельном введении раствора полученных наноформуляций, по сравнению с водным раствором фермента. Отмечено сокращение времени отеков роговицы и век, уменьшение фибриновых отложений и гиперемии конъюнктивы, повышение антиоксидантной активности в слезной жидкости, снижение концентрации лейкоцитов, общего белка и α2-макроглобулина в водянистой влаге глаз кроликов. Данные подтверждены гистологическими исследованиями различных тканей глаза. Представлены и обсуждаются результаты включения СОД1 в неорганические кальций-фосфатные частицы (CaPh-частицы). В экспериментах *in vivo* установлено, что такие наноконструкции, как и СОД1-содержащие полимерные наночастицы, характеризуются повышенной противовоспалительной активностью, демонстрируя в том числе уменьшение формирования задних синехий (на 25%) и содержания фибрина в передней камере глаза (на 40%), что способствует сохранению прозрачности оптических сред глаза и снижению вероятности развития вторичной глаукомы.

1. Patent WO/2008/141155 A1.

СОСУДОПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОКОНЬЮГАТА СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА-ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТ-КАТАЛААЗА ПРИ ЛЕЧЕБНОМ РЕЖИМЕ ВВЕДЕНИЯ

А.В. Максименко *Институт экспериментальной кардиологии, Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ, Москва, Россия*

Окислительный стресс сопровождает развитие различных, в том числе и сердечно-сосудистых, патологий. Терапевтическая необходимость блокирования губительного действия окислительного стресса обусловила исследование и использование антиоксидантов. Среди них высокой эффективностью действия выделяются антиоксидантные ферменты. Для улучшения их фармакологического профиля (повышения полноты и глубины действия, его комбинированного и направленного проявления) нами был получен ковалентный биферментный конъюгат супероксиддисмутазы (СОД) с каталазой (КАТ), сшитых через гликозаминогликан эндотелиального гликокаликса – хондроитинсульфат (ХС). Модель эндотоксического шока у крыс, индуцированного введением липополисахарида (ЛПС), связана с развитием в организме окислительного стресса. Повышение выживаемости животных при эндотоксическом шоке у крыс (введение ЛПС) наблюдалось при использовании биферментного конъюгата СОД-ХС-КАТ, причем не только при превентивном, но и лечебном (введение терапевтика после введения ЛПС) режиме его поступления в организм. При развитии поражения в печени, легких, почках, сердце отмечался повы-

шенный уровень содержания NO, который мог превращаться в пероксинитрит, повреждая органы. Концентрация NO достоверно не изменялась после введения СОД-ХС-КАТ. При этом изменение показателей содержания в крови мочевины и креатинина выявило защитное действие конъюгата на функцию почек, а разнообразие изменений других биохимических показателей затрудняло формирование согласованных заключений по состоянию иных органов. Собранные вместе эти данные ясно свидетельствовали (наряду со снижением летальности крыс при использовании СОД-ХС-КАТ) о наличии других защитных эффектов этого конъюгата на функцию органов (помимо предотвращения образования пероксинитрита в условиях окислительного стресса). Актуально последовательное изучение механизма действия конъюгата СОД-ХС-КАТ на животных моделях с развитием поражения сердечно-сосудистой системы иными вазоактивными соединениями, не связанными с NO, например, ангиотензином II, как и определение возможности NO-независимого проявления терапевтического эффекта конъюгата. *Настоящее исследование было выполнено при финансовой поддержке грантом РФФИ 15-04-03584, а также Министерством здравоохранения России.*

ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ АЛЬФА-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ МОРСКОЙ БАКТЕРИИ PSEUDOALTEROMONAS SPP. КММ 701 НА БИОПЛЕНКИ

Л.В. Слепченко¹, Л.А. Балабанова¹, А.Б. Подволоцкая², М.Г. Елисейкина³, И.Ю. Бакунина¹, В.В. Исаков¹, В.А. Голотин^{1,2}, В.А. Рассказов¹ ¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН; ²Дальневосточный федеральный университет; ³Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, Россия

Биопленка представляет собой сложную биохимическую смесь полисахаридов, гликопептидов, нуклеиновых кислот и липидов, образующие внеклеточный матрикс, который защищает бактерии от неблагоприятных воздействий внешней среды. Изучение биопленок в настоящее время вызывает огромный интерес в связи с тем, что они создают большие проблемы в медицинской практике, вызывая хронические инфекции в организме человека, и в промышленности, вызывая биокоррозию различного технологического оборудования. Для эффективного разрушения бактериальной биопленки могут быть использованы ферменты, специфически действующие на компоненты биопленки. Однако данные о действии на биопленки альфа-галактозидаз практически отсутствуют. Биопленки штаммов *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* растили в 24-луночных планшетах с добавлением 150 мкл мясопептонного бульона и 150 мкл бактериальной суспензии (10^8 КОЕ/мл) в течение 5 суток при 18°C. После воздействовали на пленку рекомбинантной α -галактозидазой морской бактерии *Pseudoalteromonas* spp. КММ 701 (α -PsGal) в количестве 0,279 ед в течение 2-х часов при 24°C. Биомассу пленок оценивали спектрофотометрически при 490 нм после окрашивания кристаллическим фиолетовым. Структурные изменения в пленках оценивали методом электронной микроскопии (Evo 40, Carl Zeiss). После обработки биопленок *S. aureus* и *B. subtilis* галактозидазой α -PsGal их структура становилась более рыхлой, что приводило к увеличению проницаемости на 7-8%. Внеклеточный матрикс *P. aeruginosa* и *S. enteritidis* под действием α -PsGal разрушался на 60 и 50 % соответственно. Однако результаты электронной микроскопии наряду с деградирующим эффектом обнаружили наличие значительного изменения морфологии внеклеточного матрикса у всех штаммов. Биопленка меняла свою структуру с равномерно рыхлой на непрозрачную монолитную субстанцию. Очевидно, что в биопленках исследуемых штаммов присутствуют галактозосодержащие субстраты для осуществления реакции гидролиза и трансгликозилирования в присутствии α -PsGal. Методы ТСХ, ЯМР- и MALDI-TOF-масс-спектрометрии подтвердили наличие продуктов реакции трансгликозилирования α -PsGal – α -1,6-, α -1,3-, α -1,2-связанные дигалактозиды. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-34-00431.*

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ФУКОИДАНА И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГИДРОЛИЗАТОВ

О.С. Корнеева, Е.П. Анохина, А.А. Слепокуров, Ю.П. Теплова

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Разработка биотехнологии фукозы и фукоолигосахаридов из растительного сырья вызывает особый интерес, что обусловлено широким спектром биологической активности фукозы и ее производных. Фукоза входит в качестве углеводного компонента в состав иммуноглобулинов и других биологически активных веществ, играет определяющую роль в процессах онтогенеза, клеточной дифференциации, репродуктивных процессах позвоночных. Одним из перспективных способов получения фукозы и фукоолигосахаридов является ферментативный гидролиз фукоидана бурых водорослей *Fucus vesiculosus* α -L-фукозидазой. Природные продуценты фукозидазы характеризуются недостаточной активностью, в связи с чем, методами генной инженерии получены высокоактивные продуценты, превышающие уровень активности нативных продуцентов более чем в 20 раз. Оптимизация условий ферментативного гидролиза фукоидана рекомбинантной α -L-фукозидазой позволила обеспечить максимальную степень гидролиза фукоидана 85%. Проведенные в опытах *in vivo* исследования биологической активности фукозы и фукозосодержащих гидролизатов показали, что их введение в дозировке 0,02% (к массе тела) в рацион опытных мышей с экспериментальным дисбиозом способствовало восстановлению индигенной микрофлоры желудочно-кишечного тракта, в том числе, бифидо- и лактобактерий, уже на 5 сутки, а также стимулировало повышение уровня антителообразования в крови опытных животных, что свидетельствует о пребиотических и иммуностропных свойствах полученных гидролизатов. *Работа выполнена в рамках госзадания (проект № 2295 «Разработка биокаталитических технологий конверсии полисахаридов с использованием рекомбинантных белков и исследование функциональной активности полученных олиго- и моносахаридов»).*

ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ ВЫСОКОАФФИННЫХ ЛИГАНДОВ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ПРОТЕАЗ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

В.А. Королева¹, М.Г. Холявка¹, М.С. Кондратьев², В.Г. Артюхов¹

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия; ²Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

Имобилизация фермента на нерастворимом носителе позволяет решить несколько важных для медицины задач: 1) получение препаратов пролонгированного действия благодаря стабилизации и увеличению времени полужизни фермента, 2) получение возможности адресной доставки препарата и решение проблемы его диффузии в организме, 3) направленное ре-

гулирование оптимумов функционирования препарата (температурный оптимум, оптимум pH). Выполнен виртуальный скрининг лигандов для иммобилизации некоторых протеаз медицинского назначения. В качестве моделей белка в банке данных белковых структур (PDB) были выбраны молекулы трипсина (pdb 3UY9), папаина (pdb 9PAP) и коллагеназы (pdb 2CLT). Изученный набор лигандов представлял собой высокомолекулярные соединения – поликатиониты и полианиониты, а также хитозан. На основе сравнительного анализа величин полной энергии и локализации мест связывания лигандов, а также литературных данных, нами высказаны соображения о механизмах взаимодействия предлагаемых матриц для иммобилизации молекул фермента (волокна ВИОН КН-1 и ВИОН АН-1, хитозан) и структурных особенностях таких комплексов. В ходе выполненного исследования на моделях протеолитических ферментов, а также моделях фрагментов матриц для иммобилизации были определены уровни аффинности связывания и на основании этого сделаны выводы о перспективности экспериментального тестирования некоторых из соединений в качестве иммобилизационных агентов для протеаз. Матрицы кислоторастворимых хитозанов различной молекулярной массы (200–350 кДа), а также матрицы ионообменных волокон ВИОН АН-1 и ВИОН КН-1 были экспериментально протестированы как носители для протеолитических ферментов. Установлено, что эти матрицы минимально модифицируют структуры иммобилизованных на них ферментов, что позволяет сохранить высокую каталитическую способность препаратов и обеспечить их эффективное применение в медицинских целях.

ИЗУЧЕНИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ И ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ГАМЕТОФОРОВ МХА *PHYSCOMITRELLA PATENS*, ВЫЗЫВАЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ РОДА *PSEUDOMONAS*

С.В. Виноградова, Е.Д. Егорова Институт биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Изучение формирования иммунного ответа у растений при поражении фитопатогенами – одна из актуальных задач современной биологии. Об иммунной системе мхов, первых наземных растений, известно сравнительно немного. Взаимодействие модельного объекта *Physcomitrella patens* со специализированными бактериальными фитопатогенами не изучено. Гаметофоры *P. patens* культивировали на агаризованной питательной среде Кнопа и инокулировали суспензиями (OD 0,4) фитопатогенных бактерий *P. fluorescens*, *P. syringae* и *P. viridiflava*. Фенотипические (пожелтение, уменьшение размера, отставание в росте) и цитологические изменения (деформация клеток, уменьшение количества и размера хлоропластов, коагуляция цитоплазмы) были отмечены во всех инокулированных бактериями гаметофорах. Наиболее существенное воздействие на гаметофоры оказывал штамм *P. viridiflava*, который вызывал пожелтение, а также уменьшение количества и размера хлоропластов уже на 5-ый день после инокуляции. Полную гибель гаметофоров, инокулированных *P. viridiflava*, наблюдали на 17–20-ый день. На следующем этапе проводили выделение бактерий из гаметофоров сразу после инокуляции, на 2-ой и на 5-ый дни после инокуляции бактериями рода *Pseudomonas*. Для этого делали смыв бактерий с поверхности гаметофоров, а также растирали гаметофоры до однородной суспензии для приготовления серийных разведений и посева на питательную среду. В результате было показано статистически достоверное увеличение количества колоний бактерий *P. fluorescens*, *P. syringae* и *P. viridiflava* на питательной среде, что подтверждает размножение изучаемых бактерий в клетках *P. patens*. Для подтверждения гибели клеток гаметофоров *P. patens* использовали краситель Эванс синий. Гаметофоры выдерживали в 0,1% растворе красителя, промывали и инкубировали до полного обесцвечивания в 50% этаноле и 1% SDS. По сравнению с контролем было отмечено статистически достоверное увеличение количества мертвых клеток в гаметофорах, инокулированных бактериями рода *Pseudomonas*. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что изучаемые штаммы *P. fluorescens*, *P. syringae* и *P. viridiflava* являются патогенами *P. patens*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 13-04-40104 и Гранта Президента РФ МК -7138.2015.4.

ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ С ГЛЮКОЗО-ФРУКТОЗНОГО СИРОПА ИЗ ТОПИНАМБУРА

Д.О. Осипов¹, О.А. Сеницына^{1,2}, О.Г. Короткова¹, П.В. Волков¹, И.Н. Зоров^{1,2}, А.Г. Булахов¹, И.В. Илущка³, А.П. Сеницын^{1,2}

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; ²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва; ³ООО «Краснодарский биоцентр», Абинск, Россия

Инулодосодержащее растительное сырье – перспективный источник глюкозо-фруктозных сиропов. Их получают либо кислотным, либо ферментативным путем. Последний предпочтительнее, поскольку происходит в более мягких условиях и не приводит к образованию побочных продуктов. В данной работе для получения сахарного сиропа с высокой долей глюкозы и фруктозы были использованы новые ферментные препараты (ФП) INU13 и INU18 на основе штаммов гриба *Penicillium verruculosum*, являющихся продуцентами рекомбинантной экзоинулиназы *Aspergillus awamori*. Контролем служил ферментный препарат на основе исходного штамма *P. verruculosum* 221-151. В качестве сырья были использованы содержащие инулин клубни и надземные побеги топинамбура (*Helianthus tuberosus*). Было показано, что использование этих ФП при гидролизе дезинтегрированных клубней (50°C, pH 6,5, 100 г/л субстрата, 2 мг белка ФП/г сухого субстрата, 6 ч) образуется 12-13 г/л глюкозы, 38-42 г/л фруктозы, 3-6 г/л прочих восстанавливающих сахаров (ВС), что значительно выше, чем при использовании ФП на основе исходного штамма (1, 2 и 1 г/л соответственно). Стебли топинамбура, содержащие меньшее количество инулина и более устойчивые к ферментативному воздействию, были гидролизированы при других условиях: 50°C, pH 5, 100 г/л субстрата, 5 и 10 мг белка ФП/г сухого субстрата. 24 ч. При дозировке ФП 5 мг/г образовывалось 2,5 г/л глюкозы, 16-17 г/л фруктозы, 2,5-3 г/л других ВС. Исходный ФП при той же дозировке давал 1, 3 и 4 г/л глюкозы, соответственно. Увеличение дозировки ФП до 10 мг/г приводило к увеличению выхода глюкозы на 20%, фруктозы на 12-19%. Увеличение дозировки исходного ФП приводило к увеличению выхода глюкозы до 2 г/л, фруктозы до 7 г/л, ВС до 11 г/л. Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России (идентификационный номер проекта RFMEFI60714X0050).

РЕКОМБИНАНТНЫЙ КАТЕПСИН L ИЗ КИШЕЧНИКА ЖУКА-КОЖЕЕДА *DERMESTES MACULATUS*

Е.Н. Калиберда, С.В. Пантелеев, Т.В. Бобик, Л.Д. Румш

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

Жук-кожеед *Dermestes maculatus* известен как опасный вредитель сырья животного происхождения. Одним из ключевых ферментов пищеварения этого жука является цистеинзависимый протеолитический фермент катепсин L (cathepsin L, CatL). Однако его содержание в общем протеолитическом пуле составляет менее 0,1%. Получение катепсина L в рекомбинантной

форме (rCatL) обеспечит достаточное количество материала для его исследования с целью создания ингибиторов и условий для борьбы с этим жуком-кожеедом. Рекомбинантный катепсин L (rCatL) получен экспрессией в клетках *E. coli* штамма Rosetta в формах препрофермента (full-rCatL) и двух зрелых ферментов: N-rCatL и C-rCatL, – с 3FLAG, с-мус эпитопами, 6 гистидинами на C-конце (full-rCatL и C-rCatL) и только 6 гистидинами на N-конце (N-rCatL) белка. Рекомбинантные белки были выделены из телец включения и очищены методом металл-хелатной аффинной хроматографии на Ni-agarose. Наличие full-rCatL и C-rCatL в процессе получения и очистки подтвердили Вестерн-блоттом (по 3FLAG или с-мус эпитопам), N-rCatL – только электрофорезом в 10% ПААГ. Специфическую активность с Z-A-F-R-pNA при pH 5, 1мМ DTT, 37°C проявляли только full-rCatL и C-rCatL, причем значительная часть активного белка в случае full-rCatL не связывалась с Ni-agarose. После рефолдинга очищенных на Ni-agarose full-rCatL и C-rCatL белков в буфере 50 мМ NaAc, pH 5, специфическая активность возрастала в 2–3 раза. Белок N-rCatL не проявлял специфической активности с Z-A-F-R-pNA, что говорит о каталитической значимости N-концевой части катепсина L. Таким образом, мы получили и выделили рекомбинантный цистеинзависимый катепсин L в формах зрелого белка C-rCatL и препрофермента full-rCatL, способного к активации в кислых условиях.

НОВАЯ ОМЕГА-АМИНОТРАНСФЕРАЗА ИЗ *PSYCHROBACTER CRYOHALOLENTIS* K5

Т.Н. Стеханова, Т.В. Ракитина, Е.Ю. Безсуднова, В.О. Попов

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

Ген Pcyu0361 из генома психрофильной галотолерантной бактерии *Psychrobacter cryohalolentis* K5, кодирующий новую омега – аминотрансферазу класса III, клонирован с добавлением к N концу продукта His6 тага и сайта узнавания TEV. Соответствующий рекомбинантный белок Pcyu0361 экспрессирован в *Escherichia coli*, выделен и охарактеризован. Аминотрансфераза Pcyu0361, очищенная до гомогенного состояния, представляет собой гомодимер с молекулярной массой 100 kDa и демонстрирует спектр, соответствующий холо – форме фермента (пиридоксаль-5'-фосфат связанная). Субстратный профиль фермента исследовался методом обращенно - фазовой ВЭЖХ с использованием μ RPC C2/C18 колонки. Показано, что аминотрансфераза Pcyu0361 способна аминировать альдегиды (ароматические и алифатические) и альфа-дикетоны, используя в качестве amino донора S – метилбензиламин, тогда как кетокислоты и аминокислоты как с альфа – аминогруппой, так и с удаленной аминогруппой не являются субстратами для данного фермента. Pcyu0361 проявляет щелочной оптимум pH (pH 10) и температурный оптимум T_{opt} 45°C, достаточно высокий для фермента, происходящего из психрофильного организма, обитающего при температуре менее 0°C. Таким образом, оригинальный субстратный профиль Pcyu0361, в том числе способность к (S) селективному дезаминированию ароматических аминов делают данную аминотрансферазу потенциально значимой для биотехнологического использования. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 14-24-00172.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ПОВЕРХНОСТНОГО МУЛЬТИГЕМОВОГО ЦИТОХРОМА С ИЗ ТЕРМОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *CARBOXYDOTHERMUS FERRIREDUCTENS*

Н.И. Дергоусова, Т.В. Тихонова, С.Н. Гаврилов, Т.Б. Устинникова, Е.А. Бонч-Осмоловская, В.О. Попов

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, Россия

Объектом исследования является анаэробная, термофильная грам-положительная бактерия *Carboxydothermus ferrireducens*, способная к диссимиляторному восстановлению растворимых и нерастворимых форм Fe(III). Для того чтобы понять молекулярные основы внеклеточного переноса электронов в грам-положительных бактериях, необходимо детальное изучение белков, участвующих в этом процессе. Показано, что при росте *Carboxydothermus ferrireducens* на нерастворимом оксиде железа стимулируется биосинтез двух мультигемовых цитохромов с, одним из которых является цитохром с: WP_028052385 (110–120 кДа). Цитохром локализован на внешней поверхности клеточной стенки, содержит 1 трансмембранный фрагмент и 12 гем-связывающих мотивов CXXCH. Фрагмент ДНК, соответствующий в последовательности белка 66-893 аминокислотным остаткам (внеклеточный участок), был клонирован в плазмидный вектор pET22b(+). pET-22b(+) содержит *relB* сигнальный пептид, обеспечивающий потенциальный транспорт целевого белка в периплазму. Экспрессию проводили в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3), несущих плазмиду pEC86. pEC86 содержит кластер генов *scmABCDEFGHIH*, обеспечивающих синтез и встраивание гемов с в рекомбинантные цитохромы, получаемые в клетках *E. coli* в аэробных условиях. Экспрессию клонированного гена индуцировали с помощью ИПТГ. Наличие гемопротеина подтверждали окрашиванием белков бензидином после разделения лизатов клеток в ПААГ в присутствии ДДС-Na. Рекомбинантный белок находится в нерастворимой фракции клеточных белков, несмотря на то, что предсказанный в последовательности белка трансмембранный фрагмент был делетирован. Были проведены эксперименты по оптимизации экспрессии. Использовали штаммы *E. coli*: BL21(DE3), C41(DE3) и C43(DE3). Удалось увеличить экспрессию целевого гемопротеина, но белок, по-прежнему, находится в нерастворимой фракции. Для его растворения использовали различные детергенты. Рекомбинантный белок был очищен до гомогенного состояния. Спектральные и редокс свойства целевого белка были охарактеризованы. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 14-24-00172.

ИЗУЧЕНИЕ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ ИЗ ПСИХРОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *PSYCHROBACTER CRYOHALOLENTIS*

П.А. Кусочек, Т.В. Ракитина, Е.Ю. Безсуднова, В.О. Попов

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

Короткоцепочечные дегидрогеназы/редуктазы (SDHs) являются частью функционально разнообразного класса NAD(P)(H) -зависимых оксидоредуктаз. Спектр субстратов SDHs включает спирты, альдегиды, кетоны, стероиды, полициклические ароматические углеводороды и ретиноиды [1]. Уровень сходства первичных последовательностей SDHs составляет не более 30%, консенсусные мотивы выявлены в активном центре и на участках аминокислотной последовательности, формирующих сайт связывания NAD(P)H. Тем не менее, SDHs отличаются высокой степенью гомологии структур субъединиц и активных тетрамеров. Данный факт примечателен тем, что SDHs из экстремофильных организмов при сходстве структур, демонстрируют значительные различия в оптимальных условиях функционирования, то есть в сходных структурах реализуются разные молекулярные механизмы адаптации. В рамках анализа структурных факторов адаптации SDHs к высоким и

низким температурам ведется исследование двух дегидрогеназ из психрофильной бактерии *Psychrobacter cryohalolentis* (Pcryo0132; Pcryo1188). Бактерия *P. cryohalolentis* живет и способна к делению при температурах -10-30 °C в средах с 1,7 М NaCl [2]. Уровень сходства первичных последовательностей новых SDHs составляет 23%, уровень сходства с охарактеризованной ранее гипертермофильной SDH из археи *Thermococcus sibiricus* 25% и 30%, соответственно. Исследования ведутся с рекомбинантными белками, которые нарабатываются в клетках *E. coli* и далее выделяются до гомогенного состояния хроматографическими методами. По данным гель-фильтрации обе SDH представляют собой тетрамеры с молекулярным весом 120 кДа (Pcryo0132) и 121 кДа (Pcryo1188). Оптимальные условия реакции с бутандионом определены для Pcryo0132 и составляют $t=30^{\circ}\text{C}$ pH=7,5. Наибольшая активность Pcryo0132 наблюдается с дикетонами в реакции с NADPH. Работа поддержана грантом РНФ № 14-24-00172 (в части выделения и биохимии ферментов).

1. Magomedova et al, J. Biotech. (2016) 221:78-90. 2. Bakermans et al, IJSEM. (2006) 56: 1285–1291.

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ СКРИНИНГА КОМБИНАТОРНЫХ БИБЛИОТЕК ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ПОИСКА ПРОТЕАЗ С ЗАДАННОЙ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ

Т.В. Бобик, Н.Н. Костин, Н.А. Пономаренко, А.Г. Габибов

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Одной из интереснейших задач, имеющих большое прикладное значение в области современной фармацевтики, остается получение протеолитических ферментов с заданной или измененной субстратной специфичностью. Возможность отбирать наиболее подходящие варианты протеолитических ферментов из библиотек, например методом фагового дисплея, открывает быстрый путь поиска новых фармацевтических агентов, предоставляет возможность для направленной эволюции известных биокатализаторов и обнаружение ферментов *de novo*. В основе предлагаемой нами системы скрининга протеолитической активности лежит использование в качестве «субстрата-ловушки» модифицированного белка С4 компонента комплемента человека (С4), с введенной последовательностью для сайт-специфического гидролиза целевой протеазой. Протеолиз С4 внутри данной последовательности приводит к изменению конформации С4, в результате чего между фрагментом С4 и поверхностью частицы (например фага или эукариотической клетки), несущей целевую протеазу, образуется ковалентная связь, что делает возможным отбор «меченных» частиц методами иммунопреципитации или FACS. Апробацию предложенной системы проводили на примере каталитического домена энтеропептидазы человека (ЕК). Энтеропептидаза (ЕС 3.4.21.9) – сериновая протеаза, активирующая трипсиноген за счет отщепления N-концевого пептида после последовательности сайта узнавания D4K. Нами было показано, что ЕК, экспонированная на поверхность бактериофага M13, эффективно расщепляет химерные белки, содержащие последовательность D4K. Для демонстрации перспективности применения данной системы для отбора целевых протеаз из библиотек широкого репертуара мы провели по одному раунду отбора из смесей фагов с различным соотношением хелперных и ЕК-фагов в присутствии С4, содержащего последовательность D4K. Полученные результаты позволяют утверждать, что эффективность предложенной системы отбора позволяет отбирать протеолитические ферменты из библиотек с репертуаром до 10^9 . Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 14-50-00131.

СОЗДАНИЕ НОВЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ, КАТАЛИЗИРУЮЩИХ ГИДРОЛИЗ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

А.В. Степанова¹, С.С. Терехов¹, О.В. Карцева², И.В. Смирнов^{1,2} ¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Бутирилхолинэстераза (БухЭ) – это сериновая гидролаза в норме обнаруживаемая в плазме крови человека. Этот фермент обладает способностью связывать или гидролизовать большинство субстратов ацетилхолинэстеразы, а так же специфически связывать фосфорорганические токсины (ФОТ). Эта способность делает бутирилхолинэстеразу главным кандидатом на роль биологического антидота нового поколения для терапии и профилактики отравлений этими соединениями.

Нами была создана библиотека БухЭ, в которой были заменены аминокислотные остатки ацил-связывающей петли 284-TPLSV-288, сильно варьирующей у разных организмов и представляющей собой естественную область для мутагенеза. Библиотека мутантов БухЭ была экспонирована на поверхности дрожжевых клеток. Далее с помощью двойных микрофлюидных эмульсий и проточной цитофлуориметрии был проведен раунд отбора библиотеки с использованием двух модельных ФОТ – пестицида параоксон и флуоресцентного аналога зомана. В результате отбора были получены мутанты, обладающие протективной способностью по отношению к параоксону и флуоресцентному аналогу зомана. Дальнейшие эксперименты с использованием отобранных мутантов, полученных в виде чистых белков, показали, что селекция пошла по двум разным направлениям: часть мутантов обладает способностью катализировать гидролиз использованных для отбора ФОТ, другая часть обладает низкой аффинностью по отношению к параоксону и флуоресцентному аналогу зомана, в случае одного из мутантов наблюдалась комбинация обоих путей. Исследования были проведены в рамках проекта Минобрнауки России № RFMEFI60414X0069.

Н-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОРМЫ ЦЕЛЛОБИОГИДРОЛАЗЫ I *PENICILLIUM CANESCENS*

А.С. Доценко, П.В. Волков, Д.О. Осипов, А.В. Гусаков, А.М. Рожкова

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Создание ферментных препаратов, полученных на основе грибных штаммов, для эффективной биотехнологической переработки растительного сырья часто требует осуществить перенос генов карбогидраз между различными микроорганизмами. При этом карбогидразы, экспрессированные в разных микроорганизмах, могут характеризоваться разной степенью гликозилирования. Целью данной работы было осуществление гетерологичной экспрессии целлобиогидролазы I (ЦБГ) *Penicillium canescens* в *Penicillium verruculosum* и сравнение гликозилирования нативной и рекомбинантной форм ЦБГ. Масс-спектрометрическим анализом нативной формы ЦБГ, экспрессированной в *P. canescens*, и рекомбинантной формы ЦБГ, экспрессированной в *P. verruculosum*, была подтверждена аминокислотная последовательность ЦБГ, также масс-спектрометрическим анализом были определены сайты N-гликозилирования и структуры N-связанных гликанов. Нативная и рекомбинантная формы ЦБГ характеризовались одинаковой степенью N-гликозилирования. И в структуре нативной, и в

структуре рекомбинантной формы ЦБГ было обнаружено три сайта N-гликозилирования: Asn113, Asn391 и Asn434. N-связанные гликаны представляли собой высокоманнозные олигосахариды структуры (Man) x (GlcNAc) $_2$, где x составлял 4–14 для сайта Asn113, 2–14 – для сайта Asn391 и 5–14 – для сайта Asn434. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (идентификационный номер проекта RFMEFI61614X0002).

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ КАТАЛИТИЧЕСКОГО АНТИТЕЛА A5, МЕТАБОЛИЗИРУЮЩЕГО ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

Ю.А. Мокрушина¹, С.О. Пипия², И.В. Смирнов^{1,3}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ³Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Создание искусственных биокатализаторов заданной специфичности является одной из интересных задач современной энзимологии и биотехнологии. Исследования ферментативных механизмов протекания реакции в белковых структурах, эволюционно не предназначенных для катализа, позволит глубже проникнуть в принципы организации биокатализаторов. Каталитическое антитело A5 было отобрано из полусинтетической полусинтетической библиотеки варьируемых фрагментов генов иммуноглобулинов человека с использованием п-нитрофенил-8-метил-8-азабицикло[3.2.1] октанфенилфосфоната (фосфонат X). Методами масс-спектрометрии установлено, что ковалентной модификации подвергается остаток Y33 легкой цепи. Масс-спектрометрические исследования были подтверждены с помощью сайт-направленного мутагенеза. Были созданы генетические конструкции для экспрессии Fab-фрагмента антитела A5 в дрожжевой системе *Pichia pastoris*. После очистки и хроматографической очистки был проведен структурно-функциональный анализ каталитического антитела A5 и его иммунокомплексов с лигандами. Установлены основные элементы структуры активного центра FabA5. Установлено, что в результате модификации FabA5 $_k$ арил-фосфонатом в активном центре происходят значительные конформационные изменения. Установлена исключительная специфичность антитела A5 к арил-фосфонату X, в то время как активностей к субстратам параоксонового ряда обнаружено не было. Были определены кинетические параметры реакции взаимодействия антител FabA5 $_k$ и FabA5 $_{\lambda}$ с арил-фосфонатом. Исследования были проведены в рамках проекта Минобрнауки России № RFMEFI61614X0009.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМЫХ МИКРОФЛЮИДНЫХ ДВОЙНЫХ ЭМУЛЬСИЙ ДЛЯ СКРИНИНГА ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ НА УРОВНЕ ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК

С.С. Терехов¹, А.А. Степанова¹, Т.В. Бобик^{1,2}, Н.А. Пономаренко¹, И.В. Смирнов^{1,2} ¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Создание ферментов с заданными свойствами является одной из наиболее актуальных проблем современной биотехнологии и биомедицины. Наиболее эффективным подходом к решению этой проблемы является направленная эволюция ферментов. В основе направленной эволюции лежит использование методов белкового моделирования и высокопроизводительного скрининга отобранных кандидатов. Для создания высокоэффективной системы скрининга ферментативной активности мы использовали принцип компартиментализации в каплях микрофлюидной двойной эмульсии. Микрофлюидная компартиментализация позволяет заключать отдельные живые клетки в индивидуальные микроконтейнеры – капли эмульсии одинакового размера. Биосовместимость эмульсии в свою очередь позволяет обеспечить выживаемость клеток в каплях. Мы показали, что инкапсуляция индивидуальных дрожжевых клеток, несущих на своей поверхности закрепленные протеолитические и эстеразные ферменты, вместе с соответствующими флуорогенными субстратами приводит к селективному протеканию ферментативных реакций в каплях. Отбор капель, обладающих наибольшим уровнем флуоресценции, с использованием клеточного сортера приводит к обогащению активными клетками с эффективностью, близкой к теоретическому максимуму за один раунд скрининга. Флуоресценция капель напрямую зависит от активности инкапсулированных клеток, что позволяет отбирать биокатализаторы с разным уровнем ферментативной активности. Таким образом, полученные нами результаты демонстрируют уникальные возможности биосовместимых микрофлюидных двойных эмульсий для поиска и создания новых биокатализаторов. Исследования были проведены в рамках проекта РФФ № 14-50-00131.

ЦЕЛЬНОКЛЕТОЧНЫЕ БИОКАТАЛИЗАТОРЫ С ЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ НА ОСНОВЕ АУТОТРАНСПОРТЕРА *PSYCHROBACTER CRYOHALOLENTIS* K5T

Л.Е. Петровская¹, Е.А. Крюкова¹, А.В. Злобинов², Л.Н. Шингарова¹, Д.А. Долгих^{1,2} ¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Аутотранспортёры (АТ) представляют собой семейство белков внешней мембраны Грам-отрицательных бактерий, использующих для транспорта белков на поверхность клеток систему секреции V типа. АТ состоят из N-концевого пассажирского и C-концевого транслокаторного доменов, соединенных альфа-спиральным сегментом. Экспонированные на поверхности пассажирские домены могут обладать различными активностями, включая ферментативную, и участвуют в колонизации тканей, формировании биопленок и других процессах, связанных с выживанием. Объектом исследования в нашей работе является АТ Грам-отрицательной бактерии *Psychrobacter cryohalolentis* K5T, содержащий пассажирский домен с эстеразной активностью. На основании гомологии аминокислотных последовательностей установлено, что пассажирский домен АТ877 представлен липазой, относящейся к семейству GDSL. Проведены амплификация и клонирование гена АТ877 в вектор для экспрессии в клетках *E. coli*. Установлено, что продукт экспрессии локализован во внешней мембране бактериальных клеток. Обнаружено, что рекомбинантный аутотранспортёр обладает максимальной эстеразной активностью при 50°C по отношению к субстратам со средней длиной углеводной цепи (C8–C10). Получен рекомбинантный аутотранспортёр, содержащий замену природного пассажирского домена на эстеразу EstPc *P. cryohalolentis*. Установлено, что гибридный белок экспонирован на поверхности клеток и демонстрирует каталитические свойства, характерные для фермента EstPc. Таким образом, на основании предварительных исследований можно утверждать, что АТ877 является представителем семейства аутотранспортёров и может быть потенциально использован для создания гетерологичных систем клеточного дисплея пассажирских доменов. Работа проводится при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-04-00717, НШ-8384.2016.4.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ И АЛЛЕРГИЗИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*

А.А. Волчок, А.А. Торкова, А.М. Рожкова, И.Н. Зоров, А.П. Синицын

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Создание новых ферментных препаратов для применения в пищевой промышленности на основе культуральной жидкости рекомбинантных штаммов микроскопических грибов связано с необходимостью выявления рисков использования таких ферментных препаратов. Под рисками, в данном случае, подразумевается потенциальное наличие микотоксинов, а также аллергенность белков, входящих в состав мультиферментных комплексов. Проведенная работа была направлена на исследование токсических и аллергизирующих свойств ферментного препарата ВІ 7.7, ранее полученного на основе рекомбинантного штамма-продуцента гриба *Penicillium verruculosum* PB7. Ферментный препарат ВІ 7.7 содержал гомологичные целлюлазы, гетерологичные пектинлиазу и β -глюкозидазу и был предназначен для использования в соковой и винодельческой промышленности при необходимости повышения выхода сока из плодовой мякоти, интенсификации прессования и фильтрации сока и корректировки реологических свойств продукта. В ходе работы использовали метод иммуноферментного анализа для детектирования охратоксина А и ряда афлатоксинов в составе ферментного препарата. Испытания аллергизирующих свойств препарата и определение его ЛД₅₀ проводили с использованием половозрелых самцов крыс линий Wistar и Norway Brown. В исследуемом ферментном препарате было обнаружено повышенное содержание афлатоксинов, очистку от которых удалось провести путем ультрафильтрации растворов ферментного препарата. По результатам определения острой токсичности ферментный препарат ВІ 7.7 был отнесен к IV классу опасности (вещества малоопасные) по степени воздействия на организм согласно ГОСТ 12.1.007-76 (ЛД₅₀ превышает 5 г/кг веса животного). Влияние ферментного препарата и пути его введения на состояние, внешний вид и функционирование внутренних органов у опытных животных установлено не было. Ферментный препарат не обладал аллергизирующими свойствами, выявляемыми в реакции иммунных комплексов. Сенсибилизация крыс ферментным препаратом (350 мг белка/кг веса) посредством внутрижелудочного введения в течение 42 дней не оказала негативного влияния на эпителий тонкого кишечника, компонентный состав крови крыс не показал различий между опытными и контрольной группами животных. *Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России (идентификационный номер проекта RFMEFI60714X0050).*

ИССЛЕДОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ РАСТЕНИЙ И ЭРИТРОЦИТОВ, А ТАКЖЕ ГЕТЕРОЛИГАНДНЫХ КОМПЛЕКСОВ Fe(Ni) ДИОКСИГЕНАЗ МЕТОДОМ АСМ

В.И. Бинюков, Е.М. Миль, А.А. Албантова, И.В. Жигачева, Л.И. Матиенко

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

Метод АСМ был использован нами для количественной оценки размерных параметров растительных митохондрий (6-дневных проростков гороха) и эритроцитов мышей. Для фиксирования измеряемых образцов использовали 2% глутаровый альдегид (митохондрии обрабатывали в течение 5 мин, эритроциты – 30 мин). Все процедуры проводили в мокром состоянии на кремниевой подложке или переводили на кремниевую подложку, промывали дистиллированной водой и подсушивали на воздухе. Работу проводили на приборе SOLVER P47 SMENA, на частоте 150 кГц в полуконтактном режиме, с использованием кантилевера NSG 11. При определении объема и других параметров проводилась статистическая обработка результатов с помощью программ Image Analyzis и Statistica 6.

У высших растений митохондрии одиночны и имеют либо сферическую, либо цилиндрическую форму, причем митохондрии проростков гороха (*Pisum sativum*) имеют диаметр 1–2 мкм. Исследовали изменение морфологии митохондрий под действием 2-дневного дефицита воды при температуре 14°C, с последующим восстановлением при 22°C. При этом объем АСМ имиджа митохондрий и площадь, регистрировали на высоте сечения имиджа 30 нм. Статистический анализ показал, что в этих условиях происходит увеличение размерных параметров и набухание митохондрий 6-дневных проростков гороха, которое предотвращалось предварительным замачиванием семян в растворах регуляторов роста растений мелафена (2×10^{-12} М) или герматрана (10^{-5} М). В этом случае размерные параметры митохондрий приближались к контрольным.

Установлено, что метод АСМ может быть использован для обнаружения изменений функционального состояния эритроцитов на примере морфо-структурных изменений эритроцитов мыши при воздействии антиоксидантов, а также при гликолитическом голодании в течение 4 ч. Размерные параметры эритроцитов (V, S, Z) уменьшались при инкубации в буфере без глюкозы к 4 ч и в то же время сохранялись близкими к контрольным при инкубации в буфере, содержащем 10 мМ глюкозы.

Метод был применен также для исследования стабильных супрамолекулярных наноструктур, основанных на каталитически активных никель и железо гетеролигандных комплексах, образующих с участием Н-связей, как функциональной модели для изучения Fe(Ni) диоксигеназ, участвующих в метианиновом цикле, с образованием СО или метионина.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАРКЕРОВ АПОПТОЗА P53 И BCL-2 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ОНКОБОЛЬНЫХ

Е.М. Миль, А.А. Албантова, Д.Б. Корман *Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия*

В последние десятилетия отмечается рост и развитие онкологических заболеваний, что связано как с ухудшением социально-экономических условий, распространением табакокурения, а также загрязнением окружающей среды. В настоящее время все большее применение находит метод определения значения маркера p53 в сыворотке крови. В 2005 г. нами впервые у больных раком молочной железы методом иммунофореза был обнаружен высокий уровень белка p53 и определено содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови после комбинированной химиотерапии. Больные РМЖ III–IV степени в возрасте 36–70 лет были обследованы до лечения и после двух курсов комбинированной химиотерапии, включающих доксорубицин. Лечение способствовало торможению опухолевого процесса за счет апоптоза клеток опухоли, и существенно зависело от возраста пациентки. У пациентов среднего возраста (36–54) отмечался увеличение уровня p53, регулирующего как процессы апоптоза, так и процессы репарации. Так, было зафиксировано изменение ряда иммуноглобулинов: снижение IgA и возрастание IgM и IgG, что может позволить лимфоцитам избежать апоптоза (подобно вторичному иммунному ответу). У пациенток пожилого возраста (61–70) лет, отмечено плохое самочувствие и снижение уровня белка p53 (17–25%). При этом у всех больных этой группы наблюдалось возрастание IgM и снижение IgG и IgA (подобно первичному иммунному ответу).

Курильщики находятся в зоне риска по частоте возникновения рака легких и дыхательных путей, при которых наблюдаются замещения в гене P53. По литературным данным, в клетках рака легкого обнаружено повышение основных маркеров bcl-2 и p53 в 27% случаев и 51% соответственно. В нашей в работе эти параметры были исследованы в сыворотке крови среды: некурящих, бывших курильщиков и сильно курящих пациентов, а также онкологических больных с раком гортани и дыхательных путей. Показано, что у пациентов с онкологией уровень белка p53 был существенно выше, чем у здоровых доноров, и более чем в 3 раза ($p=0,0002$) превышал уровень p53 в группе здоровых. В то же время уровень антиапоптозного белка bcl-2 у онкологических больных не отличается от уровня bcl-2 в группах здоровых доноров, но был выше у сильно курящих здоровых пациентов.

ТЕРМОСТАБИЛЬНАЯ АМИНОТРАНСФЕРАЗА ИЗ *THERMOBACULUM TERRENUM* КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ БИОКАТАЛИЗАТОР ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

А.Ю. Николаева^{1,2}, Д.В. Диброва³, Т.В. Ракитина², Е.Ю. Безсуднова¹, В.О. Попов^{1,2}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²НИЦ «Курчатовский институт»;

³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

R-селективные трансаминазы являются перспективными биокатализаторами стереоселективного аминирования кетонов для получения оптически чистых R-аминов, являющихся строительными блоками в синтезе ряда фармпрепаратов. Биотехнологически значимой оказывается идентификация таких ферментов в геномах термофильных бактерий и архей, поскольку ферменты из экстремофильных организмов обладают улучшенными операционными свойствами, такими как высокая термостабильность, устойчивость к органическим растворителям, устойчивость при критических значениях pH и т. д. [1]. R-селективные трансаминазы относятся к IV типу фолда PLP-связывающих ферментов и вместе с трансаминазами разветвленных аминокислот объединены в IV семейство трансаминаз. Нами была идентифицирована трансаминаза IV семейства в геноме *Thermobaculum terrenum* – термофильной грамм-положительной бактерии, изолированной из высокотемпературных почв Йеллоустонского заповедника. Рекомбинантная аминотрансфераза Tter798 клонирована, выделена и функционально охарактеризована. Tter798 имеет высокий температурный оптимум активности (85°C) в реакции с 5 mM L-лейцином и 1 mM 2-оксоглутаратом в фосфатном буфере pH 8.0 с добавлением хлорида натрия 100mM, обладает высокой термостабильностью и активен в широком диапазоне pH, с оптимум активности при pH 8.0. Трансаминаза Tter798 активна с разветвленными аминокислотами (L-лейцин, L-валин, L-изолейцин), проявляет слабую активность в отношении ароматических аминокислот и не активна с D-аланином. Наиболее эффективными кето-акцепторами, кроме кетоаналогов разветвленных аминокислот, являются 2-оксоглутарат и пируват. Трансаминаза Tter798 катализирует деаминирование R-альфа-метил-бензиламина (R-MBA) в реакции с 2-оксоглутаратом, активность при 60°C и pH 8.0 составляет 60 нмоль/мг*мин. Активность с S-MBA в этих же условиях составляет менее 1 нмоль/мг*мин. Несмотря на то, что данное значение ниже значения активности для известных R-селективных трансаминаз из грибов [2], высокая энантиоспецифичность и термостабильность делает выделенный фермент потенциально интересным объектом для применения в биотехнологических процессах. Работа частично поддержана грантом РФФИ № 14-24-00172.

1. Lasa et al (1993) Microbiologia. 9(2):77-89.
2. Höhne et al (2010) Nat Chem Biol. 6(11):807-13.

ПОТРЕБЛЕНИЕ КИСЛОРОДА ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ АЭРОБНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ КАК ПОДХОД ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ, РАСТВОРИМЫХ В ВОДЕ

Т.Н. Кувичкина, А.Н. Решетилев Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН

Взаимодействие некоторых низкомолекулярных органических соединений, растворимых в воде, с аэробными микроорганизмами приводит к изменению их дыхательной активности, обусловленной, в том числе, окислением соединений оксидоредуктазами микроорганизмов с потреблением молекулярного кислорода. Это свойство микроорганизмов может быть изучено с использованием биосенсорной техники. Целью работы являлось определение скорости потребления кислорода клетками аэробных микроорганизмов для создания моделей биосенсоров для определения низкомолекулярных органических соединений (потенциальных загрязнителей), относящихся по химическому строению к разным классам (алифатические и ароматические). Микроорганизмы выращивали в колбах на качалке. Биомассу отделяли, промывали буфером, иммобилизовали методом физической адсорбции или методом включения в гель. Биорецептор фиксировали на кислородном электроде, который служил преобразователем биохимического сигнала в электрический. Подобранные следующие пары "вещество-микроорганизм" для алифатических соединений метанол-*Pichia angusta* BKM Y-2559, тиодигликоль-*Alcaligenes xylosoxydans* subsp. *denitrificans* ТД 2, метиламин-*Methylophilus musalis* BKM B-2646, этилендиаминтетраацетат и диэтиленetriаминпентаацетат-*Chelativorans oligotrophicus* BKM B-2395, а также для моноароматических 2,4-динитрофенола-*Rhodococcus erythropolis* HL PM-I, натриевая соль бензол-1,2-дикарбоновой (орто-фталевой) кислоты-*Glucanobacter oxydans* 9.4 и паратолуолаульфонат-*Comamonas testosteroni* BS 1310 (pBS 1010). Исследовано влияние названных соединений на дыхательную активность подобранных иммобилизованных микроорганизмов. Оценка концентрации соединения в описанных случаях не является высокоспецифической, однако может быть применена для решения ряда аналитических задач. Изучение взаимодействия вещество-микроорганизм может быть полезно как для оценки содержания соединения в водной среде, так и для изучения свойств микроорганизма.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* С ГИПЕРЭКСПРЕССИЕЙ ФИТАЗЫ *PANTOEAE SP. 3.5.1*

А.Д. Сулейманова, Л.Р. Валеева, И.Б. Частухина, М.Р. Шарипова

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Микробные фитазы привлекают внимание биотехнологов для практического использования в животноводстве, сельском хозяйстве и охране окружающей среды. Фитазы в виде кормовой добавки присутствуют примерно в 75% рационов моногастричных животных. Использование фитат-гидролизующих ферментов в медицине также перспективно. В настоящее время

ни одна из известных фитаз не способна быть максимально эффективной для всех видов практических применений. Поэтому необходимо разрабатывать арсенал новых микробных ферментов и способы их продукции. В связи с этим, проводили клонирование гена фитазы *agrP Pantoea sp.* 3.5.1 в вектор pET28a, содержащий в своем составе полигистидиновый таг (6xHis) для анализа экспрессии белка и очистки. Для клонирования гена фитазы в экспрессионный вектор pET28a использовали рестриктазы EcoRI и HindIII, сайты рестрикции для которых имелись на векторе pET28a и в олигонуклеотидах, с помощью которых амплифицировали последовательности гена фитазы. Полученную в результате клонирования конструкцию pET28a/*agrP* трансформировали в клетки *E.coli* DH5α. Отбор трансформантов проводили в стерильных условиях на среде LA с добавлением селективного маркера – канамицина. Для подтверждения результатов клонирования проводили рестрикционный анализ полученных колоний с использованием рестриктаз EcoRI и HindIII и секвенирование плазмид, с олигонуклеотидами T7-promotor, T7-terminator, и олигонуклеотидами к началу и к концу гена *agrP*. Таким образом, подтвердили полное соответствие гена *agrP* на плазмиде pET28a рекомбинантного штамма, гену фитазы *Pantoea sp.* 3.5.1. Для получения экспрессионной системы модифицированной фитазы *AgpP*, провели трансформацию рекомбинантной плазмиды в клетки *E.coli* BL21 pLysS. Трансформантов отбирали на среде LA с добавлением антибиотиков – Km и Cm. Чтобы индуцировать экспрессию фитазы рекомбинантного штамма *E.coli* BL21 pLysS pET28a/*agrP*, в инокулят добавляли IPTG. Экспрессия гена *agrP* в *E.coli* BL21 pLysS подтверждена с помощью электрофореза в ПААГ и иммуноблоттинга с использованием специфических антител к последовательностям 6xHis-тагов, гены которых находятся на векторной молекуле. Молекулярная масса кислой гистидиновой фитазы *Pantoea sp.* 3.5.1. около 55 кДа.

ЭКСПРЕССИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЦЕЛЛЮЛАЗ ИЗ ТЕРМОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *CLOSTRIDIA THERMOCELLUM* В РЕЦИПИЕНТНОМ ГРИБНОМ ШТАММЕ *PENICILLIUM CANESCENS*

А.М. Рожкова¹, А.М. Середа¹, А.В. Чекушина¹, П.В. Волков¹, И.Н. Зоров^{1,2}, И.А. Шашков¹, П. Корнбергер³, С. Хайнц³, В. Шварц³, А.П. Силицын^{1,2} ¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; ²Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ³Технический Университет Мюнхена, Германия

Основной вклад в стоимость технических сахаров при их производстве из целлюлозосодержащего сырья (ЦСС) вносят ферменты и ферментные препараты целлюлаз. Проблему снижения затрат на производство ферментных препаратов, участвующих в процессах биоконверсии ЦСС, можно решать либо за счет повышения продуктивности микроорганизмов, производящих необходимый фермент или комплекс ферментов, либо осуществляя скрининг новых микроорганизмов, продуцирующих новые ферменты с уникальными свойствами, отвечающими потребностям эффективных технологических процессов конверсии ЦСС. В Техническом Университете Мюнхена разработаны новые ферментативные системы, которые имитируют бактериальные ферментные комплексы целлюлаз из термофильной бактерии *Clostridia thermocellum*, характеризующиеся большей эффективностью в процессах биодеградации ЦСС. Однако, получение индивидуальных бактериальных целлюлаз в системах экспрессии бактерий и дрожжей приводит либо к получению каталитически неактивной формы фермента, либо к недостаточной продукции целевого белка. Поэтому актуальной задачей представляется использование эукариотической системы экспрессии грибов *Penicillium canescens*, разработанной и оптимизированной ранее в лаборатории Биотехнологии ферментов ИНБИ РАН, для получения бактериальных целлюлаз типов Cel48S, Cel5L, Cel9R и Cel9T, отличающихся различной специфичностью действия по отношению к целлюлозе. Были синтезированы синтетические гены *celS*, *celL*, *celR* и *celT*, кодирующие соответствующие белки, и сконструированы плазмиды, в которых экспрессия *celS*, *celL*, *celR* и *celT* контролируется сильным индуцибельным промотором ксиланазы A (*xylA*). Плазмиды были трансформированы в протопласты реципиентного гриба *Penicillium canescens* RN3-11-7, полученные рекомбинантные штаммы проанализированы на наличие гетерологичной экспрессии. В случае белков Cel48S и CelL наблюдалась экспрессия, оценочный уровень которой составил 20 и 5%, соответственно, от общего уровня секретируемого белка. Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России (идентификационный номер проекта RFMEFI61614X0002).

ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ЦЕЛЛЮЛАЗ И КСИЛАЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВОЙ ЭКСПРЕССИОННОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ПРОМОТОРА ГЕНА ГЛЮКОАМИЛАЗЫ *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*

Д.А. Мерзлов^{1,2}, А.С. Доценко^{1,2}, А.А. Волчок¹, А.В. Чекушина¹, А.П. Силицын^{1,2}

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Биоконверсия возобновляемого растительного сырья, содержащего преимущественно целлюлозу, гемицеллюлозы и лигнин, является одним из приоритетных направлений современной биотехнологии. Ферментные препараты (ФП) карбогидраз (целлюлаз и гемицеллюлаз) используются для расщепления растительного сырья до простых C5, C6 сахаров, которые затем подвергаются микробной биоконверсии в продукты химической и фармацевтической промышленности (биоспирты, органические кислоты и т. д.). Повышение эффективности стадии ферментативного гидролиза растительного сырья достигается при использовании ФП с сбалансированным соотношением карбогидраз. Микромицет *Penicillium verruculosum*, продуцент высокоактивного комплекса целлюлаз, является перспективной платформой для получения ФП заданного состава. Ранее в лаборатории Биотехнологии ферментов ФИЦ Биотехнологии РАН на основе регуляторных элементов гена *cbhI*, кодирующего основной компонент целлюлазного комплекса целлюлогидролазы I (ЦБГИ) *P. verruculosum*, была разработана система экспрессии, позволяющая получать продуценты гетерологичных ферментов в количестве до 80% от общего секреторного белка. Недостатком такой системы является снижение уровня продукции собственной ЦБГИ. Поэтому создание альтернативной системы экспрессии с использованием менее сильных промоторов и обеспечивающей сохранение основного целлюлазного комплекса при достаточном (10–20%) биосинтезе гетерологичных белков является актуальной задачей. Новая система экспрессии на основе регуляторных областей гена глюкоамилазы (*gla*) *P. verruculosum*, была использована для получения рекомбинантных штаммов продуцентов гетерологичной ксиланазы XylE из *Penicillium canescens*. На основе отобранных штаммов были получены новые комплексные ФП целлюлаз и гемицеллюлаз, изучен их компонентный состав и кинетические свойства. Исследована гидролитическая способность новых ФП по отношению к растительному сырью. Показано, что секреция гетерологичной ксиланазы составляет 10–15% от общего продуцируемого белка в условиях оптимизированной ферментационной схемы.

ВЫЯВЛЕНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНОМАХ ДВУХ ШТАММОВ *BACILLUS PUMILUS*, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ВОЗНИКНОВЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКУ**Ю.В. Данилова, А.А. Тойменцева, Д.С. Баранова, А.М. Марданова, М.Р. Шарипова***Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

Разработка методов по получению суперпродуцентов гидролитических ферментов является актуальной задачей биотехнологии. Известно, что приобретение устойчивости к антибиотикам может привести к повышению ферментативной продуктивности микроорганизмов, вследствие нарушения координации транскрипции и трансляции. С целью получения суперпродуцента гидролитических ферментов штамм *Bacillus pumilus* 7P рассевали на среды с различными антибиотиками. В ходе экспериментов получен производный штамм – *B. pumilus* 3-19 – устойчивый к антибиотикам стрептомицину. При этом установлено увеличение активности ряда гидролитических ферментов. Выявление молекулярных причин увеличения ферментативной активности может привести к разработке технологии получения суперпродуцентов гидролитических ферментов. Биоинформационный анализ однонуклеотидных полиморфизмов в геномах двух штаммов *B. pumilus* (7P и 3-19) против референсного генома *B. pumilus* SH-B9 позволил выявить 20 позиций в геноме штамма 3-19, которые отсутствовали в геноме штамма 7P и приводили к радикальной замене аминокислот. Установлено, что мутация в 56 кодоне гена *grsL*, который кодирует белок S12 30S субъединицы рибосомы, приводит к замене аспарагина на лизин в сайте связывания со стрептомицином. По-видимому, эта мутация является причиной устойчивости штамма 3-19 к антибиотикам стрептомицину. По данным литературы, мутации в гене *grsL* часто приводят к развитию устойчивости бактерий к высоким концентрациям стрептомицина (>100 мкг/мл). Результаты диско-диффузионного метода подтвердили, что штамм 3-19 устойчив к высоким концентрациям стрептомицина (1000–2000 мкг/мл). Среди 20 найденных нуклеотидных замен в геноме штамма 3-19 обнаружена мутация в 185 кодоне гена *groB* (β-субъединица РНК-полимеразы). Известно, что точечные мутации в гене *groB* могут привести к устойчивости к антибиотикам – рифампицину. Однако показано, что штамм 3-19 не способен к росту на питательной среде в присутствии рифампицина (100–2000 мкг/мл), что свидетельствует об отсутствии устойчивости. *Работа поддержана грантом DAAD №57130104, Research Grants for Doctoral Candidates and Young Academics and Scientists, 2015/16.*

ВЛИЯНИЕ ПОЛИСАХАРИДМОНООКСИГЕНАЗ НА АКТИВНОСТЬ ОЧИЩЕННЫХ ЦЕЛЛЮЛАЗ ПРИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ДЕСТРУКЦИИ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ**А.Г. Булахов, А.В. Гусаков, А.В. Чекушина, А.С. Доценко** *ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН;**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Ферментативная деструкция целлюлозосодержащих материалов – важная и актуальная задача современной биотехнологии. Недавно было обнаружено, что помимо гидролаз в секретах плесневых грибов содержатся ферменты, осуществляющие окислительную деструкцию целлюлозы, – полисахаридмонооксигеназы (ПМО). Их небольшая добавка существенно увеличивает эффективность действия комплексных препаратов целлюлаз. Данные ферменты относятся к семейству AA9 и делятся на 3 основных типа: (1) те, что при деструкции окисляют C1-атом ангидроглюкозного остатка целлюлозы, (2) действующие на C4-атом, а также (3) не обладающие строгой региоспецифичностью. Целью работы было исследование взаимодействия ПМО с очищенными целлюлазами: целлобиогидролазами (ЦБГ) I и II *Trichoderma reesei*, эндоглюканазой (ЭГ) II *Penicillium verruculosum* и ЭГ I *Myceliophthora thermophila*. В работе были использованы очищенные рекомбинантные ПМО из грибов *Thielavia terrestris*, *T. reesei*, а также нативная ПМО из *M. thermophila*. Гидролиз целлюлозы под действием индивидуальных целлюлаз проводили в присутствии бета-глюкозидазы *Aspergillus niger*, чтобы конвертировать образующиеся олигосахариды в конечный продукт действия целлюлаз – глюкозу. В качестве донора электронов для ПМО использовали целлобиозодегидрогеназу (ЦДГ) из *M. thermophila*. Все ПМО значительно увеличивали выход глюкозы через 48 ч гидролиза микрокристаллической целлюлозы под действием ЦБГ I и ЦБГ II (до 30%). Однако на начальном этапе реакции (до 5 ч) в ряде случаев наблюдали кажущееся ингибирование целлобиогидролаз добавками ПМО (до 15%). При взаимодействии ПМО с ЭГ I в начальный период реакции также происходило некоторое снижение выхода продукта. С ЭГ II отрицательную кооперативность проявила лишь ПМО *T. terrestris*, однако добавка ПМО *M. thermophila* и ПМО *T. reesei* приводила к увеличению выхода сахаров. *Работа выполнена в соответствии с Государственным заданием (Номер государственной регистрации 0120131359).*

САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ КСИЛАНАЗЫ А *PENICILLIUM CANESCENS***Ю.А. Денисенко, О.А. Сеницына, А.С. Доценко, А.В. Чекушина, А.В. Гусаков** *ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН;**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

CD150 (SLAM, SLAMF1) – трансмембранный гликопротеин массой 70 kDa, который у человека и мыши экспрессируется на поверхности В- и Т-лимфоцитов (на различных стадиях дифференцировки), дендритных клеток, субпопуляций базофилов и макрофагов. Экспрессия SLAMF1 повышается при активации упомянутых клеток, а также при активации моноцитов и тучных клеток. Показано, что нарушение регуляции экспрессии данного белка может приводить к развитию аутоиммунных заболеваний и иммунодефицитных состояний. В результате исследования локуса гена SLAMF1 было выявлено 7 регуляторных элементов, способных усиливать транскрипцию с промотора *slamf1*, в двух из которых (энхансер 5 и энхансер 7) ранее были обнаружены однонуклеотидные полиморфизмы rs3753381 и rs11265455. Менее распространенный (минорный) вариант полиморфизма rs3753381 (G→A) ассоциирован с повышенным риском развития миастении Грависа, в то время как наиболее распространенный (мажорный) вариант rs11265455 повышает риск развития сахарного диабета 2 типа. Функциональный анализ энхансеров гена SLAMF1 продемонстрировал, что полиморфизмы rs3753381 и rs11265455 оказывают значительное влияние на активность промотора в системе с геном-репортером. Также интересно, что влияние различных вариантов полиморфизмов наиболее заметно проявляется в В-клеточной линии Raji (лимфома Бёркитта) и в клеточной линии MP-1 (В-лимфобластная лимфома). Можно предположить, что изменение экспрессии SLAMF1 в В-клетках напрямую или опосредованно связано с увеличенным риском развития миастении Грависа и сахарного диабета 2 типа.

**ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ НУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ.
РОЛЬ ФОСФАТ-СВЯЗЫВАЮЩЕЙ ОБЛАСТИ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ УРИДИНФОСФОРИЛАЗЫ**

Н.Н. Мордкович¹, Т.Н. Сафонова¹, В.А. Манувер², К.М. Поляков³, Н.А. Окорокова¹, В.П. Вейко¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА; ³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Уридинфосфоорилаза (UDP, КФ 2.4.2.3) – фермент катаболизма нуклеозидов, осуществляющий обратимый фосфорилиз уридина до урацила и рибозо-1-фосфата. Были клонированы гены *udp* из *E. coli*, *S. thyphimurium*, *K. aerogenes* и *S. oneidensis*, получена серия их мутантных и гибридных форм и проведен сравнительный анализ свойств белков. Рентгеноструктурным анализом (РСА) UDP из *S. oneidensis* определены аминокислотные остатки (а.о.), формирующие центры связывания субстратов – уридина (Urd) и иона неорганического фосфата (Pi). Показана общность структур этих центров связывания UDP у протеобактерий. Для выявления особенностей функционирования сайта связывания Pi получены мутантные формы UDP из *S. oneidensis*: C212S, T91S и T91A. Методом РСА показано, что мутация C212S вызывает изменение положения а.о. E193, ведущее к ослаблению его связи с а.о. R88 и нарушению связи R88 с сульфат-ионом (миметик Pi). Эти изменения в структуре активного центра приводят к понижению сродства C212S к Pi в сравнении с ферментом дикого типа ($K_m = 16.1$ и 5.1 мМ, соответственно), в то время как K_m по Urd не изменяется ($K_m = 0.24$ и 0.23 мМ, соответственно). РСА мутанта C212S и фермента дикого типа позволил выявить и объяснить согласованное действие двух субъединиц функционального димера. С помощью РСА выявлено, что а.о. T91 осуществляет непосредственный контакт с обоими субстратами. Исследование свойств мутантов T91S и T91A показали, что в первом случае активность UDP сохраняется, а во втором – нет. Получены кристаллы этих мутантных форм UDP и изучена их пространственная структура. На основе изучения физико-химических, ферментативных свойств и РСА этих белков обнаружены особенности функционирования как сайта связывания Pi в UDP, так и осуществления каталитического фосфорилиза уридина этим белком. *Исследование выполнено при поддержке РФФИ (Грант №15-04-08440) и Российского научного фонда (Грант №14-24-00172).*

МУТАНТНЫЕ ФОРМЫ L-АСПАРАГИНАЗЫ I КЛАССА RHODOSPIRILLUM RUBRUM

М.А. Покровская¹, М.А. Эльдаров², В.С. Покровский¹, С.С. Александрова¹, О.В. Подобед¹, Д.В. Гришин¹, О.Ю. Абакумова¹, Ю.А. Гладилина¹, Н.Н. Соколов¹

¹НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

Бактериальные L-аспарагиназы II класса (КФ 3.5.1.1.) из *Escherichia coli* и *Erwinia chrysanthemi* в течение более 40 лет успешно применяются в комбинированной химиотерапии лимфопролиферативных заболеваний и лимфом. Ранее нами была выделена L-аспарагиназа *Rhodospirillum rubrum* (RrA), первая цитоплазматическая аспарагиназа I класса, обладающая антипролиферативным действием *in vitro* на чувствительных к L-аспарагиназам лейкозных клетках и получен рекомбинантный продуцент этого фермента. С целью идентификации функционально важных районов белковой молекулы RrA и улучшения её терапевтических свойств методом сайт-направленного мутагенеза получено 10 многоточечных мутантных форм рекомбинантного фермента, пять из которых (RrAD, RrAE, RrAC, RrAB, RrAJ) было выделено в функционально-активном высокоочищенном состоянии. Очистку мутантных форм проводили с помощью колоночной хроматографии на Q-Sepharose and и DEAE-Toyopearl. Выход ферментов варьировал от 70 до 80%, а их уд. активность составляла 140–210 МЕ/мг белка. L-Глутаминазная активность выделенных препаратов мутантных форм не превышала 0,01% от L-аспарагиназной активности. Мутации G86P, D88H, M90K (RrAH), G121L, D123A (RrAI) приводили к снижению энзиматической активности, что подтверждает важность этих районов для катализа. Удаление 4-х аминокислотных остатков с C-конца мутанта (RrAK) вызывало нестабильность активности фермента. Структурные изменения D60K, F61L(RrAD) и R118H, G120R(RrAJ) стабилизировали активность L-аспарагиназы. Мутации E149R, V150P(RrAB) повышали противоопухолевую и цитотоксическую активность фермента *in vitro*, а мутации A64V, E67K, в сочетании с E149R, V150P(RrAE) дестабилизировали L-аспарагиназу. У мутантных форм RrA не обнаружено сдвига оптимума pH в область физиологических значений. Таким образом, изучение физико-химических, биологических и структурных свойств мутантных форм генно-инженерной L-аспарагиназы RrA, компьютерное моделирование пространственной структуры фермента позволило выявить ряд функционально важных участков белковой молекулы и показало возможность целенаправленного изменения его физико-химических, кинетических свойств и улучшения противоопухолевого эффекта. *Работа выполнена при финансовой поддержке грантов МНТЦ №2828, РФФИ №14-04-00325a и РФФИ и Правительства Москвы №15-34-70020 «мол_а_мос».*

ГУМИНОВЫЕ КИСЛОТЫ – МЕДИАТОРЫ ОКИСЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ

Е.В. Емельянова – Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН, Пущино, Россия

Гуминовые вещества (ГВ) представляют собой сложную смесь природных органических соединений, образующихся при разложении отмерших растений и их гумификации. Прежде всего, это гумусовые кислоты, состоящие из гуминовых кислот (ГК), фульвокислот и гиматомелановых кислот. Для изучения функций ГВ применяют не только традиционные методологические подходы, но и биосенсорную методику. В лаборатории биосенсоров ИБФМ РАН было показано, что адаптация с помощью гуминовых веществ позволяет изменять чувствительность микробных биосенсоров. Кроме того, обнаружен эффект увеличения ответа глюкозооксидазного (ГОД) сенсора в присутствии ГВ. Глюкозооксидаза представляет собой FAD-содержащий фермент, катализирующий окисление глюкозы в глюконовую кислоту: Глюкоза + O₂ + H₂O = Глюконовая кислота + H₂O₂. В каталитическом цикле флавиновая простетическая группа сначала восстанавливается глюкозой и затем реокисляется молекулярным кислородом: GOD/FADH₂ + O₂ → GOD/FAD + H₂O₂. Молекулярный кислород является физиологическим акцептором электронов. Таким образом, при окислении выполняется соотношение: 1 моль глюкозы → потребляется 1 моль O₂ (образуется 1 моль H₂O₂). Поэтому при [ГОД] >> [S], где S – субстрат ГОД (глюкоза), глюкозу определяют по расходу кислорода под действием глюкозооксидазы. При последующем окислении образовавшейся перекиси 50% потребленного кислорода возвращается в реакционную смесь: 2H₂O₂ = 2H₂O + O₂. В этом случае при окислении глюкозы с помощью ГОД выполняется следующее соотношение: 1 моль глюкозы → потребляется 0,5 моля O₂. В амперометрических биосенсорах нередко используют нефизиологические акцепторы электронов – медиаторы. Высказано предположение, что увеличение

ответа ГОД сенсора в присутствии ГВ обусловлено тем, что ГК выступают в роли медиатора. ГК (медиатор в восстановленной форме) не реагировали с O_2 и с окисленной простетической группой ГОД. В подтверждение предположения выполнялось соотношение – 1 моль глюкозы → потребляется 0.5 моля O_2 . Вероятно, ГК, выступая в роли медиатора, облегчают перенос электронов на кислород. Это ещё один из возможных механизмов проявления биологической активности ГВ.

СЕЛЕКТИВНАЯ ЭЛИМИНАЦИЯ БЕЛКОВ В РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

Ю.С. Панина, Л.Г. Малошенко, И.А. Абдеева, Г.В. Погорелко, С.А. Брускин

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

Селективная элиминация белковых молекул очень важный и перспективный метод для изучения биологических систем и функций генов, поскольку позволяет направленно деградировать определенные изоформы или посттрансляционно-модифицированные формы белка, не затрагивая другие формы полипептидной цепи. Известно, что клетки эукариот в целом, и растений в частности, обладают способностью к направленной деградации абберантных белков, например, с помощью убиквитинирования — посттрансляционного присоединения убиквитин-лигазами одного или нескольких мономеров убиквитина с помощью ковалентной связи к боковым аминокислотным группам белка-мишени и последующей деградации таких белков в протеасомах. Нами разработан метод направленной деградации внутриклеточных белков в растениях за счет использования убиквитинового системы клетки. Для этого одна из Е3 убиквитин-лигаз *A. thaliana* была модифицирована таким образом, что вместо своего собственного субстрата стала узнавать белок GFP и осуществлять его убиквитинирование и направленную деградацию убиквитин-протеасомной системой клетки растений. Разработанный способ селективной элиминации белков может быть использован не только для фундаментальных, но и для прикладных исследований. Перспективным является его применение для таргетной элиминации факторов вирулентности патогенов, попадающих в организм при заражении, что позволит получить абсолютно новый класс растений, устойчивых к патогенам. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №15-04-09365.

ГИБРИДНЫЙ БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ПОРИН С ФОСФАТАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Н.С. Буйновская, Л.А. Балабанова, О.Ю. Портнягина, В.А. Голотин, О.Д. Новикова, В.А. Рассказов

Тихоокеанский институт биоорганической химии, Владивосток, Россия

Псевдотуберкулез относится к числу широко распространенных и труднодиагностируемых инфекций в России, в основном среди детей в возрасте до 14 лет. Усовершенствование методов диагностики иерсиниозов на ранних стадиях развития инфекционного процесса на основе видо- и родо-специфических антигенов до сих пор остается актуальной задачей. Методом слияния генов мембранного порообразующего белка патогенной бактерии *Yersinia pseudotuberculosis* (OmpF) и щелочной фосфатазы морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 296 получен рекомбинантный гибридный бифункциональный порин с фосфатазной активностью для целей усовершенствования метода диагностики псевдотуберкулеза, в котором модуль OmpF выступает в качестве диагностического антигена возбудителя псевдотуберкулеза. Плазмидный вектор для экспрессии рекомбинантного гибрида, полученный на основе pET 40b (+), позволяет получать до 10 мг/л растворимого не деградированного полипептида CmAP/OmpF с сохранением как антигенных свойств порина OmpF, так и ферментативных свойств высокоактивной щелочной фосфатазы CmAP, используемой для цветной визуализации порин-связанных комплексов. Результаты использования гибридного бифункционального порина в иммуноферментном анализе показали его высокую реактивность как в отношении очищенных антител к рекомбинантному порину OmpF, так и к сыворотке больных вторично-очаговым иерсиниозом. Разработанная диагностическая тест-система с использованием гибридного бифункционального порина в концентрации 5 мкг/мл и активностью щелочной фосфатазы 500 ед/мг позволяет определять в сыворотках больных антитела ко всем вариантам возбудителя псевдотуберкулеза на ранних стадиях развития инфекционного процесса.

1. Портнягина О.Ю., Новикова О.Д., Вострикова О.П., Хоменко В.А., Соловьева Т.Ф. Бактериальные порины как перспективные антигены для диагностики и вакцинопрофилактики инфекционных заболеваний // Вестник Дальневосточного отделения РАН 2004, т. , вып. 3 (Май-Июнь 2004 г.) С. 35-44.
2. Golotin V., Balabanova L., Likhatskaya G., Rasskazov V. Recombinant production and characterization of a highly active alkaline phosphatase from marine bacterium *Cobetia marina* // Mar Biotechnol. 2015. Vol. 17. P. 130–143.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ КОМПЛЕКС ДЛЯ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ ДЕСТРУКЦИИ ПОЛИМЕРОВ МИКРОБНОГО И РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Е.М. Серба, Л.В. Римарева, Н.С. Погаржельская, П.Ю. Мочалина *Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – Филиал «ФИЦ питания и биотехнологии», Москва, Россия*

Для создания конкурентоспособной биотехнологии производства и применения ферментных препаратов для глубокой переработки зернового сырья и вторичных сырьевых ресурсов (ВСР) необходимо получение активного штамма, обладающего по сравнению с промышленным штаммом *Aspergillus oryzae* - продуцентом комплекса протеаз и α -амилазы более высокой продуктивностью по отношению к ферментам, катализирующим гидролиз не только белковых веществ, но и некрахмальных полисахаридов растительных и микробных субстратов.

Во ВНИИПБТ получен мутантный штамм *Aspergillus oryzae* ВКПМ F-981 - один из наиболее активных продуцентов комплекса протеаз. Недостатком этого штамма являлся низкий уровень активности сопутствующих гидролаз. Этот микроорганизм был использован для проведения селекционных работ в качестве родительского штамма. В результате многоступенчатой селекции и мутагенеза получен новый штамм *A. oryzae* 12-84, в котором уровень ферментативной активности при глубинном культивировании превышал уровень активности ферментов родительского штамма: нуклеаз - в 5,8 раз, хитиназы – в 3,0 раза, β -глюканазы – в 1,7 раза, маннаказы – в 1,4 раза. Применение ферментного препарата, полученного с использованием данного штамма, позволяет катализировать глубокий гидролиз зернового и микробного сырья, увеличить выход и качество целевых продуктов, улучшить экологическое состояние перерабатывающих производств. Наиболее характерное практическое применение комплексных препаратов протеолитического, β -глюканазного, нуклеазного, хитиназного и манназного действия связано с повышением эффективности биотехнологических процессов переработки высокомолекулярных полимеров микробной биомассы, в том числе дрожжевой биомассы – отхода бродильных производств, мицелиальной био-

массы – отхода ферментной и микробиологической промышленности. Наличие в комплексе пептидаз, протеиназ, нуклеаз, β -глюканазы, хитиназы и маннаназы позволяет использовать ферментные препараты для глубокого гидролиза микробного сырья с целью получения биологически активных пищевых и кормовых добавок с различными структурно-функциональными свойствами.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА КИСЛОЙ ПРОТЕАЗЫ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *PENICILLIUM CANESCENS* ПРИ СБРАЖИВАНИИ ПШЕНИЧНОГО СУСЛА

И.А. Великорещая¹, А.С. Середа^{1,2}, Е.В. Костылева¹, Л.И. Нефедова¹, Т.Н. Веселкина¹, Н.В. Цурикова¹

¹ФИЦ питания и биотехнологий; ²ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Грибные протеазы широко применяются в технологических процессах переработки белоксодержащего сырья в пищевой промышленности. Использование протеолитических ферментных препаратов (ФП) при производстве спирта способствует повышению физиологической активности дрожжей, улучшает показатели сбраживания сусла, ускоряет брожение и увеличивает выход спирта. Высокой эффективностью для применения в спиртовой промышленности характеризуются ФП кислых грибных протеаз. Было проведено исследование по сбраживанию пшеничного сусла с добавлением протеолитических ФП: лабораторного препарата кислой протеазы ПЕП, полученного на основе рекомбинантного штамма *P. canescens* в сравнении с коммерческим препаратом кислой протеазы ПРОТОФЕРМ FR (Shandong Longda Bio-Products Co., Китай), полученным на основе штамма *Asp. niger*. Разваривание пшеничного замеса при гидромодуле 1:3 проводили совместно с ФП Termamyle SCDC (0,6 ед АС/г крахмала) в течение 1 час при 70°C, далее выдерживали в течение 2 ч при 85–90°C. Протеолитические ФП ПЕП и ПРОТОФЕРМ FR (0,1 ед ПС/г крахмала), и ФП глюкоамилазы Сахзайм (9 ед ГЛС/г крахмала), вносили непосредственно в бродильный чан. Брожение проводили с помощью дрожжей «Ethanol Red» в течение 68 ч при 33–35°C в присутствии пеногасителя Лапрол. Полученные результаты показали, что применение ПЕП на стадии брожения пшеничного сусла позволяет получить выход спирта из 1 т. усл. кр. 67,2 дал., что на 7 дал. выше, чем в контрольном варианте, без использования протеолитических ФП, и находится на одном уровне с результатами, полученными с импортным ФП ПРОТОФЕРМ FR. Концентрация спирта в зрелой бражке в опытных образцах также превышает контрольное значение на 1,23% и составляет 11,1% об. Таким образом, полученные результаты показали перспективность применения ФП ПЕП, полученного на основе рекомбинантного штамма *P. canescens*, в технологическом цикле промышленного производства этанола, а также его конкурентоспособность по отношению к широко применяемому зарубежному препарату протеолитического действия.

ПРОМЫШЛЕННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ УДАЛЕНИЯ АЗОТА ИЗ СТОЧНЫХ ВОД С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОЦЕССА АНАММОКС

Н.В. Пименов¹, А.В. Марданов², А.Ю. Каллистова¹, М.Н. Козлов³, Н.В. Равин², Ю.А. Николаев^{1,3}

¹Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН РАН; ²Институт биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ³АО «Мосводоканал», Москва, Россия

Разработана новая биотехнология удаления аммония из высококонцентрированного (до 800 мг N-NH₄/л) фильтрата сброженного осадка метантенков Курьяновских очистных сооружений (Москва). Технология основана на использовании бактерий анаммокс и создании в биореакторе оптимальных условий для одновременного прохождения двух микробиологических процессов: аэробного окисления части аммония в нитрит (нитритации) и анаэробного окисления оставшейся части аммония нитритом с образованием газообразного азота (анаммокс). Процесс нитритации/анаммокс является высокоэффективным и экономичным, однако в России в промышленных масштабах до сих пор не используется. Оптимальные параметры определяли в течение года на однократной проточной лабораторной установке, состоящей из биореактора полного перемешивания с двумя типами активных илов – иммобилизованным и свободноплавающим флокулированным. В оптимальных условиях (при температуре 35±2°C, концентрации растворенного кислорода – 0,3–0,8 мг/л, pH 7–8, дозе свободноплавающего ила – 1,5 г/л, возрасте свободноплавающего ила – 5–7 сут) эффективность удаления азота и удельная объемная мощность реактора составляли 80% и 800 мг N/л/сут, соответственно. С помощью пиросеквенирования фрагментов гена 16S рРНК исследовали изменение состава бактериального сообщества в ответ на увеличение нагрузки по азоту. Ключевая группа бактерий – анаммокс-бактерии, была представлена несколькими видами. В ходе работы реактора происходило увеличение доли анаммокс-бактерий, близкородственных *Candidatus "Brocadia carolinensis"*. Среди нитрифицирующих бактерий преобладали представители недавно открытой группы *Nitrospirae*, осуществляющей полное окисление аммония до нитрата. Однако по мере нарастания активного ила анаммокс их доля снижалась. Количество бактерий других групп также менялось: значительно возрастала доля бактерий филумов *Ignavibacteria*, *Chloroflexi* и *Acidobacteria*, в то же время доля представителей *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Synergistetes* и др. снижалась. Найденные для лабораторной установки параметры были использованы для масштабирования технологии – запуска пилотного реактора производительностью 20 м³/сут. Работа выполнена из средств ФЦП № 14.607.21.0018 (RFMEFI60714X0018).

БИОТЕХНОЛОГИИ ПЕРЕРАБОТКИ ОТХОДОВ ЦВЕТНОЙ МЕТАЛЛУРГИИ

А.Г. Булаев¹, А.В. Марданов², Н.В. Пименов¹ ¹Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²Институт биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

В мире более 80% производства цветных металлов обеспечивается пирометаллургией. Производство металла сопровождается образованием отходов, хранение которых приводит к загрязнению окружающей среды кислыми стоками, содержащими катионы тяжелых металлов и сульфат-ионы. Развитие биоготехнологий, применимых для переработки отходов обогащения и металлургии, позволит как извлечь ценные компоненты из отходов, так и осуществить ремедиацию территорий, занятых их хранилищами. В ФИЦ «Биотехнологии» РАН были проведены как исследования по извлечению металлов из отходов металлургии, так и работы с целью оптимизации технологий очистки кислых стоков. Было показано, что процессы биоокисления отходов обогащения (хвостов флотации) с использованием ацидофильных микроорганизмов за 100–130 сут позволили достичь извлечения 50–65% меди и цинка и до 60% золота. Растворы выщелачивания лежалых отходов обогащения могут служить источником окислителя – трехвалентного железа, что может быть использовано для процессов химиче-

ского выщелачивания различных продуктов, включая медеплавильные шлаки. Перспективным методом очистки сточных вод от сульфата и металлов являются методы, основанные на использовании сульфатредуцирующих бактерий (СРБ), которые вырабатывают сероводород в биореакторах. Это позволяет осадить содержащиеся в стоках металлы и выделить их в виде товарного продукта (богатого концентрата сульфидов металлов). Трудности применения СРБ связаны с их ингибированием низким pH и ионами металлов. Поэтому изучение разнообразия СРБ и поиск их представителей, устойчивых к неблагоприятным факторам, является основой для совершенствования существующих биотехнологий. Молекулярными методами нами было выявлено присутствие СРБ в микробных сообществах кислых осадков хвостохранилищ добычи тяжелых металлов. Результаты данных исследований позволяют утверждать, что биогидрометаллургические технологии являются перспективным способом решения проблемы металлургических отходов. Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (номер соглашения №14.604.21.0108 (RFMEFI60414X0108)).

НОВАЯ НЕКУЛЬТИВИРУЕМАЯ ЖЕЛЕЗО И СЕРО-ОКИСЛЯЮЩАЯ БАКТЕРИЯ РОДА *GALLIONELLA*, ВЫЯВЛЕННАЯ С ПОМОЩЬЮ АНАЛИЗА МЕТАГЕНОМА КИСЛЫХ ШАХТНЫХ ВОД

В.В. Кадников¹, Д.А. Ивасенко², А.В. Белецкий¹, А.В. Марданов¹, Э.В. Данилова³, Н.В. Пименов⁴, О.В. Карначук², Н.В. Равин¹

¹Институт биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; ²Томский государственный университет, Томск; ³Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ; ⁴Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Дренажные воды, образующиеся в районах добычи металлов, часто характеризуются низким pH вследствие окисления остаточных сульфидов, высоким содержанием растворенных металлов, и представляют собой экстремальные местообитания. Мы проанализировали микробное сообщество дренажных вод в открытом карьере добычи полиметаллических руд на месторождении Шерловая гора в Забайкалье методами метагеномики. Вода была отобрана с глубины 17 метров из скважины ShG14-8 в конце июля 2014г. и имела низкую температуру (6.5°C), кислый pH (2.65) и содержала высокие концентрации железа (434 мг/л), цинка (596 мг/л), кадмия (39 мг/л) и сульфата (3631 мг/л). Метагеномный анализ образца воды показал низкое разнообразие бактерий и отсутствие архей. Более 80% микроорганизмов представлено одной некультивируемой линией, представляющей новый вид бета-протеобактерий рода *Gallionella*. Представителей этой линии ранее детектировали в кислых шахтных дренажах, но на геномном уровне она не была охарактеризована. На основе метагеномных данных определен имеющий размер 3,4 млн нт почти полный композитный геном бактерии новой линии *Gallionella*, описанной нами как *Candidatus Gallionella acididurans* ShG14-8. О полноте генома свидетельствует наличие в нем всех 108 консервативных генов, присутствующих в единичных копиях у бактерий. Анализ генома *Ca. "Gallionella acididurans"* показал, что окисление Fe(II) может, также как и у *Acidithiobacillus ferrooxidans*, осуществляться с участием цитохромов, локализованных на внешней мембране клеток, тогда как *mta* гены, найденные у пресноводных железоокисляющих бактерий отсутствуют. *Ca. "Gallionella acididurans"* характеризуется более разнообразными возможностями метаболизма и лучше адаптирована к загрязнению металлами в кислых местообитаниях, чем ее ближайший родственник *Gallionella capsiferriiformans* ES-2, о чем свидетельствует присутствие путей окисления серы, различного вида терминальных оксидаз, которые могут работать в аэробных и микроаэрофильных условиях и механизмов устойчивости к металлам. Все наши результаты дают понимание о физиологии acidотолерантных линий *Gallionella*, которые представляют доминирующих и биогеохимически важные группы бактерий в холодных кислых местообитаниях с высоким содержанием металлов.

РАСТИТЕЛЬНЫЕ И БАКТЕРИАЛЬНЫЕ АДГЕЗИНЫ В СОЗДАНИИ УСТОЙЧИВЫХ АССОЦИАЦИЙ РАСТЕНИЙ С МИКРООРГАНИЗМАМИ

Ал.Х. Баймиев, З.Р. Вершинина, Л.Р. Нигматуллина Институт биохимии и генетики, Уфа, Россия

Получение устойчивых ризосферных ассоциаций культурных растений с PGPR-бактериями, стимулирующими рост растений и защищающими их от стрессов биотической и абиотической природы является перспективным направлением на пути развития экологически ориентированного сельского хозяйства. Прикорневая зона растений, богатая питательными веществами, выделяемыми корнями, является привлекательным местом обитания для почвенных микроорганизмов. Здесь бактерии, привнесенные в почву в составе биоудобрений, получают достаточно энергии, чтобы синтезировать различные вещества, способствующие росту и защите растений, при условии, что такие бактерии выдержат конкурентную борьбу за экологическую нишу с другими микроорганизмами, необязательно полезными для растения. Именно успешность привнесенных штаммов PGPR в конкурентной борьбе и определяет в большей степени их пригодность для промышленного применения. Нами разработан экспериментальный подход к конструированию «искусственной ризосферы» небобовых растений, избирательно колонизируемой клубеньковыми бактериями (выполняющими полезные для растений трофические, ростостимулирующие и/или защитные функции), путем введения в геном растений генов секретируемых адгезинов растительного и бактериального происхождения под контролем корнеспецифичных промоторов. В качестве трансгенов нами апробированы гены лектинов гороха и козлятника, а также адгезин *RapA1 Rhizobium leguminosarum*. Лектины (агглютинирующие белки) бобовых растений и адгезины клубеньковых бактерий играют существенную роль в установлении первичных контактов бобовых растений с ризобиями при образовании симбиоза. За счет своей бивалентности данные белки способны связываться с одной стороны с плазматической мембраной клеток корневого эпидермиса растений, а с другой специфично с определенными бактериальными клетками, за счет чего образуется избирательное прикрепление микроорганизмов к корневым поверхностям. Так, на трансгенин по гену лектина PSL гороха растения табака показана избирательность колонизации их ризосферы бактериями *R. leguminosarum* в условиях конкуренции с естественной микрофлорой почвы. Получены трансгенные растения табака, секретирующие на поверхность корней белок *RapA1*, и доказана повышенная адгезия бактериальных клеток к таким модифицированным корням.

УСТОЙЧИВОСТЬ К КИСЛОРОДУ У СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ОСАЖДЕНИЯ МЕТАЛЛОВ

П.А. Бухтиярова, Д.А. Анциферов, Г. Брассер, А. Долла, О.В. Карначук

Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

Сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) используют для осаждения металлов из отходов горнодобывающей промышленности. Большая часть таких отходов представляет осадки и воды с высоким окислительно-восстановительным потенциалом. В то время как микробная сульфатредукция – анаэробный процесс. Современные исследования продемонстрировали, что некоторые СРБ могут выдерживать присутствие кислорода и даже использовать его в качестве акцептора электронов. Важно, чтобы СРБ, используемые в биоготехнологиях осаждения металлов, могли выживать и восстанавливать сульфат в окисленных условиях. Целью данного исследования было изучить устойчивость к кислороду и ее возможные механизмы у металлотолерантных СРБ, перспективных для осаждения металлов. В качестве объекта исследований использовали выделенные ранее из отходов добычи металлов устойчивые к меди и кислым pH *Desulfovibrio* sp. A2, *Desulfovibrio* sp. TomC, *Desulfohalobium* sp. I2 и *Desulfohalobium* sp. OT. Выращивание штаммов в условиях непрерывного поступления 0,02% O₂ в газовой фазе показало, что штаммы A2 и TomC, в отличие от представителей *Desulfohalobium*, могут расти в присутствии небольшого количества кислорода. Показано потребление кислорода при окислении лактата, этанола, формиата и глицерола. Причем, оно активнее происходило в условиях низкого pH у представителей *Desulfohalobium*. Спектральный анализ клеток *Desulfovibrio* выявил наличие цитохрома c550, который может участвовать в защите от окислительного стресса. Таким образом, показана устойчивость к кислороду у 4 штаммов СРБ *Desulfovibrio* spp. A2 и TomC и *Desulfohalobium* spp. I2 и OT, являющихся перспективными для использования в процессах очистки от металлов. *Исследование поддержано грантом РФФИ, проект 16-54-150011.*

ОБРАЗОВАНИЕ БИОСУРФАКТАНТОВ МИКРООРГАНИЗМАМИ НЕФТЯНЫХ ПЛАСТОВ И ИХ РОЛЬ В ПОВЫШЕНИИ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ТЯЖЕЛОЙ НЕФТИ

Д.Ш. Соколова, Т.Н. Назина

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

В связи с истощением нефтяных месторождений с легкой кондиционной нефтью всё большее значение приобретает разработка месторождений тяжелой нефти (ТН). Биологическое воздействие на тяжелую нефть может представлять экологически безопасный и эффективный метод нефтеизвлечения. Перспективными агентами для извлечения ТН являются аэробные микроорганизмы, образующие биосурфактанты, эффективно снижающие межфазное натяжение на границе с пластовой водой, и способствующие извлечению ТН из коллекторов. В ходе испытаний биотехнологии повышения нефтеизвлечения, основанной на активации пластовой микрофлоры, на высокотемпературном месторождении Даган (КНР), характеризующемся большими остаточными запасами тяжелой нефти, выполнены систематические исследования образования биосурфактантов в пласте. Отмечено снижение поверхностного натяжения вследствие образования биосурфактантов и накопление летучих кислот, образуемых аэробными бактериями при окислении ТН. Методом статистического анализа подтверждено, что названные параметры оказывают первостепенное воздействие на вытеснение ТН. Из нефтяных пластов выделены мезофильные и термофильные бактерии родов *Dietzia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Geobacillus* и *Aeribacillus*, способные продуцировать ПАВ при росте на сырой нефти и других органических субстратах. Отмечено снижение поверхностного натяжения с 55–68 мН/м до 33–40 мН/м и межфазного натяжения против гексадекана с 28–32 мН/м до 4–11 мН/м. Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения биотехнологии активации пластовой микрофлоры для повышения нефтеизвлечения месторождений ТН. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-14-00028).*

СОСТАВ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ КАК ИНДИКАТОР НАРУШЕНИЙ БИОСФЕРНЫХ ФУНКЦИЙ ТОРФЯНИКОВ В РЕЗУЛЬТАТЕ ПОЖАРОВ

И.Ю. Ошкин, С.Э. Белова, О.В. Данилова, И.С. Куличевская, С.Н. Дедыш

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Одной из важнейших биосферных функций болотных экосистем является регуляция круговорота парниковых газов CH₄ и CO₂. Эта функция может быть существенно нарушена в результате пожаров. На примере торфяных массивов болот Тасин Борское (Владимирская обл.) и Галицкий мох (Тверская обл.), пострадавших от пожара в 2007 и 2010 годах, соответственно, проведен анализ возможных нарушений функционирования метанотрофных сообществ болотных экосистем, играющих ключевую роль в контроле эмиссии метана. Пожары привели к значительным изменениям физико-химических параметров торфа, повышению pH и увеличению минерализации болотной воды. Потенциальная активность «метанооксиляющего фильтра» выгоревших локусов торфяников была существенно снижена по сравнению с ненарушенными участками болот.

Молекулярный анализ состава метанотрофного сообщества торфа верхового болота Тасин Борское с помощью ПЦР-амплификации и клонирования фрагментов гена *rpoA*, кодирующего мембранную метанмонооксигеназу, выявил замену типичных ацидофильных болотных метанотрофов II типа (в основном *Methylocystis* и *Methylocapsa*) менее активными в кислых средах метанотрофами I типа. Высокая доля метанотрофов I типа в составе метанооксиляющих сообществ обычно не характерна для сфагновых болот и свидетельствует о значительных изменениях физико-химических условий среды обитания. Учет отдельных филогенетических групп бактерий с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации выявил 2-кратное возрастание численности представителей *Alphaproteobacteria* и *Bacteroidetes* на выгоревшем участке по сравнению с неповрежденным локусом торфяника болота Галицкий мох, тогда как для *Deltaproteobacteria* и *Planctomycetes* наблюдалась обратная закономерность. Сравнительный анализ библиотек клонов генов 16S rRNA показал изменения состава бактерий в торфе выгоревших участков. Типичные для нативного торфа, медленно растущие бактерии групп *Verrucomicrobia* и *Planctomycetes* были вытеснены быстрорастущими колонизаторами из *Proteobacteria*. Изначально разнообразное сообщество актинобактерий было замещено монодоминантным, состоящим из филотипов, родственных термофилу *Aciditerrimonas ferrireducens*. Кардинальные изменения со сменой подгрупп произошли в составе типичной группы болотных бактерий –

Acidobacteria. Таким образом, в результате пожаров произошли кардинальные изменения в структуре и функциональной активности бактериальных сообществ исследованных торфяников. Заселение пожарищ новыми, нетипичными для естественных торфяников группами бактерий могут иметь своим последствием нарушения ряда биосферных функций этих экосистем, а выявленные изменения структуры микробных сообществ могут служить индикатором таких нарушений.

ОБРАЗОВАНИЕ СУЛЬФИДОВ МЕТАЛЛОВ НОВЫМИ АЦИДОФИЛЬНЫМИ СУЛЬФАТ-РЕДУЦИРУЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ

О.В. Карначук *Томский государственный университет, Томск, Россия*

Применение сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) в биоготехнологиях основано на особенностях их энергетического метаболизма. Используя сульфат в качестве конечного акцептора электронов для дыхания, эта физиологическая группа прокарриот образует значительные количества сероводорода. H_2S связывает большинство металлов в нерастворимые сульфиды. Процесс образования биогенных сульфидов лежит в основе промышленных технологий, направленных на очистку стоков горнодобывающей и металлообрабатывающей промышленности. В известных технологиях используют накопительные культуры СРБ, а в результате процессов, как правило, образуется смесь сульфидов металлов. Прокариоты можно также использовать для получения наноразмерных кристаллов сульфидов металлов определенного состава, спрос на которые на мировом рынке растет. Особенный интерес представляют сульфиды кобальта. Использование катализаторов на основе нанопленок кристаллического Co_9S_8 привело к прорыву в процессе гидрообессеривания нефти. В настоящее время наноразмерные сульфиды кобальта получают химическими методами в условиях высоких температур с использованием токсичных реагентов. Существует потребность в создании методов «зеленой химии» и биокаталитические системы могут быть одним из таких решений. Для получения однородных кристаллов сульфидов металлов должны быть использованы чистые культуры СРБ. В нашей лаборатории получен ряд чистых культур СРБ устойчивых к низким pH и металлам. Культуры были получены из отходов горно-добывающей промышленности. Для выделения использовали новые подходы, одним из которых было разделение форм путем смены условий в биореакторе. Новые изоляты принадлежат к двум родам, Грам- *Desulfovibrio* и Грам+ *Desulfosporosinus*. Бактерии выдерживают концентрацию до 9000 мг $Co^{2+}/л$, 3700 мг $Co^{2+}/л$, и 700 мг $Ni^{2+}/л$. Большинство изолятов ацидофилы или ацидотолерантные формы с оптимум pH для роста от 2,6 до 5,7. Наиболее низкий pH, позволяющий рост, составлял 1,3. С использованием новых изолятов в периодической и непрерывной культуре получены наноразмерные сульфиды переходных металлов. Однородные микрокристаллы Co_9S_8 были получены при выращивании культуры в биопленках. *Исследование поддержано грантом ФЦП соглашение № 14.575.21.0067 от 07.08.2014 г., уникальный идентификатор проекта RFMEFI57514X0067.*

МОБИЛИЗАЦИЯ РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ МЕТАЛЛОВ ИЗ АПАТИТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Д.А. Ивасенко, А.Л. Герасимчук, Е.В. Плотников, О.В. Карначук *Лаборатория биохимии и молекулярной биологии, Кафедра физиологии растений и биотехнологии, Томский государственный университет, Томск, Россия*

Редкоземельные металлы (РЗМ) имеют стратегическое значение и используются для производства многих потребительских товаров, электроники и в ряде промышленных процессов. В настоящее время Российские потребности в РЗМ большей частью покрываются импортом из Китая (Медведев, Канцель, 2015). Большая часть запасов РЗМ в России ассоциирована с апатитовыми и нефелиновыми рудами месторождений Кольского полуострова. Одной из основных проблем является выведение РЗМ в раствор из апатитового концентрата. Микроорганизмы могут быть использованы для перевода РЗМ в растворенное состояние. Ранее мы показали, что сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) могут осуществлять мобилизацию фосфата из малорастворимых соединений кальция и железа, а также, что эта группа прокарриот может использовать сульфат из нерастворимых источников, таких как гипс, англезит и барит (Karnachuk et al., 2002). Целью данного исследования была проверка гипотезы о том, что мобилизация фосфата из апатита под действием СРБ может привести к высвобождению РЗМ в раствор. В экспериментах был использован высокоактивный устойчивый к металлам штамм СРБ, *Desulfovibrio* sp. A2, выделенный ранее из отходов добычи и переработки металлов. Культуру выращивали в присутствии апатита из месторождения Кольского полуострова. Дифракционный анализ используемого апатита показал присутствие $Ca_5(PO_4)_3F$ в качестве основной кристаллической фазы. Элементный анализ, совмещенный со сканирующей микроскопией, также обнаружил присутствие Sr в образце. Культуральную среду после выращивания СРБ в присутствии апатита анализировали на присутствие РЗМ методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS). Концентрация фосфора в культуральной среде увеличивалась в два раза по сравнению с контролем без инокулята. Обнаружили увеличение концентрации Nb в 40 раз по сравнению с контролем без инокулята. Также выросла концентрация Pr, Gd, Hf. Концентрация некоторых РЗМ уменьшалась, что, вероятно, было связано с образованием нерастворимых сульфидов. В эту группу РЗМ входили: Ga, Ge, Y, In, Cs, Sm, Eu, Ta и Th. Необходимы дальнейшие эксперименты для изучения механизмов мобилизации РЗМ и фосфатов под действием СРБ. *Исследование поддержано грантом РФФИ и Администрацией Томской области по научному проекту № 16-44-700315.*

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА

В.А. Богатырев, Д.С. Чумаков, Б.Н. Хлебцов, Л.А. Дыкман

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

Золото относится к тяжелым металлам и, в связи с этим, проявляет высокую токсичность в виде комплексных ионных соединений. С другой стороны, растворимость золота в природных средах чрезвычайно низка, и большинство исследователей отмечают незначительную токсичность золота даже в ультрадисперсном состоянии (коллоидное золото, наночастицы). При уменьшении размеров наночастиц увеличивается соотношение поверхностных и внутренних атомов. Поскольку химической активностью обладают только атомы поверхностного слоя, в том числе, высвобождаемые, сколько-нибудь заметной токсичности коллоидного золота следует ожидать у частиц с соизмеримым количеством поверхностных и внутренних атомов. При параметре кристаллической решетки золота $a=0.47$ нм, такими свойствами обладают наночастицы с размерами <5 нм. Поскольку удельная поверхность изменяется обратно пропорционально линейному размеру частиц, следует ожидать

аналогичной зависимости проявления токсических эффектов от дисперсности при схожих физико-химических условиях. Целью работы является нахождение цитотоксичных форм коллоидного золота и определение физико-химических параметров, определяющих цитотоксичность, а именно, состав дисперсионной среды и легирующего наночастицы слоя. В качестве тест-объекта использована солоноводная микроводоросль *Dunaliella salina*. С помощью разработанной нами лабораторной диагностической тест-системы определены основные токсикометрические показатели для препаратов ионного и коллоидного золота. В качестве основной тест-функции использовано содержание хлорофилла, определяемое *in vivo* спектрофотометрическим способом. Препараты цитратного коллоидного золота с размерами 15 нм (КЗ-15) не обладали цитотоксичностью вплоть до концентраций 200 мг Au/л. Концентрация, вызывающая половинное содержание хлорофилла в суспензии микроводорослей при 48 часовой экспозиции составляла для золотохлористоводородной кислоты $5 \pm 2,5$ мг Au/л и для фойсфинового КЗ-3 $16 \pm 7,2$ мг Au/л. Дисперсионные среды цитотоксичностью не обладали.

ПРИМЕНЕНИЕ БИОИМИДЖИНГА ПРИ ИЗУЧЕНИИ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ДИНАМИКЕ

С.Ю. Ирхин ООО «Диам»

Важной задачей исследования живых клеточных систем является изучение биологических процессов в динамике. Сложности, с которой сталкивается исследователь при постановке и наблюдении длительных экспериментов с живыми клетками - создание оптимальных условий и онлайн регистрация самих процессов. С одной стороны, важно максимально приблизить условия эксперимента *in vitro* к условиям *in vivo*. Соответственно возникает необходимость в поддержании оптимальных параметров культивирования (рН, концентрации питательных веществ и растворённых газов) на протяжении нескольких суток. С другой стороны очень важно обеспечить регулярную, непрерывную и объективную регистрацию событий на протяжении всего эксперимента. Основная задача, которую здесь приходится решать – это автоматизация регистрации данных, полученных с помощью приборов.

Система биоимиджинга EVOS FL Auto – это комплексное решение, которое позволит решить задачи микроскопии микрообъектов и регистрации процессов в автоматическом режиме на протяжении нескольких суток. Сочетание программного обеспечения, автоматической подстройки фокуса и моторизованного столика с высокоточным позиционированием, позволяет проводить сканирование препарата в автоматическом режиме несколько суток без вмешательства оператора. Высококачественная оптика обеспечивает высокоточное разрешение с максимальной детализацией получаемого изображения. Система позволяет так же регистрировать слабое свечение флуоресцентных меток в считанные доли секунды, что значительно снижает негативное влияние ультрафиолета на культуру клеток по сравнению с ручным методом, а так же снижает выгорание самой метки. Системы микроперфузии CellasicOnix, установленная на имиджере Evos поддерживает жизнеспособность клеток и обеспечивает более высокую точность поддержания параметров культивирования. Благодаря микрофлюидным технологиям, доставка питательных веществ и метаболитов осуществляется через сеть полупроницаемых микрокапилляров, по аналогии с микрокапиллярной сетью в тканях и органах. Данный подход позволяет максимально приблизить условия культивирования *in vitro* к условиям *in vivo*. Идеальным решением для таргетного изучения экспрессии генов в живых клетках в динамике является технология SmartFlare, которая основана на применении инертных нано частиц золота, с конъюгированными на их поверхности РНК-зондов, комплементарных искомому м-РНК. SmartFlare – это высокая специфичность метода, простота протокола, минимизация негативного воздействия на клетки и возможность наблюдения процесса онлайн. РНК-зонды SmartFlare не требуют специализированной подготовки: достаточно добавить суспензию с зондами SmartFlare к культуре клеток, оставить для инкубации на 28 часов в CO₂-инкубаторе и на следующий день провести детекцию. РНК-зонды SmartFlare поглощаются только живыми клетками, за счёт механизмов эндоцитоза. При попадании в клетку, при наличии в ней целевой мРНК, репортная нить отсоединяется от захватной нити. Детекция сигнала осуществляется благодаря флуоресценции красителей Cy-3 и Cy-5, которые конъюгированы на репортной нити. Через несколько суток зонды самостоятельно покидают клетки, не причиняя им вреда, что дает возможность проводить дальнейшие исследования на этой же культуре. Как результат, применение автоматизированных технических средств наблюдения, микрофлюидных биореакторов и биоинертных астиц, в совокупности позволяет максимально повысить объективность и воспроизводимость длительного эксперимента при минимальном вмешательстве со стороны оператора.

STATE OF THE ART IN THE EARLY DRUG DISCOVERY LEAD GENERATION

Alexey Rak BioStructure and Biophysics, Sanofi

Fragment-based lead discovery has proved to be an effective alternative to high-throughput screenings in identifying chemical matter that can be developed into robust lead compounds. The search for optimal combinations of biophysical techniques that can correctly and efficiently identify and quantify binding can be challenging due to the physicochemical properties of fragments. In order to minimize the time and costs of screening, optimal combinations of biophysical techniques with maximal information content, sensitivity, and robustness are needed. We will present and discuss an approach utilizing automated microscale thermophoresis (MST) affinity screening to identify fragments active against MEK1 kinase and nanoDSF assay that is used in concert to validate the binders. MST identified multiple hits that were confirmed by X-ray crystallography but not detected by orthogonal methods. Furthermore, MST also provided information about ligand-induced aggregation and protein denaturation. The technique delivered a large number of binders while reducing experimentation time and sample consumption, demonstrating the potential of MST to execute and maximize the efficacy of fragment screening campaigns.

ФОСФОЛИПИДНЫЙ И ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ВНУТРЕННЕЙ И НАРУЖНОЙ МЕМБРАН *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*, КУЛЬТИВИРОВАННОЙ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Л.А. Давыдова¹, С.И. Бахолдина², М.Ю. Баркина¹, П.В. Веланский¹, М.В. Богданов³, Н.М. Санина¹

¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток; ²Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток; ³Департамент биохимии и молекулярной биологии, Медицинская школа Техасского университета, Хьюстон, США

Липидный матрикс бактериальных мембран является главной мишенью для действия различных экологических факторов, вызывающих адаптационные изменения физико-химических свойств фосфолипидов. Однако данные о липидном соста-

ве цитоплазматической (ЦМ) и наружной мембран (НМ) грамотрицательных бактерий в основном ограничиваются моделью мезофильной *Escherichia coli*. Целью настоящей работы было исследование фосфолипидного и жирнокислотного состава ЦМ и НМ психротрофной энтеропатогенной бактерии *Yersinia pseudotuberculosis* при различных температурах культивирования. Показано, что сдвиг температуры роста с 8°C до 37°C, имитирующий переход от сапрофитных условий роста этих бактерий к паразитическим, и тепловой шок, вызванный резким повышением температуры от 8°C до 45°C, приводили к повышению содержания лизофосфатидилэтаноламина с нуля и 1% до 6% и 10% в ЦМ и НМ, соответственно. Эти изменения сопровождалось снижением уровня фосфатидилэтаноламина (ФЭ) и резким увеличением (до 3 раз) уровня фосфатидилглицерина (ФГ) в НМ бактерий, что способствует повышению суммарного отрицательного заряда клеточной оболочки. Уровни доминирующих насыщенных пальмитиновой (16:0) и циклопропановой жирных кислот были в 1.5- и 7.5 раза выше, соответственно, а содержание преобладающих ненасыщенных пальмитолеиновой (16:1n-7) и цис-вакценовой (18:1n-7) жирных кислот были в 10-30 раз ниже в обеих мембранах бактериальных клеток, выращенных при повышенных температурах. В процессе наблюдаемых изменений, отражающих процесс гомеовязкостной адаптации, соотношение между ненасыщенными и насыщенными жирнокислотными остатками липидов мембран уменьшалось, но оставалось выше во ЦМ, чем в НМ. Одновременно с этим не наблюдалось каких-либо существенных изменений в составе жирных кислот липидов клеток, подвергнутых тепловому шоку, что демонстрировало разницу между ответами на тепловой шок и тепловую адаптацию *Y. pseudotuberculosis*. Уникальная способность *Y. pseudotuberculosis* регулировать соотношение анионного ФГ и нейтрального ФЭ и, следовательно, регулировать отрицательный заряд НМ, может быть общей стратегией, используемой патогенными бактериями для обеспечения барьерной функции НМ. *Исследование финансировалось Российским научным фондом (грант №15-15-00035).*

ГЕНОМНЫЙ ПРОФИЛЬ ШТАММОВ *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII*, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Е.С. Медведева, М.Н. Давыдова, А.А. Музыкантов, Н.Б. Баранова, Т.Ю. Григорьева, М.Н. Синягина, Е.А. Булыгина, О.А. Чернова, В.М. Чернов Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань, Россия

Пластичность бактерий – основополагающая стратегия, определяющая выживание организмов в разных условиях среды, формирование биоценозов и эволюцию. Неблагоприятные условия значительно ускоряют мутационный темп, обуславливая модуляцию протеома, изменение метаболизма, морфологии и вирулентности бактерии. Уникальным видом микоплазм с точки зрения адаптивности является *Acholeplasma laidlawii*, обнаруживаемая у человека, животных и растений, являющаяся возбудителем фитомикоплазмозов, а также основным контаминантом клеточных культур и вакцинных препаратов. Решение проблемы элиминации контаминантов связывают с исследованиями механизмов оперативной реактивности микоплазм в отношении антимикробных препаратов, поскольку антибиотикотерапия, связанная с применением фторхинолонов, пока остается единственным рекомендуемым способом подавления микоплазм. Сравнительный анализ полных геномов штаммов *A. laidlawii*, различающихся по чувствительности к ципрофлоксацину, явился задачей нашего исследования. Нами было выполнено полногеномное секвенирование 4 штаммов *A. laidlawii*, проявляющих дифференциальную чувствительность к ципрофлоксацину. Согласно полученным данным, геномные профили штаммов микоплазмы весьма различаются. Мутационный паттерн относительно специфичен для каждого случая - у сравниваемых образцов имеются как уникальные, так и общие мутации, ассоциированные в том числе с горячими элементами реорганизации ДНК. Существенная часть геномных отличий у штаммов затрагивает гены, продукты которых участвуют в фундаментальных клеточных процессах, включая репликацию, репарацию и рекомбинацию, метаболизацию АФК и клеточное деление, а также реализацию вирулентности. Высокий уровень дифференциальности геномного профиля *A. laidlawii* в разных условиях среды свидетельствуют о высокой пластичности микоплазмы, оперативно и стресс-специфично отвечающей на вызовы извне. Выявленное в результате наших исследований вовлечение ряда генов ключевых белков репликации, репарации и клеточного деления в адаптацию микоплазмы к разным условиям среды, ассоциированную с модуляцией геномного и протеомного профилей, определяет таргетный потенциал в системе CRISPRs-инструментов для элиминации микоплазм в клеточных культурах. *Исследование выполнено при поддержке РФФИ 15-44-02594, 16-34-00660.*

ХАРАКТЕРИСТИКА N-ГЛИКАНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Ю.Д. Романова¹, Л.А. Пинзон Варела¹, А.В. Лайков¹, Р.К. Исмаилова¹, А.Р. Максеев², Л.И. Фахрутдинова³, И.И. Салафутдинов¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет; ²Казанский государственный медицинский университет; ³Казанская государственная медицинская академия, Казань, Россия

У четырех пациентов с диагнозом хроническая почечная недостаточность (ХПН) и четырех условно здоровых контролей были взяты образцы сыворотки крови. Был проведен гидролиз олигосахаридов белков сыворотки с помощью фермента пептид-N-гликозидазы F (PNGase F). Этот фермент расщепляет олигосахариды, связанные с аспарагином (N-гликаны). С помощью детектирования диагностических ионов 163.06, 204.09, 366.14, 512.20, 274.1, 308.1, 290.1 в режиме SIM на масс-спектрометре QTrap AB Sciex 6500 были получены массы олигосахаридов. Вероятностные структуры рассчитывали, используя программу GlycoMood. Для дальнейшего анализа отбирали только те структуры, которые содержались в базе UniCarbKB. В сыворотке у здоровых людей было найдено от 12 до 30 гликановых структур, среди них большая часть представлена гибридными или комплексными структурами от 75 до 91%. Высокоманнозных структур было представлено меньше до 10%, и доля олигоманнозных структур до 16,7%. У здоровых людей и пациентов с ХПН практически не отличался уровень сиалирования, однако были отличия в уровне фукозилрования и сульфатирования олигосахаридов. Так, у одного из пациентов доля фукоз в гликановых фрагментах была в два раза меньше, по сравнению со здоровыми добровольцами. У двух других пациентов наблюдались различия в уровне сульфатирования олигосахаридов (в 3 раза менее и в 1,6 раз более) белков сыворотки. У пациента с низким содержанием сульфатных групп в составе гликановых фрагментов также было выявлено увеличение доли олигоманнозных структур, по сравнению с условно здоровыми. Сульфатирование гликанов зависит от активности углеводных сульфотрансфераз, что, возможно, зависит от возраста человека. Так, у пациентов до 30 лет коли-

чество сульфатных групп было меньше, чем у пожилого пациента (48 лет). Кроме того, было выявлено 4 N-гликана, характерных для больных с ХПН:

(Hex)1(HexNAc)1(Deoxyhexose)1(NeuGc)1+(Man)3(GlcNAc)2,
(Hex)1(HexNAc)1(Deoxyhexose)2+(Man)3(GlcNAc)2,
(Hex)2(HexNAc)1(NeuAc)1+(Man)3(GlcNAc)2, (HexNAc)3(Deoxyhexose)1+(Man)3(GlcNAc)2.

В сыворотке трёх здоровых людей и одной пациентки с ХПН был обнаружен укороченный N-гликан олигоманнозного типа (Hex)3(HexNAc)2 и комплексный N-гликан (HexNAc)4 (Deoxyhexose)1+(Man)3(GlcNAc)2.

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕКТИНА ИЗ ГРЕБЕШКА *PATINOPECTEN YESSOENSIS*

Т.О. Мизгина¹, И.В. Чикаловец^{1,2} ¹Дальневосточный федеральный университет; ²Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

Известно, что лектины (углевод-связывающие белки) оказывают существенное влияние на метаболизм животной клетки, обладая иммуномодулирующим, противоопухолевым, митогенным, антибактериальным и противовирусным действием. С их помощью можно выявлять различия в архитектонике клеточных поверхностей, мембран нормальных и раковых клеток; их можно использовать также в качестве регуляторов биопроцессов и физиологически активных веществ.

Из грешка *Patinopecten yessoensis* методом аффинной хроматографии был выделен Gal/GalNAc-специфичный лектин (PYL), с молекулярной массой по данным MALDI-TOF масс-спектропии 17154,5 Да. Методами гемагглютинации (ГА) показано, что PYL активен в интервале pH 5–9, полностью теряет активность при нагревании до 60°C в течение 30 мин и является металло-независимым лектином. Было изучено изменение уровня лектина в экстрактах мускула грешка в ответ на заражение моллюска бактерией *Vibrio proteolyticus*, изолированной из мест его обитания и патогенной для морских беспозвоночных. Показано, что содержание PYL возрастает в 2,5 раза через три часа после иммунизации бактериями, вероятно, благодаря активации процесса его синтеза. После этого концентрация его резко падает, что связано с быстрым расходом молекул лектина в ходе ответа на антиген и его удаление. Через сутки по мере удаления антигена из организма моллюска содержание лектина возвращается к исходному уровню. В контрольной группе также отмечались небольшие изменения в титре ГА, что было обусловлено, вероятно, ответом на травму при иммунизации. Для того чтобы выяснить характер взаимодействия лектина с *V. proteolyticus*, было исследовано связывание PYL с микроорганизмом, меченным флуоресцентной меткой. Для этого к суспензии FITC-меченных бактерий добавляли PYL, результат оценивали, используя флуоресцентный микроскоп. Лектин связывается с клеточной поверхностью бактерий, агглютинируя их. В присутствии специфичного моносахарида галактозы происходит ингибирование связывания, в то время как глюкоза не оказывает никакого влияния. Можно сделать вывод, что PYL взаимодействует с клетками по углевод-связывающему домену. Таким образом, лектин участвует в защитных реакциях моллюска. PYL агглютинирует бактерии, лишая возможности питаться и размножаться, что, в конечном счете, приводит к их гибели.

GAL-СПЕЦИФИЧНЫЕ ЛЕКТИНЫ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ

И.В. Чикаловец^{1,2}, В.И. Молчанова¹, О.В. Черников¹ ¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН; ²Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

Лектины – углевод-связывающие белки, функция которых заключается в узнавании широкого спектра углеводных структур в гликоконъюгатах (гликофинголипидах, гликопротеинах и протеогликанах). В двусторчатых моллюсках были найдены определенные лектин-кодирующие гены, экспрессия которых регулируется в зависимости от инфицирования патогенными микроорганизмами, указывая на то, что лектины способны отвечать на внутреннюю или внешнюю стимуляцию. Эти открытия подтверждают, что двусторчатые моллюски, включая мидий, являются интересным объектом для изучения лектинов и углевод-зависимых процессов.

Нами в течение ряда лет проводятся исследования по выделению, установлению структуры, изучению физико-химических свойств и биологической активности лектинов морских беспозвоночных Японского моря, что привело к открытию нескольких новых лектинов, обладающих широким спектром биологической активности. Были выделены Gal/GalNAc-специфичные лектины из мидий *Crenomytilus grayanus* (CGL) и *Mytilus trossulus* (MTL). Проведенный филогенетический анализ показал, что они не относятся ни к галектинам, ни к одному из других известных на сегодняшний день классов лектинов и, таким образом, являются первым представителями нового класса лектинов, в который входит еще один недавно выделенный лектин (MytiLec) из мидии *Mytilus galloprovincialis*. Изучение тонкой углеводной специфичности лектинов показало, что они проявляют высокое сродство к углеводным цепям муцинового типа (О-гликанам). Показано, что CGL и MTL обладают антибактериальной и фунгицидной активностями. Мы полагаем, что они принимают участие в неспецифических иммунных защитных реакциях моллюсков, т. к. уровень лектинов существенно изменяется в ответ на бактериальное заражение. Обнаружены эндогенные лиганды лектинов в тканях мидии. До сих пор ничего не известно о биологических функциях гликанов двусторчатых моллюсков. Наверняка эти гликаны так же вовлечены в процессы узнавания, как и в других видах организмов. При поиске новых объектов для выделения лектинов, имеющих гомологию с CGL и MTL, и, возможно, относящихся к этому же новому классу лектинов, выявлено, что в экстракте двусторчатого моллюска *Glycymeris yessoensis* содержится лектин, проявляющий 50% перекрестную реактивность с ранее выделенными лектинами.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К МОДИФИКАЦИИ СВОЙСТВ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК

Б.Р. Кулуев, З.А. Бережнева, Е.В. Михайлова

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

Расхождение микрофибрилл при росте клеток растяжением в растениях достигается двумя основными механизмами: разрезанием части связующих гликанов и их новым сшиванием ксиланогликанэндоглюкозилазами/гидролазами (XTHs), а также нарушением водородных связей между микрофибриллами целлюлозы и гликановыми цепями осуществляемое неферментативными белками экспансинами. XTHs и экспансины у всех растений кодируются многочисленными семействами генов, причем функциональное значение такого большого разнообразия этих генов в геномах растений остается во многом

невьясненным. Гены, кодирующие XTHs и экспансины представляют большой интерес для биотехнологии и генной инженерии растений, так как могут быть использованы в качестве мишеней для модификации свойств растительных клеточных стенок. Исследование генов XTHs и экспансинов проводится преимущественно на модельном объекте *Arabidopsis thaliana*, однако не меньший интерес представляет исследование этих генов у хозяйственно-ценных растений. Среди таких растений модельными объектами генной инженерии являются табак (*Nicotiana tabacum* L.) и осина (*Populus tremula* L.). Целью настоящей работы было выяснение роли генов XTHs: NtEXGT табака, PnEXGT1 тополя черного; генов экспансинов: NtEXPA1, NtEXPA4, NtEXPA5, NtEXPA6 табака и PnEXPA3 тополя черного в регуляции роста и стрессоустойчивости. Также была поставлена задача создания трансгенных растений табака и осины с повышенной и пониженной экспрессией исследуемых генов. Результаты нашего анализа показали, что наиболее высокий уровень содержания транскриптов всех исследуемых генов в растениях табака и осины дикого типа обнаруживается в молодых, интенсивно растущих листьях. Уровень экспрессии исследуемых генов увеличивался при экзогенной обработке цитокининами, ауксинами, гиббереллинами и брассиностероидами. Содержание транскриптов генов NtEXGT, NtEXPA1, NtEXPA4 и NtEXPA5 повышалось также в ответ на воздействие NaCl, засухи, холода и АБК. Конститутивная экспрессия генов NtEXGT, NtEXPA1, NtEXPA5 и PnEXGT1 способствовала увеличению размеров листьев и стебля трансгенных растений табака. Эти трансгенные растения также характеризовались улучшением параметров роста и продуктивности при выращивании в условиях засоления, засухи и низких положительных температур.

ФОРМИРОВАНИЕ ТРЕТИЧНОЙ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ В РАСТЕНИЯХ. УРОВЕНЬ ТРАНСКРИПТОМА

Н.Е. Мокшина, О.В. Горшков, Т.А. Горшкова *Институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань, Россия*

Клеточная стенка – ключевая структура растительного организма, которая во многом определяет биологию его развития. Хотя уже несколько десятилетий ведутся активные исследования механизмов формирования и функционирования этого компартмента, полная их расшифровка далека от завершения, что, с одной стороны, объясняется сложностью строения полисахаридов (составляющих основу растительной клеточной стенки), а с другой – недооценкой важности этой структуры, которая долгое время считалась лишь «мертвым ящиком». Структура и состав клеточных стенок отличается на разной стадии развития клеток, а также напрямую зависит от их специализации. Так, первичная клеточная стенка присутствует во всех растительных клетках, сосуды ксилемы и ряд механических тканей формируют вторичную клеточную стенку, только растительные волокна способны формировать третичную клеточную стенку (желатинозный тип клеточной стенки), который всегда откладывается после вторичной. Этот тип клеточной стенки отличается внушительной толщиной (до 10 мкм) и высоким содержанием целлюлозы (до 90%), микрофибриллы которой располагаются аксиально. В этом типе клеточной стенки практически отсутствует ксилан и лигнин, при этом особую роль играют рамногалактуронаны I особого строения. На сегодняшний день совершенно не расшифрованы механизмы «переключения» синтеза одного типа клеточной стенки на другой, хотя очевидно, что изменения должны затрагивать огромную «молекулярную машину». Подобные изменения мы исследовали на примере волокон льна, формирующих третичную клеточную стенку. Благодаря расшифровке генома льна, появлению технологий, позволяющих проводить масштабное профилирование транскриптомов, а также возможности выделить волокна на стадии формирования третичной клеточной (благодаря ее повышенной прочности), стало возможным провести исследования молекулярно-биологических аспектов формирования третичной клеточной стенки на уровне транскриптома. В докладе будут представлены данные транскриптомного профилирования индивидуальных волокон льна, а также тканей, клетки которых не формируют третичную клеточную стенку, позволяющие судить о характере стадий- и тканеспецифичных процессов и о возможных путях их регуляции. *Работа выполнена при поддержке грантов РНФ (№16-14-10256) и Президента РФ (МК-8014.2016.4).*

РАЗНООБРАЗИЕ ГЛИКОПОЛИМЕРОВ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК АКТИНОБАКТЕРИЙ

Н.В. Потехина¹, Г.М. Стрешинская¹, Е.М. Тульская¹, А.С. Шашков², С.Н. Сенченкова², А.С. Дмитренко², Л.И. Евтушенко³

¹Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ²Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва;

³Институт физиологии и биохимии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино-на-Оке, Россия

До недавнего времени считалось, что гликополимеры (ГП) клеточных стенок актинобактерий представлены в основном тейхоевыми кислотами (ТК). Развитие и использование современных химических и физико-химических методов анализа, а также исследования представителей подпорядков (<http://www.bacterio.net/>): Micromonosporineae (род Actinoplanes), Frankineae (род Kineosporia), Micrococcineae (роды Ratayibacter, Arthrobacter), Propionibacterineae (род Kribella) и др. позволили обнаружить в их клеточных стенках, поли(гликозил-1-фосфаты), ГФП, а также бесфосфатные гликополимеры – тейхуроновые (ТУК) и тейхулозоновые (ТУЛК) кислоты, нейтральные и анионные полисахариды (ПС). Каждая группа ГП проявляла широкое структурное разнообразие, как в построении основной цепи, так и в наличии и природе боковых заместителей. Большинство изученных штаммов содержало в клеточной стенке различные сочетания ТК, ГФП, ТУК, ТУЛК и ПС, в то время как у исследованных представителей родов Catellatospora, Corynebacterium, Geodermatophilus, Kribella, Ratayibacter, Propionibacterium выявлены только бесфосфатные ГП. Накопленные данные о распространении ГП у различных представителей порядка Actinomycetales нашли применение в таксономии: наличие, природа и особенности структуры ГП рассматриваются как химические маркеры клеточных стенок, характеризующие представителей таксонов разного уровня. Дальнейшие исследования клеточных стенок актинобактерий различных родов и семейств, не исследованных в этом отношении ранее, может привести к обнаружению и описанию ГП новых классов, что расширит представления о многообразии органического мира и биосинтетическом потенциале микроорганизмов.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЛЕЗЫ И РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ – БИОМАРКЕРЫ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Н.А. Терехина, О.Г. Горячева, С.Э. Реук

Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера, Пермь, Россия

Использование в клинической биохимии слезы и ротовой жидкости вместо крови атравматично, безболезненно, позволяет многократно повторять анализы. В слезе и ротовой жидкости 120 детей и 447 взрослых проведено определение содержа-

ния 27 белков, 8 минеральных веществ. Разработаны способы прогнозирования рецидива офтальмогерпеса по определению в слезе активности дегидрогеназ у взрослых больных, гликозидаз у детей. Для диагностики близорукости у детей дошкольного возраста предложено определение в слезе активности гаммаглутамилтранспептидазы. Выявлены возрастные особенности содержания минеральных веществ в ротовой жидкости здоровых детей. Для оценки эффективности лечения острого герпетического стоматита у детей предложен коэффициент соотношения содержания меди и кальция в ротовой жидкости. Разработан способ диагностики сахарного диабета путем определения в слезе содержания глюкозы, пирувата и лактата. Определение креатинина в слезе было использовано для диагностики хронической почечной недостаточности. Предложены способ диагностики гиперурикемии по содержанию мочевой кислоты в слезе и способ диагностики уремии по уровню мочевины в слезе. Разработан новый способ неинвазивной диагностики острого панкреатита, механической желтухи по ферментативному анализу слезы. Установлено, что при желтухе, вызванной злокачественной опухолью, активность ферментов - показателей холестаза выше, чем при механической желтухе, обусловленной наличием камней в желчных протоках. Выявлена взаимосвязь концентрации церулоплазмينا плазмы крови, ротовой жидкости и тяжести сердечной недостаточности. Разработан способ диагностики окончания процесса острого воспаления в зоне некроза при инфаркте миокарда, основанный на определении церулоплазмينا ротовой жидкости. Показано, что значительное повышение активности гаммаглутамилтранспептидазы не только в плазме крови, но и в ротовой жидкости больных инфарктом миокарда при выписке из стационара отражает формирование постинфарктной сердечной недостаточности и может служить показателем высокого риска повторных острых коронарных событий. Биохимические показатели слезы и ротовой жидкости могут быть использованы для диагностики, оценки эффективности лечения, прогнозирования заболеваний.

РАСЩЕПЛЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО NAD И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**В.А. Куликова^{1,2}, К.А. Шабалин^{2,3}, А.П. Якимов^{1,3}, К.Б. Нериновский^{1,4}, М.А. Ходорковский¹, М. Циглер⁵, А.А. Никифоров^{1,2}**

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург; ²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; ³Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина; ⁴Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; ⁵Университет Бергена, Департамент молекулярной биологии, Берген, Норвегия

Никотинамид аденин динуклеотид (Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) является кофактором окислительно-восстановительных реакций ключевых метаболических путей. Кроме того, расщепление NAD на никотинамид (Nam) и АДФ-рибозу необходимо для таких важнейших регуляторных модификаций как деацетилирование, а также моно- и поли-АДФ-рибозилирование белков. В клетках человека NAD синтезируется из внеклеточных предшественников, таких как Nam, никотиновая кислота (NA), известных как витамин B3, и рибозидов никотинамида (NR) и никотиновой кислоты (NAR). Известно, что внеклеточные динуклеотиды NAD и NAAD и мононуклеотиды NMN и NAMN также поддерживают синтез внутриклеточного NAD. Однако на сегодняшний день до конца не ясно, входят ли данные нуклеотиды в клетку напрямую, или же они расщепляются до соответствующих нуклеозидов (NR и NAR) и оснований (Nam и NA), которые потом входят в клетку и используются для синтеза NAD. В данной работе, с помощью метода количественной ЯМР-спектроскопии, мы изучали расщепление внеклеточного NAD и его метаболитов в культурах клеток человека. Мы показали, что нуклеотиды NAD, NAAD, NMN и NAMN, добавленные к клеткам HEK 293, культивируемым в питательной среде DMEM, содержащей 10% фетальную бычью сыворотку (ФБС), расщепляются до соответствующих нуклеозидов NR и NAR. Более того, нуклеозиды NR и NAR расщепляются до соответствующих оснований Nam и NA. Контрольные эксперименты с ФБС показали, что она содержит ферментативные активности, которые расщепляют метаболиты NAD в отсутствие клеток. Далее, чтобы исключить влияние ФБС, клетки HEK 293 культивировали в бессывороточной питательной среде. Мы установили, что в данных условиях NAD и NAAD эффективно расщепляются до мононуклеотидов NMN и NAMN; NMN дефосфорилируется до NR, в то время как NR расщепляется до Nam. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ферменты на плазматической мембране клеток человека HEK 293 расщепляют внеклеточный NAD и его метаболиты до нуклеозидов и оснований, которые затем могут входить в клетку и использоваться там для синтеза NAD. *Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 16-14-10240.*

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абакумова О.Ю. 235
Абдеева И.А. 219, 236
Абзанидзе В.В. 145
Абрамов С.Н. 177
Абрамов С.Н. 194
Абрамова З.И. 177, 178, 194
Абрамичева Н.Ю. 113, 157
Абрахи С. 11
Авдеева Л.В. 95
Аверина О.А. 14
Аверина О.В. 201
Аветисян А.В. 185
Агапов А.А. 17, 24
Агапова Ю.К. 36, 76, 79
Агафонова Л.Е. 91
Агафонова М.Н. 68
Аграновский А.А. 103
Адилов А.С. 135

Ажикина Т.Л. 17, 27, 174, 177
Азарахш М. 211
Азарова Ю.Э. 188
Азизова Г.И. 189
Айдагулова С.В. 174, 177
Айед З. 179
Акимов М.Г. 178
Акимова О.А. 76
Акпаров В.Х. 223
Аксенова М.А. 135
Албантова А.А. 231
Александрова С.С. 61, 154, 235
Алексашкин А.Д. 225
Алексеев Д.Г. 114
Алексеева А.С. 92, 151
Алексеева Н.В. 70
Алексеева О.М. 48
Алексеев Е.А. 62

Алешина Г.М. 74
Алешина Н.И. 185
Алиев Р.Э. 45
Алиев Т.К. 140, 144
Алиева А.Х. 157
Алкалаева Е.З. 19, 26, 42, 43, 53, 80, 87
Аллиллуев А.П. 36, 37
Аллиллуев И.А. 128
Алтухов Д.А. 76
Алтухов И.А. 119, 120, 122
Алхонен Л. 101
Аминин Д.Л. 149
Анаев Э.Х. 135
Ананян А.А. 154
Анарбаев Р.О. 11
Андреев Д.Н. 114
Андреев Е.А. 130

Андреева А.Б. 196
Андреева Е.Н. 68
Андреева И.П. 167, 168
Андреева Л.А. 142
Андреева Н.А. 14
Андреева Н.А. 36, 42
Андреева Н.В. 181
Андронов Е.Е. 209
Аниканов Н.А. 120, 123, 123
Анисенко А.Н. 20, 47
Анохина Е.П. 226
Антипова Н.В. 50
Антоненко Ю.Н. 88, 147
Антонов М.Ю. 89
Антонова Е.Ю. 215
Ануфриева Н.А. 34
Анциферов Д.А. 239
Апт А.С. 17, 169

- Арапиди Г.П. 112, 123
Аргентова В.В. 140
Ардаширова Е.В. 150
Арзамасов А.А. 23
Аринбасарова А.Ю. 50
Арнст К.В. 216, 217
Арсеньев А.С. 81, 82, 84, 86, 87, 99
Арсеньева Е.Л. 158, 161
Арсеньева Е.Н. 127
Артамонов А.Ю. 165
Артемов А.В. 3
Артёмьева Л.В. 99, 154
Артюхов В.Г. 47, 107, 214, 226
Арутюнян А.В. 158
Архипов С.А. 177
Арчаков А.И. 91, 119, 121, 123, 126
Астахова А.А. 161, 163
Астахова Т.М. 138, 192
Астапуров И.А. 178
Атабеков И.Г. 145
Атрошенко Д.Л. 34, 38
Аутеншлюс А.И. 177
Афанасьева М.А. 5
Афонин А.М. 209
Ахметов И.И. 131
Ашба А.М. 178
Аюпов Р. 15
Бабаков В.Н. 92, 162
Бабалян К.А. 112
Бабенко В.В. 114
Бабинова Е.А. 112
Бабич П.С. 60
Бабкин И.В. 205
Бабкина И.И. 159
Баженов М.А. 20
Баишева Г.М. 105
Байгильдина А.А. 126
Байдамшина Д.Р. 214
Байич В.Б. 117
Байков И.К. 166
Байкова Ю.П. 114
Баймиев Ал.Х. 198
Баймиев Ал.Х. 215, 238
Баймиев Ан.Х. 198
Байрамов А.В. 85
Бакаева З.В. 159
Бакунина И.Ю. 226
Бакшеева В.Е. 67
Балабан Н.П. 54
Балабан П. 53
Балабанова Л.А. 130, 226, 236
Балалаева И.В. 100
Баландин С.В. 99, 165
Балановский О.П. 111
Балобанов В.А. 17
Баль Н. 53
Бао Йо. 41
Баранов А.В. 90
Баранова Д.С. 203, 234
Баранова Н.Б. 242
Баранова Н.И. 185
Баринов Н.Ф. 91
Барина К.В. 72
Баркина М.Ю. 241
Бархатов В.И. 43, 218
Барыкина Н.В. 107
Батоцренова Е.Г. 182, 189
Баходдина С.И. 208, 241
Бахромеева А.А. 49
Бахта А.А. 196
Бахтева В.Т. 181
Бачева А.В. 35
Башарина О.Б. 73
Башаров М.М. 175
Безнос О.В. 150, 225
Безсуднова Е.Ю. 228
Безсуднова Е.Ю. 32, 228, 232
Безуглов В.В. 178
Беклемишев А.Б. 221
Белецкий А.В. 198, 238
Белимов А.А. 209
Белкина Е.Г. 28
Белобородова Н.В. 57
Белов Д.А. 161
Белова С.Э. 239
Белоглазкина Е.К. 141
Белогуров А.А. 39, 48, 55, 123, 145, 149, 160, 191, 193
Белогурова Н.Г. 38
Белозерский М.А. 61, 218
Белоусов В.В. 95, 96
Белоусов М.В. 62
Белоусова Е. 118
Белоусова И.И. 147
Белоусова Р.В. 220
Бельская Н.А. 178
Белявский А.В. 53
Бенкен К.А. 63
Бережная Е.В. 181, 182
Бережнева В.А. 243
Бережной Д.С. 164
Березовская Ю.В. 85
Берестецкий А.О. 210
Берлина А.Н. 219
Берлов М.Н. 74, 101
Беседина Е. 166
Беснятых Ю.А. 122
Билан Д.С. 96
Билюков В.И. 231
Биркемайер К. 133
Битхаева М.В. 186
Биченкова Е.В. 20
Благодаренко Е.А. 183
Блохина Е.А. 212
Бневский П.В. 225
Бобик Т.В. 227, 229, 230
Бобкова Н.В. 185
Бобров К.С. 46, 223
Бобылева Е.В. 178, 193, 196
Богатиков С.А. 216
Богатырев В.А. 216, 240
Богданов А.А. 14
Богданов И.В. 167
Богданов М.В. 241
Богданова Ю.А. 96
Богомольная Л.М. 149, 168, 169
Богущ В.Г. 218
Бодоев И.Н. 120
Бойко А.Н. 110
Бойко К.М. 32, 79
Бойко Ю.А. 153
Бойченко П.К. 183
Боков М.Н. 140, 144
Боковая О.В. 205
Болдинова Е.О. 14
Болдырев И.А. 92
Болосов И.А. 99, 148
Большакова О.И. 152
Бондарев С.А. 62
Бондаренко Е.А. 114
Бондаренко П.Ю. 203
Бондаренко Т.И. 127
Бондарь А.А. 173
Бондарь О.В. 175
Бонч-Осмоловская Е.А. 200, 202, 204–207, 228
Борзова В.А. 51
Бородкин Г.С. 150
Бородулин В.Б. 178, 193, 196
Бос К. 205
Бочаров Э.В. 81, 82, 86, 87
Бочарова О.В. 81, 82, 86, 87
Бощер А. 15
Бояркин Д.В. 179
Брагин П.Е. 81, 82
Браже Н.А. 40
Брассер Г. 239
Бречалов А.В. 16
Брускин С.А. 195, 219, 236
Брусов О.С. 136
Брызгунова О.Е. 134
Брянская А.В. 199
Брянцева Т.В. 40
Бубис Ю.А. 125, 127
Бубнов Д.М. 204
Бугрова А.Е. 126
Буйновская Н.С. 130, 236
Букато О.Н. 120
Булаев А.Г. 237
Булаева Н.И. 187, 188
Булатов Э.Р. 66
Булахов А.Г. 227, 234
Булко Т.В. 91
Булыгина Е.А. 203, 242
Бунева В.Н. 43, 44
Буракова Е.А. 21
Бураковский Д.Е. 14
Буренина О.Ю. 15, 25
Бурлаковский М.С. 218
Буров О.Н. 150
Бутенко И.И. 119
Бутенко И.О. 19, 120, 122
Бутов И.А. 41
Бухтиярова П.А. 239
Бушмина О.Н. 71
Бушнев С.О. 134
Бызова Н.А. 219
Быков И.М. 61, 62
Быкова Д. 118
Быстров Д.М. 93
Быстрова А.А. 133
Быстрова Н.А. 71, 190
Быченко О.С. 27
Вабищевич К.А. 39
Вавилов В.А. 216
Вакорина Т.И. 38
Валеева Л.Р. 216, 232
Валиуллина А.Х. 66
Ванг Дж. 41
Ванрой Ш. 14
Ванхальский А.В. 177
Ванюшкина А.А. 89, 119, 120
Вараксин Н.А. 177
Варижук А.М. 89, 91
Варламов Н.Е. 144
Варфоломеев С.Д. 135
Васецкий Е.С. 7
Васильев А.В. 66
Василькова Д.В. 19
Васильченко Е.Н. 59
Васин А.В. 25, 137
Васина Д.А. 13, 61
Васькина М.В. 39
Вашанов Г.А. 107
Вебер Л. 25
Вейко В.П. 29, 235
Вейко Н.Н. 11, 13
Вейко Н.Н. 115, 136
Веланский П.В. 241
Великоречская И.А. 237
Величко А.К. 3
Веньямина А.Г. 21, 134
Вепсалайнен Й. 101
Вержбицкая Н.Е. 216
Вершинина З.Р. 215, 238
Веселкина Т.Н. 237
Ветрилэ Л.А. 127
Виноградова Д.С. 24
Виноградова С.В. 206, 227
Виролайнен Т.С. 34
Вирысова Г.М. 7
Висанс К. 15
Вихнина М.В. 6
Вишневская Т.А. 199
Вишняков И.И. 89
Владимиров Г.К. 108
Владимиров Ю.А. 108
Владыко А.И. 21
Власкина А.В. 36, 76, 79
Власов В.В. 20, 21, 134, 173, 174, 180
Власова О.Л. 223
Внуков В.В. 154, 194
Водовозова Е.Л. 92, 140, 146, 151
Войтенко Н.Г. 145
Войцицкий В.Е. 124
Волков А.М. 174
Волков П.В. 227, 229, 233
Волкова А.П. 142
Волкова В.В. 107
Волкова М.С. 150
Волохина И.В. 89, 215
Волчо К.П. 76
Волчок А.А. 231, 233
Волынский П.Е. 81, 86
Вольпина О.М. 185
Вольхина И.В. 74
Воробьев Е.В. 137
Воробьев И.И. 141
Воробьева Е.С. 147
Воробьева М.А. 134
Воробьева Н.Е. 5, 48, 141
Воронина Е.В. 139
Воронцов И.Е. 116, 117, 119, 183
Воронцова Е.В. 176
Воротникова Е.А. 6
Вохмянина Д.В. 137
Вуюшина Т.Л. 106
Вржещ П.В. 43, 218
Вторушин С.В. 179
Высоцкий Е.С. 42
Габилов А.Г. 35, 123, 141, 191, 229
Гаврилов А.А. 3
Гаврилов С.Н. 200, 206, 228
Гаврилова О.П. 61
Гаврилова С.А. 164
Гавриш К.В. 172
Гавшина А.В. 14
Гагкаева Т.Ю. 61
Гадеская А. 155
Газарян И.Г. 34
Газимзянов И.Р. 205
Гайнетдинов И.В. 174, 177
Гайнова К.М. 39
Гайтан А.С. 174
Галзитская О.В. 124
Галимова А.А. 129
Галимова Ю.А. 70
Галкин И.И. 98
Галкина К.В. 58, 166
Ганчарова О.С. 25, 67
Гапизов С.Ш. 151
Гаранина И.А. 103, 118, 120
Гарафутдинов Р.Р. 129
Гармаш О.Ю. 195

- Гарушянц С.К. 114
Гатти М. 70, 71
Гвилава И.Т. 204
Гвоздев Р.И. 95
Герасимова М.А. 93
Гельфанд М.С. 3, 4, 114, 118
Генерозов Э.В. 112
Генинг Л.В. 10
Генинг Л.В. 183
Георгиева С.Г. 7, 16, 77
Герасимчук А.Л. 240
Гесслер Н.Н. 162
Гехт А.Б. 114
Гидаятлова З.Г. 189
Гильмиярова Ф.Н. 45, 105
Гимадеев З.Г. 68
Гладилина Ю.А. 154, 235
Гладких Д.В. 21
Гладких И.Н. 97
Гладышев В.Н. 27
Глазунова К.А. 155
Глазунова О.А. 106
Глухова А.А. 16
Глушков А.Н. 216, 217
Гнеушева И.А. 214, 219
Говорун В.М. 14, 19, 23, 28, 89, 103, 114, 118, 120, 123, 200
Гоголев Ю.В. 37, 209
Гоголева Н.Е. 209
Годованный А.В. 41
Голимбет В.Е. 136
Головин А.В. 78, 79
Головина А.Я. 13, 14, 25
Головин А.К. 3
Голотин В.А. 130, 226, 236
Голубев И.В. 34
Голухова Е.З. 187, 188
Голышев С.А. 93
Гончарук М.В. 84
Гончарук С.А. 82, 84, 99
Горбач В.И. 88
Гордеева Е.А. 36, 37
Горина С.С. 37
Горленко В.А. 36
Городничев Р.Б. 114
Гороховец Н.В. 144
Горшков М.В. 121, 125, 127
Горшков О.В. 244
Горшкова Т.А. 244
Горячев Н.С. 95
Горячева О.Г. 244
Горячкова Т.Н. 201
Готтих М.Б. 20, 47
Градыкина Ю.С. 175
Гребенкина Н.С. 92
Гребенников И.С. 216
Грефенштейн М.А. 158, 161
Грецкая Н.М. 178
Грекин А.Н. 37
Гривенников И.А. 158, 159, 161
Григоренко В.Г. 164, 167, 168
Григоров А.С. 27
Григорчик Р. 70
Григорьева Т.В. 205
Григорьева Т.Ю. 242
Григорьева Э.В. 174
Гришанова А.Ю. 176
Гришин Д.В. 154, 235
Гришина Т.В. 133
Гришкина М.Н. 114
Гроздова И.Д. 148, 154
Громова Е.С. 10
Громова Н.В. 196
Гросс Ф. 15
Губайдуллина М.К. 220
Гужова И.В. 63, 64, 66, 75, 174
Гулевич А.Ю. 197
Гуменко Р.С. 198
Гулько В.О. 128
Гурьева Т.С. 161
Гусаков А.В. 187, 229, 234
Гусев Н.Б. 64
Гусев О. 4
Гусев Ю.С. 89, 215
Гусева Е.В. 147
Гусякова О.А. 188
Гущин В.А. 103
Гущина Е.А. 89
Давыдова А.С. 134
Давыдова Л.А. 141, 241
Давыдова М.Н. 242
Дадашева А.А. 161
Дадашова А.Р. 189
Даниленко В.Н. 112, 201
Даниленко С.А. 112
Данилов С.М. 187, 188
Данилова Л.А. 72, 73
Данилова О.В. 239
Данилова Э.В. 238
Данилова Ю.В. 168, 234
Даянова Л.К. 20
Двоеносов В.Г. 131
Дебабов В.Г. 197
Деятков А.А. 164
Дедыш С.Н. 239
Деев И.Е. 82
Деев Л.И. 70
Деев С.М. 100
Дейкин А.В. 14, 25
Деметрива И.Г. 140, 144
Демидкина Т.В. 34
Демидов Е.А. 201
Демидова Е.В. 201
Демин Д.Э. 183
Демин И.А. 179
Демин И.Н. 129
Денисенко Ю.А. 234
Дергачева Д.И. 51
Дергоусова Е.А. 49
Дергоусова Н.И. 67, 228
Дергунова Л.В. 18, 184
Дерябина Ю.И. 51, 162
Джи Ф. 41
Джоши В. 11
Джумагазиева Д.С. 178
Джус У.Ф. 48
Дзама М.М. 14
Дзантиев Б.Б. 214, 219, 220
Дзряев В.А. 154
Дзугоев С.Г. 195
Дзугоева Ф.С. 195
Диброва Д.В. 232
Дмитренко А.С. 244
Дмитренко П.С. 38, 97
Дмитрисва В.Г. 184
Дмитрисва Е.Г. 43
Дмитрисва Е.М. 133
Добрецов Н.Л. 199
Добровольский А.Б. 22
Додд И.С. 209
Долгарева С.А. 52, 71
Долгих Д.А. 230
Долгих Д.А. 40, 140, 144, 151
Долгих Е.А. 210
Долгих О.А. 13
Долинная Н.Г. 14
Долла А. 239
Долотов О.В. 159
Донцов А.Е. 109, 161
Донцова О.А. 4, 13, 14, 18, 19, 24, 25, 86, 141
Доронин Д.А. 107
Дорохов Ю.Л. 23, 52, 171
Доценко А.С. 229, 233, 234
Дроздова П.Б. 62
Дружиловский Д.С. 156
Друцкая М.С. 166
Дубин А. 204
Дубин Ф.И. 202
Дубовцева Е.С. 42
Дубровский Я.А. 92, 162
Дужак Т.Г. 77, 124
Дуленова Е.А. 160
Дунаевский Я.Е. 61, 218
Духанина Е.А. 77
Дыкман Л.А. 216, 240
Дырхеева Н.С. 12
Дэвис В. 209
Дятлов И.А. 167
Евдокимов А. 12
Евдокимов И.И. 175
Евстафьева Д.Б. 100
Евсютина Д.В. 23, 28, 103, 118, 120
Евтушенко Л.И. 244
Евфратов С.А. 14
Егоров А.Д. 143
Егоров А.М. 133, 155, 164, 167, 168
Егорова Е.Д. 206, 227
Ежов А.А. 148
Елизаров И.М. 200, 206
Елисеев Б.Д. 80
Елисейкина М.Г. 226
Елистратова И.В. 75
Елкина Д.А. 25
Елкина Е.А. 15
Ельченинов А.Г. 207
Емельяненко В. 118
Емельянов В.В. 218
Емельянов К.В. 112
Емельянова Е.В. 235
Енукашвили А.И. 196
Еремеев Н.Л. 38, 225
Еремина А. 118
Еремина Л.С. 69, 73
Ерлыкина Е.И. 175, 195
Ермаков А.В. 13
Ермаков Е.А. 44
Ермакова Г.В. 85
Ермакова Ю.Г. 95, 96
Еронина Т.Б. 46, 102
Ерохов П.А. 192
Ерошкин Ф.М. 85
Ершова Е.С. 11, 13, 29, 115, 136
Есауленко Е.Е. 61
Есимбекова Е.Н. 224
Есюнина Д.М. 17, 18, 24
Ефетов К.А. 172
Ефимов С.В. 18
Ефимова Л.В. 179
Ефимова С.С. 142
Ефремов А.А. 43
Ефремова А.С. 65, 183
Ефремова С.Ю. 184
Жаркова М.С. 165
Жданов Д.Д. 13, 61
Жданов Р.И. 131
Желтиков А.М. 96
Жердев А.В. 214, 219, 220
Жесткова Е.М. 136
Жетишева Р.А. 128
Жигачева И.В. 231
Жигис Л.С. 36
Жидко Е.В. 77
Жиленьков Е.Л. 114
Жилева Е.Х. 189
Жирякова М.В. 148
Жмодик С.М. 199
Жолбаева А.З. 187, 188
Жужалова Т.П. 59
Жуков В.А. 209
Журавлев В.Ю. 122
Журавлева Г.А. 62
Жураковский И.П. 186
Журило Л.В. 128
Жусупова А. 155
Жусупова Г. 155
Забродин М.А. 194
Завадская О.А. 50
Завриев С.К. 138
Завьялова М.Г. 123, 164
Зайцев С.Ю. 90, 132
Зайцева Е.А. 225
Зайцева Н.Н. 25
Зак П.П. 109, 161
Закаева З.В. 179
Залевский А.О. 79
Залозная И.В. 158
Замятнин (мл.) А.А. 144
Замятнин А.А. 67
Запорожченко И.А. 134, 173
Зарайский А.Г. 85
Зарубина С.А. 33, 34
Зарудная Е.Н. 108, 132, 217
Зарянов Н.В. 132, 136
Захаревич Н.В. 112, 201
Захаренко А.Л. 76
Захаржевская Н.Б. 89, 112, 119
Захарова Г.С. 34
Захарова М.В. 55
Захарова О.Д. 76
Захарчева К.А. 10
Захарченко М.В. 54, 57, 58
Зацепин Т.С. 47
Заюлина К.С. 200, 206
Зверева Е.А. 219
Зверева М.Э. 4, 18, 86, 141
Згода В.Г. 23, 46, 120, 121, 123, 125–127, 133
Здобнова Т.А. 100
Зеленцова Е.А. 77
Зелепуга Е.А. 88
Землянухина О.А. 59
Зенин В.В. 51, 56
Зенкова М.А. 20, 21, 170, 180
Зерний Е.Ю. 67, 144
Зефилов Н.С. 150
Зиганшин Р.Х. 123
Зинченко А.А. 36, 37, 82
Зинченко Д.В. 67
Злобинов А.В. 230
Золотарев И.Г. 185
Золотарева О.И. 78
Золотаренко А.Д. 195
Зорин Д.А. 135
Зоров Д.Б. 181
Зоров И.Н. 222, 227, 231, 233
Зорова Л.Д. 181
Зубова А.В. 186
Зуев Ю.Ф. 103
Зык Н.В. 141
Зыкова А.М. 158, 161
Зырина А.Н. 58
Ибрагимова М.К. 173
Иванен Д.Р. 46
Иванисенко В.А. 199
Иванисенко Т.В. 199
Иванкин А.В. 68

- Иванов А.В. 19, 26, 128, 213
Иванов А.С. 120
Иванов В.В. 179, 189
Иванов В.Т. 123
Иванов М.В. 121, 125, 127, 182
Иванов Н.М. 93
Иванов П.А. 135
Иванов Ю.Д. 121
Иванова А.Б. 220
Иванова А.С. 85
Иванова В.П. 62
Иванова Е.В. 80
Иванова Е.С. 198
Иванова О.М. 123
Иванова С.А. 43, 44, 133, 180
Иванова Э.В. 171
Иванова Ю.С. 56
Ивасенко Д.А. 238, 240
Ивлиева Т.А. 4
Игнатенко О.В. 133
Игнатов А.В. 9, 17
Иголкина А.А. 209
Ижевская В.Л. 115
Изумрудов В.А. 100, 148
Икрянникова Л.Н. 200
Иксанова А.Г. 175
Илатовский А.В. 5
Иллариошкин С.Н. 113, 157, 158, 164
Илушка И.В. 227
Ильгисонис Е.В. 123
Ильина Е.Н. 114, 120, 122, 200
Ильина И.Ю. 121, 125
Ильичева Е.Ю. 59, 60
Ильюшин В.А. 54
Имакаев М.В. 3
Имянитов Е.Н. 111
Индейкина М.И. 126
Иноземцева Л.С. 159
Ирхин С.Ю. 241
Исаева М.П. 149, 208
Исаев-Иванов В.В. 5
Исайкина Т.Ю. 213
Исакина М.В. 160
Исаков В.В. 226
Исакова Е.П. 51, 162
Исмагилова Р.К. 114, 242
Кабанов А.В. 225
Кабиллов М.Р. 134
Кадников В.В. 198, 238
Казаков А.С. 67
Казанская Г.М. 174
Казанцева О.А. 55
Казанцева П.В. 173
Казнадзей А.Д. 118
Калаев В.Н. 59
Калаева Е.А. 47
Калашников А.А. 148
Калиберда Е.Н. 37, 227
Калина Р.С. 97
Калинина Е.В. 172, 175
Калинина Н.О. 93, 96
Калинкина М.А. 147
Каллио И. 86
Каллистов А.Ю. 237
Камарова К.А. 75
Камашев Д.Э. 79
Каменева Л.В. 11, 13, 115
Каменникова И.А. 73, 213
Камиз А.М. 117
Каминская Л.А. 128
Каневский М.В. 109
Кантидзе О.Л. 3
Каныгина А.В. 114
Капицкая К.Ю. 174
Капрельянц А.С. 17
Карабанов А.В. 157
Караваева Ю.Е. 166
Карасева О.В. 127
Каргов И.С. 33, 34
Карлинский Д.М. 36, 82
Карначук О.В. 54, 198, 238–240
Каронова Т.Л. 133
Карпенко А.А. 196
Карпенко Л.Ю. 196, 220
Карпеченко И.Ю. 59
Карпеченко Н.А. 59
Карпов Д.С. 56, 121
Карпова Е.В. 136
Карпова И.Ю. 114, 200
Карпова О.В. 145, 212
Карпова Я.Д. 192
Карцева О.В. 229
Карякин А.А. 129, 130, 132, 136, 137
Карякина Е.Е. 129, 137
Касацкий П.С. 24
Касьянов А.С. 112
Качалова Г.С. 186
Кашуро В.А. 182
Каюмов А.Р. 214
Кейнанен Т.А. 101
Кельмансон И.В. 96
Керкешко Г.О. 158
Кесманн Г. 117
Ким Н.Ю. 208
Ким Ю.А. 48
Кимеклис А.К. 209
Кирбаева Н.В. 66
Кириенко А.Н. 210
Кириллов С.В. 24
Кирпичников М.П. 40, 140, 144
Кирюхин Д.О. 53
Кирюшина Н.А. 124
Киселев Г.Г. 100
Киселев Л.Л. 80
Киселев Р.С. 174
Киселева О.И. 122
Киямова Р.Г. 172
Клейменов С.Ю. 51, 79
Клейменова А.А. 75
Клементьев К.Е. 98
Клецкий М.Е. 150
Климанова Е.А. 49, 76
Климина К.М. 112
Климова Е.А. 200
Климова М.А. 6
Клинов Д.В. 91
Клотченко С.А. 25, 137
Клуг Г. 25
Ключников А.А. 121
Клячко Н.Л. 225
Книрель Ю.А. 166
Кнорре Д.А. 53, 58, 58, 166
Княжанская Е.С. 20, 47
Князева О.А. 171
Кобозев В.В. 174
Ковалев Л.И. 69, 73, 128, 213
Ковалева З.В. 56
Ковалева М.А. 73, 128, 213
Коваленко Г.А. 221
Коваленко Т.Ф. 169
Коваль В.В. 39
Коваль О.А. 143, 152, 170, 176
Ковзан А.В. 54, 58
Ковина А.П. 8
Ковнир С.В. 141
Ковтун А.С. 201
Кожевникова Д.А. 206
Кожевникова Е.Н. 68
Кожина Т.Н. 12
Кожухарова И.В. 56
Козин С.А. 63, 98
Козина Л.С. 158
Козлов А.В. 188
Козлов В.В. 26
Козлов М.В. 75
Козлов М.Н. 237
Козлов С.А. 158
Козлова Ю.Н. 205
Козловская Э.П. 97, 149
Козырева К.А. 9
Кокряков В.Н. 74, 101, 165
Колачева А.А. 157
Колегова Е.С. 171
Колобов А.А. 74
Коломин Т.А. 142, 157
Колосов П. 53
Колотьева Н.А. 105
Колчанов Н.А. 199, 201
Колышкин В.М. 139, 140
Комаров П.А. 85
Комарова Е.С. 14
Комарова Е.Ю. 174
Комарова Н.В. 34, 94
Комарова Т.В. 23, 52, 171
Комкова М.А. 130
Кондакова А.Н. 166
Кондакова И.В. 171
Кондратьев М.С. 214, 226
Кондратьева Е.Г. 222
Кондратьева С.А. 177
Кондрашова М.Н. 54, 57, 58
Кондукторов К.А. 75
Конев А.Ю. 5
Коневега А.Л. 16, 24
Конкина И.Г. 171
Коннова С.А. 109
Коннова Т.А. 103
Коновалов К.А. 88
Кононихин А.С. 126, 135
Конопля А.И. 188, 190
Конопля Н.А. 52, 71
Контаров Н.А. 49, 92
Конькова М.С. 13, 115
Копанцева Е. 53
Копать В.В. 209
Копейкин П.М. 165
Копылов А.Т. 121, 123, 125, 164
Копылова Г.В. 65, 104
Копытова Д.В. 16
Корбан С.А. 223
Корневский А.В. 158
Коренюк И.И. 155
Корженевский Д.А. 36, 76, 79
Корман Д.Б. 231
Корнбергер П. 233
Корнеев К.В. 166
Корнеева О.С. 226
Корниенко М.А. 114
Корниенко Ю.С. 51, 56
Коробкина О.В. 35
Коробов А.А. 195
Коросов Д.О. 185
Королев В.Г. 12
Королев С.П. 20
Королева В.А. 226
Коростелева А. 118
Коротецкая М.В. 169
Короткова Д.Д. 85
Короткова О.Г. 222, 227
Коршунова А.В. 202
Кос П. 3
Косоруков В.С. 171
Кост О.А. 187, 188, 225
Костарева О.С. 48
Костецкий Э.Я. 28, 141
Костин Н.Н. 229
Кострова Т.А. 189
Костромская Д.В. 174
Кострюкова Е.С. 114, 200
Костылева Е.В. 237
Костюк А.И. 96
Костюк С.В. 11, 13, 29, 115, 136
Костюченко М.В. 3, 4
Костянец О.И. 172
Костянко М.В. 216
Котельникова О.В. 36, 37
Котельянский В.Е. 13
Котляров Р.Ю. 212
Котова Е.А. 88, 147
Кочетков С.Н. 56, 75
Кочеткова А.А. 213
Кочеткова Т. 204
Кочнева Г.В. 170
Кошелев С.Г. 97
Кравченко О.В. 17
Кравчук О.И. 28
Красикова А.В. 19
Красикова Ю.С. 11
Красильников И.В. 139
Красильникова И.А. 159, 179
Красицкая В.В. 134
Красников Б.Ф. 162
Красникова Е.Н. 72, 73
Краснов А.Н. 5
Красновская О.О. 141
Кратасюк В.А. 40, 224
Краузе Й. 205
Крауклис И.В. 80
Кривошапкин А.Л. 174
Кривошей А.В. 43, 218
Кролевец И.В. 194
Кротенко Н.В. 180
Кротенко Н.М. 180
Круглов А.А. 166
Круглов А.Н. 200
Круглова Н.А. 164
Крюкова М.В. 186
Крюкова Е.А. 230
Крюкова О.В. 187, 188
Крячков В.А. 35
Кубарева Е.А. 9, 14, 15, 25
Кубланов И.В. 200
Кубланов И.В. 200, 202, 206, 207
Кувичкина Т.Н. 232
Куджаев А.М. 36, 42
Кудряева А.А. 39, 55
Кудряшова Е.В. 155
Кузиков А.В. 91
Кузнецов А.Е. 94
Кузнецов В.Л. 221
Кузнецов Н.А. 9
Кузнецова И.М. 44, 94, 104
Кузнецова К.Г. 121
Кузьменко Е.О. 22
Кузьмичев П.К. 81, 85, 86
Кукушкина И.В. 65
Кулакова О.Г. 110
Кулаковский И.В. 116, 117, 119, 183
Кулебякин К.Ю. 143
Кулигина Е.В. 26, 143, 152, 170, 176
Кулик Д.С. 96
Куликова А.А. 98
Куликова В.А. 107, 244
Куликова В.В. 34
Куликова О.И. 163

- Кулипанов Г.Н. 201
Куличевская И.С. 239
Кулуев Б.Р. 243
Кульбачинский А.В. 9, 17, 18, 22, 24, 49
Кульминская А.А. 46, 223
Кулюдина Е.Р. 185
Куницына Т.А. 107
Курбаш Д.В. 166, 183, 185
Куприянова Е.А. 184
Купрюшкин М.С. 21
Куранова И.П. 223
Курбатов Л.К. 23
Курбатов С.В. 150
Курганов Б.И. 46, 51, 102
Курдюмова И.В. 97
Курзанов А.Н. 62
Курми П. 11
Курочкин И.Н. 224
Куршакова М.М. 16
Кусочек П.А. 228
Кутилин Д.С. 127
Кутузов М.М. 11
Кутяков С.В. 143
Кухаренко Л.А. 166
Куценко А.С. 42
Лав А. 96
Лавина А.М. 215
Лавренова В.Н. 61
Лаврик О.И. 8, 11, 12, 76
Лавриненко И.А. 107
Лаврова Е.А. 181
Лагарькова М.А. 152, 158
Лагунин А.А. 156
Ладыгина В.Г. 114
Лазарев В.Ф. 63, 64, 66, 75
Лазарева Е.В. 199
Лазебный О.Е. 28
Лайков А.В. 184, 205, 242
Лактионов П.П. 124, 134, 173, 174
Ламзин В. 18, 86
Ландо А.С. 116, 119
Ланин А.А. 96
Лапина И.А. 169
Лаптев И.Г. 14
Лапшин Р.Д. 147
Лапшина Л.А. 208
Ларин А.К. 112, 114
Ларионова М.Д. 42
Ларичкин А.В. 128
Ляхин А.В. 183
Лашук О.О. 93
Лебедев Д.В. 5
Лебедев Ю.Б. 165
Лебедева М.А. 211
Лебедева Н.А. 11
Лебедева О.С. 158
Лебединский А. 202, 204
Лев А.И. 167
Левашов А.В. 38
Левашов П.А. 38
Левашова О.А. 185
Левицкий Д.И. 65, 99
Левицкий Л.И. 125, 127
Лейченко Е.В. 149
Леконцева Н.В. 17
Леонова Л.Е. 74
Леонова Л.Е. 97
Леонова Т.С. 101
Лесняк Д.В. 14
Лесовой Д.М. 81
Лехнов Е.А. 134
Лила Н.Л. 183
Лильина А.В. 85
Лимборская С.А. 18, 113, 142, 184
Линден М. Ван 107
Лиюнова А.В. 117
Липкин А.В. 134, 186
Лисина О.Ю. 159
Лисица А.В. 122
Лисица А.Е. 40
Лисицин Ф.В. 89
Лисицина Е.С. 114
Лисицкая К.В. 69, 73
Лисовин А.В. 150
Литвиненко И.Л. 191
Литвиненко Л.А. 72
Литвинова Е.Г. 54, 57, 58
Литвяков Н.В. 173
Лобанов М.Ю. 124
Лобанова Н.В. 139
Лобас А.А. 121, 125
Логачева М. 3, 4
Логашенко Е.Б. 180
Логвинова Д. 99
Логинов П.А. 147
Логинова Л.В. 133
Логунова Н.Н. 169
Лозинская Н.А. 150
Локтионов А.Л. 71
Локтионова А.В. 190
Ломакин Я. 123, 160, 193
Ломакина Г.Ю. 154, 215
Ломзов А.А. 21, 39
Ломинадзе Г.Г. 200
Лопатин С.А. 200
Лопачев А.В. 164
Лопина О.Д. 49, 76
Лосев О.Э. 178
Лузина О.А. 76
Лукашев Е.П. 95
Лукашева Е.В. 50
Лукашевич О.В. 10
Лукьянчикова Н. 8, 12
Лунева О.Г. 70
Лутова Л.А. 211, 212, 218
Лучинская Н.Н. 53
Лушников А.В. 214, 219
Львовская Е.И. 163
Любасовская Л.А. 114
Любина А.П. 68
Люблинская О.Г. 51, 56, 56
Люпина Ю.В. 192
Лямзасв К.Г. 147
Ляпунова Н.А. 136
Маев И.В. 114
Мажуга А.Г. 141
Мазейка А.Н. 141
Мазин П. 4, 117
Мазина М.Ю. 5
Мазуров А.В. 22
Мазуров Д.В. 164
Мазурова А.С. 27
Майнскова М.А. 126
Макаров А.А. 63, 98
Макаров В.А. 144
Макаров В.В. 93, 96, 104
Макарова А.В. 9, 14
Макарова М.Н. 195
Макарова С.С. 93
Макарцова А.А. 143, 152
Макеев В.Ю. 116, 117, 119
Макеева В.Ф. 102
Маклецова М.Г. 163
Максеев А.Р. 184, 242
Максименко А.В. 225
Максимов Г.В. 40, 70
Максимов Е.Г. 50, 98, 108
Максимова Е.Д. 148
Максимова Е.М. 24
Максимова М.Ю. 163, 164
Маланин С.Ю. 114, 184, 205
Малахова М.В. 120, 200
Малев В.В. 142
Маликова А.З. 75
Малиновская Е.М. 11, 13, 115
Малошенко Л.Г. 219, 236
Малуп Т.К. 199
Мальшев А.Ю. 107
Мальсагова К.А. 121
Мальцева Е.А. 11
Малышко А.Н. 4
Мамедов А.Э. 48
Маникам Д. 225
Манолов А.И. 114, 120
Манских В.Н. 25
Манувер В.А. 103, 235
Мануилова Е.С. 158, 161
Манцзов А.Б. 18, 80, 86, 88
Маргиева О.И. 195
Маргулис Б.А. 63, 64, 66, 75, 174
Марданов А.В. 32, 198, 200, 202, 237, 238
Марданова А.М. 68, 234
Марданова Е.С. 212
Марзи С. 15
Марковна Е.В. 191
Маркелова М.И. 184, 203
Маркина О.А. 214, 219
Марков А.В. 180
Марков Д.Д. 159
Марков О.В. 170
Маркова О.В. 53, 58, 166
Маркова С.В. 42
Маркосян К.А. 51
Мартинов А.Г. 6
Мартинова М.И. 196
Мартинова Н.Ю. 85
Марченков С.Н. 140
Марьясина С.С. 88
Маслов В.Г. 80
Маслов М.А. 170
Маслова А.О. 78
Матвеев А.Л. 154, 166
Матвеева В.А. 154
Матвеева Н.А. 110
Матвеев А.Г. 62
Матиненко Л.И. 231
Матольгина Д.А. 38
Матросова Л.Е. 149, 168, 169
Матюшенко А. 65, 104
Матюшкина Д.С. 103, 120
Махно В.И. 24
Махотенко А.В. 93, 103
Маянский Н.А. 200
Медведев А.Е. 120
Медведева Е.С. 242
Медведева Ю.А. 117
Меденцев А.Г. 50
Меднова И.А. 180
Медяник И.А. 175
Медяник И.А. 195
Меерсон М.Б. 19
Мейснер Л.Л. 154
Мейснер С.Н. 154
Мелешкина О.И. 188
Мелик-Нубаров Н.С. 148, 154
Мелихова Т.Д. 37
Мельник Б.С. 93
Мельникова Л.С. 3, 4
Мельникова Н. 122, 196
Мельничук А.В. 22
Мензорова Н.И. 38
Менчинская Е.С. 149
Меньшуткина Н.В. 138, 147
Мерзлов Д.А. 222, 233
Меркель А. 204
Мешалкина Д.А. 174
Мешкова Т.Д. 164
Мещанинов В.Н. 69
Мещанинова М.И. 21
Мешерякова И.А. 201
Мизгина Т.О. 243
Миль Е.М. 231
Милотина Н.П. 154, 194
Милотина Ю.П. 158
Минеев К.С. 81, 82, 84, 99
Миннулли Л.Ф. 68
Миронов А.А. 118
Миронов А.С. 198
Миронов К.С. 98
Миронова И.К. 109
Миронова Н.Л. 20, 170
Мирополюска Н.А. 17, 22
Мирошников В.М. 135
Мирошниченко С.К. 20
Митрофанов С.И. 135
Миткевич В.С. 63
Михайлина А.О. 17, 48
Михайлов В.С. 28
Михайлов С.Н. 47
Михайлова А.Г. 36
Михайлова В.В. 46, 102
Михайлова Е.В. 243
Михайлова Е.Р. 63, 64, 66, 75
Михайлова Е.С. 177
Михайлова Т.В. 19, 42, 87
Михайловская М.И. 138
Михалева Е.А. 3
Михалева И.И. 127
Михантьева Е.А. 106
Михура И.В. 153
Модестова Ю.А. 37
Можаева И.В. 195
Моисеева Е.М. 215
Мокрова С.С. 203
Мокрушина Ю.А. 230
Мокрякова М.В. 219
Мокшина Н.Е. 244
Молоденский Д.С. 64
Молодина В.В. 3, 4
Молчанова В.И. 243
Монастырная М.М. 97, 149
Монахова М.В. 9, 14
Мордкович Н.Н. 29, 235
Морозкин Е.С. 134, 173
Морозов А.В. 138
Морозов П.Г. 150
Морозов С.Г. 75
Морозов С.Ю. 144
Морозова А.А. 160
Морозова В.В. 205, 217
Морозова Е.А. 34
Морозова К.В. 169
Морозова М.М. 164
Морозова О.А. 38
Мочалина П.Ю. 236
Мочалов К.Е. 90, 95
Мошков К.А. 80
Мошковский С.А. 121, 125
Музыкангов А.А. 242
Мунинова К.Т. 126
Мунзарова А.Ф. 70, 71
Мурадинова Р.Э. 178
Муратова А.М. 168
Муронец В.И. 72, 100, 102, 105, 225

- Мурский С.И. 188
Муртазалиева Х.А. 156
Мухаметшина Л.К. 68
Мухина И.В. 147
Мухтарова Л.Ш. 37
Мясников А. 15
Мясоедов Н.Ф. 65, 142, 157, 158, 183
Набережных Г.А. 88
Набиев И.Р. 95
Нагорных М.О. 55, 198
Надеждин К.Д. 82, 86, 87
Назаров И.Б. 5
Назаров П.А. 147
Назина Т.Н. 202, 239
Назипова А.А. 67
Налетова И.Н. 100
Нарайкина Ю.В. 19
Нарайкина Ю.В. 22
Нарыжный С.Н. 46, 125, 126
Наумов В.Г. 128
Наумова Н.Г. 74
Неборак Е.В. 143
Невинский Г.А. 43, 134
Негинская М.А. 181, 182
Недурובה И.А. 183, 187
Недоспасов С.А. 166
Незаметдинова В.З. 201
Некрасов А.Н. 37, 40, 82
Немашкалова Е.Л. 67
Немудрая А.А. 143, 152
Немцева Е.В. 40, 93
Ненашева В.В. 179
Нериновский К.Б. 244
Нестерчук М.В. 14
Нефедова В.В. 64
Нефедова Л.И. 237
Нигматуллина Л.Р. 215, 238
Нижник А.Н. 161
Никашина А.А. 128
Никитин Е.С. 96
Никитин Н.А. 145, 212
Никитина В.Н. 132, 136
Никифоров А.А. 107, 244
Николаев Е.Н. 126, 135
Николаев Ю.А. 237
Николаева А.Ю. 32, 232
Николаева К.Д. 53
Николаева О. 99
Николенко Ю.В. 5
Никольский И.И. 225
Никольский Н.Н. 51, 56
Никонов С.В. 48
Никонова А.А. 148
Никонова Е.Ю. 17
Никотина А.Д. 63, 64, 66
Никулин А.Д. 17, 34
Никулина Д.М. 101, 135
Никулина С.В. 137
Нисканен С.А. 75
Новикова Е.В. 82
Новикова О.Д. 88, 130, 192, 236
Новикова С.Е. 123
Новичкова М.Д. 172, 175
Новожилова Н.М. 221
Новолаев Т.И. 13
Новосадова Е.В. 158, 161, 179
Новотоцкая-Власова К.А. 207
Нокель Е.А. 36, 37
Носарева О.Л. 57, 69
Носкова Ю.А. 130
Нужина Ю.В. 6
Нургалiev Д.К. 205
Нурмурaдов Н.К. 172, 175
Нуштаева А.А. 143
Нямсурэн Ч. 216
Обухов Ю.Н. 97
Обухова Л.М. 175, 195
Овчинникова Е.Д. 38
Овчинникова М.В. 36
Овчинникова Т.В. 74, 99, 101, 148, 165, 167
Оглоблина А.М. 14
Огородова Л.М. 179
Одинцова Е.С. 43
Озолина Л.А. 169
Окорокова Н.А. 29, 235
Олейников В.А. 90, 95
Онищенко Н.Р. 50
Онуфриев А.В. 5
Опперт Б. 6
Орбиданс А.Г. 77
Орецкая Т.С. 15
Орлов В.И. 148
Орлов Д.С. 74, 165, 191
Орлов С.Н. 70, 76
Орлов Ю.А. 60, 207
Орлова В.С. 13, 61
Орлова Н.А. 141
Осе И.В. 147
Осетрова М.С. 123
Осипов Д.О. 227, 229
Осипов Е.М. 67, 85
Остерман И.А. 13, 14, 24, 25, 88
Остроумова О.С. 142
Отиев М.А. 195
Ошкин И.Ю. 239
Павлова А.В. 9
Павлова А.С. 21
Павлова Г.А. 68, 70, 71, 142
Павлович П.В. 123
Павловская Н.Е. 214, 219
Падкина М.В. 218
Панина А.А. 144
Панина С.Б. 194
Панина Ю.С. 236
Панкевич Е.В. 163
Панкратова Е.В. 77
Пантелеев П.В. 99, 148, 165
Пантелеев С.В. 227
Пармон В.Н. 199
Парнова Р.Г. 181
Парунова Ю.М. 134
Паршин П.А. 33
Паршкова Е.В. 172
Паршукова Д.А. 43
Патрушев Л.И. 20, 169
Патутина О.А. 20
Пахомов А.А. 132
Пашинцева Н.В. 69
Пашченко В.З. 98
Певзнер И.Б. 181
Пельтек С.Е. 199, 201
Пенин А. 3, 4
Пенкина А.И. 9
Пеньков Д.Н. 143
Первова Ю.В. 105, 188
Перевалова А. 204
Перекуча Н.А. 189
Перепечасва М.Л. 176
Перминова Л.В. 221
Пермяков С.Е. 67
Першина А.Г. 179
Петракова А.В. 220
Петренко А.Г. 82
Петрова Е.К. 145
Петрова Н.В. 8
Петрова Н.С. 21
Петрова О.А. 4, 13, 18, 86, 88
Петрова Т.Д. 50
Петровская Л.Е. 151, 199, 207, 230
Петровский С.В. 139
Петруня И.В. 52
Петрусева И. 8, 12
Петрушанко И.Ю. 49
Петрюков К.С. 14, 25
Петушков И.В. 49
Петушкова А.И. 144
Пименов В.Г. 175
Пименов Н.В. 237, 238
Пимкин М.А. 106
Пиндюрин А.В. 68, 70, 71
Пинелis В.Г. 65, 127, 159, 179
Пинзон Варела Л.А. 242
Пиняев С.И. 160
Пипия С.О. 230
Пирадов М.А. 123
Пислягин Е.А. 149
Пичутин А.М. 7
Плетнев Ф.И. 13, 14
Плешакова Т.О. 121
Плотников А.А. 154, 194
Плотников Е.В. 54, 240
Плотников Е.Ю. 181
Плотникова М.А. 25, 137
Плясунова С.А. 58
Побегуц О.В. 103
Побегуц О.В. 14, 19, 120
Поболелова Ю.И. 133
Погаржельская Н.С. 236
Погодин П.В. 156
Погорелко Г.В. 236
Погорелова Т.Н. 128
Подволоцкая А.Б. 226
Подгорский В.В. 89
Подобед О.В. 154
Подобед О.В. 235
Подольская Е.П. 92
Подосокорская О. 200, 204, 206
Позднякова Л.П. 140, 144
Позмогова Г.Е. 91
Покровская М.А. 235
Покровская М.В. 61, 154
Покровский В.С. 61, 154, 235
Покудина И.О. 150
Полесскова Е.В. 24
Полоников А.В. 188
Полтараус А.Б. 202
Полужтова Е.У. 112
Польшаков В.И. 4, 18, 80, 86, 88
Поляков К.М. 80, 87, 235
Поляков Л.М. 46
Полякова М.А. 214, 219
Пометун (Алексеева) А.А. 33, 34
Помыткин И.А. 179
Пономарева А.А. 173, 174
Пономарева О.А. 218
Пономаренко Н.А. 48, 229, 230
Пономарчук О.О. 70
Попик В.М. 201
Попинако А.В. 89
Попов В.О. 32, 67, 79, 80, 85, 87, 89, 186, 228, 232
Попов И.А. 126
Попов К.А. 61, 62
Попова В.В. 16
Попова Д.А. 19
Попова Е.Н. 98
Попова Ю.В. 70, 71
Попруга К. 65, 104
Порозов Ю.Б. 210
Поройков В.В. 156
Портнягина О.Ю. 130, 141, 192, 236
Порцева Т.Н. 77
Потапенко А. 118
Потеряева О.Н. 186
Потехина Н.В. 244
Празднова Е.В. 150
Прасолов В.С. 33
Преловская А.Н. 195
Преснова Г.В. 133
Припутневич Т.В. 114
Проворов Н.А. 209
Прокопенко Ю.А. 36, 37
Прокофьева Д.С. 145
Прокушина К.С. 217
Просникова К.В. 196
Протопопова А.Д. 91
Прохорова И.В. 14
Прудникова Т.Ю. 174
Пу Ж. 41
Пуговкина Н.А. 51, 56
Пупов Д.В. 18, 22, 24, 49
Путинцева О.В. 47
Путляев Е.В. 145
Путляева Л.В. 183, 185
Пушальский Я.В. 209
Пучкова Л.В. 59, 60, 207
Пышный Д.В. 20, 21
Пятницкий М.А. 121
Пятов С.М. 176
Равин Н.В. 32, 198, 212, 237, 238
Радомяская В.М. 105
Разин С.В. 3, 7, 8
Разуваева А.В. 68, 70, 71
Ракитина Д.В. 89, 114
Ракитина Т.В. 67, 76, 79, 228, 232
Раменская Н.П. 72
Рассказов В.А. 38, 130, 226, 236
Ревазян А.С. 95
Ревин В.В. 160, 196
Ревина Э.С. 196
Ревтович С.В. 34
Рейнссон Й. 76
Ренда Ф. 70, 71
Релук С.Э. 244
Реунов А.В. 208
Реутов В.П. 127, 182
Речкунова Н.И. 11
Решетилос А.Н. 232
Ривкина Е.М. 199, 207
Ризванов А.А. 66
Римарева Л.В. 236
Рихтер В.А. 26, 143, 152, 170, 176
Ровнягина Н.Р. 64
Роговская Н.Ю. 162
Родина Е.В. 18, 86
Родина Н.П. 104
Родионов А.Н. 34
Родненков О.В. 70
Роднина М.В. 24
Рожкова А.М. 222, 229, 231, 233
Розанов А.С. 199
Рокицкая Т.И. 88
Роман С.Г. 46
Романова В.А. 205
Романова Е.А. 65
Романова Н.А. 139
Романова Ю.Д. 184, 242
Романовская Е.В. 6
Ромашова Ю.А. 122
Ромби П. 15
Ромодин Л.А. 108

- Росинская А.В. 157
Ротанова Т.В. 36, 42
Рошаль Л.М. 127
Рощин М.В. 96
Рощина М.А. 107
Рубин А.Б. 40, 98
Рубина К.А. 83
Рубцова М.П. 14, 19, 35, 141
Рубцова М.Ю. 133, 164, 167, 168, 224
Руда М.Я. 110
Рудакова Н.Л. 54
Руденко М.М. 157
Руденская Г.Н. 93
Рудик А.В. 156
Румш Л.Д. 36, 37, 82, 227
Румянцев К.А. 94
Румянцева М.М. 153
Русецкая Н.Ю. 178
Русских Г.С. 186
Рыбалкина Е.Ю. 142
Рыбинец А.С. 149
Рыкова Е.Ю. 173, 174
Рыскина Е.А. 45, 105
Рычков Г.Н. 5
Рябоконь А.М. 135
Рязанцев Д.Ю. 138
Рязанцева Н.В. 191
Саатов Б.Т. 184
Саатов Т.С. 193
Сабирова А.Р. 54
Савватеева Л.В. 144
Савельев А.Н. 60, 207
Савельева А.В. 26
Савельева Т.М. 123
Савин С.С. 33, 34, 38
Савицкий М.Ю. 28
Сагакянц А.Б. 194
Садова В.А. 163
Сазонов А.Э. 179
Сайк О.В. 199
Салафутдинов И.И. 184, 242
Салахутдинов Н.Ф. 76, 180
Салина Е.Г. 27
Саломатина О.В. 180
Самохвалов В.А. 196
Самохин А.Н. 185
Самсонова К.И. 147
Санина Н.М. 141, 241
Санькова Т.П. 207
Саплинов Е.Ю. 67
Саранцева С.В. 72, 152
Саратцев А.В. 193
Саркисян В.А. 213
Сафаров Р.Р. 138, 147
Сафонова Т.Н. 235
Сафронова В.И. 209
Сахабудинова А.Р. 129
Сащенко Л.П. 65
Саярова Р.М. 66
Сверчинский Д.В. 75
Свешников П.Г. 140, 144
Свищевская Е.В. 151
Свириева Е.Н. 166
Свистунов А.А. 193
Северин Ф.Ф. 166
Северин Ф.Ф. 53, 58
Сейкина А.И. 196
Сейткалиева А.В. 38
Секова В.Ю. 51
Селенина А.В. 73
Селифанова М. 118
Семашко Т.А. 23, 114, 118, 120
Семенов А.И. 201
Семенов Д.В. 26, 170
Семенова Е.М. 202
Семенова Ж.Б. 127
Семенова Т.А. 61
Семенюк П.И. 66, 100, 225
Семенюк Ю.П. 150
Семке А.В. 133
Семякина-Глушковская О.В. 109
Сенин И.И. 67
Сенченкова С.Н. 244
Сербя Е.М. 236
Сергеева В.А. 11, 13, 115
Сергеева М.Г. 161, 163
Сергеева О.В. 13, 14, 25
Сергиев П.В. 13, 14, 24, 25, 88
Серебрякова М.В. 14, 67, 105, 144
Серегин А.А. 133
Серегин Ю.А. 139
Серегина Т.А. 198
Середа А.М. 233
Середа А.С. 237
Сереженков В.А. 150
Серова О.В. 36, 42
Сиголаева Л.В. 91
Сидоренко А.С. 125
Сидоренко С.В. 70, 76
Сидорин Е.В. 208
Сидорук К.В. 218
Сизов В.А. 22
Силачев Д.Н. 181
Сименел Е.С. 161
Симонов Ю.П. 7
Симонова В.В. 158
Симомян Р.А. 185
Синецкий С.П. 197, 203, 204
Синицын А.П. 222, 227, 231, 233
Синицына О. 96, 222, 234
Синцова О.В. 149
Синягина М.Н. 205, 242
Синянский Л.Е. 180
Ситдинов А.Г. 205
Скворцов Д.А. 141
Скворцова Ю.В. 177
Скляр И.В. 7
Скоморохова Е.Б. 182
Скороходова А.Ю. 197
Скрябин К.Г. 141
Скулачев В.П. 147
Скулачев М.В. 147
Слепокуров А.А. 226
Слепченко Л.В. 130, 226
Слободина А.Д. 72
Слободкин А.И. 200, 202, 205, 208
Слободкина Г.Б. 205, 208
Сломинский П.А. 113, 114, 142, 157, 173
Случанко Н.Н. 41, 50, 81, 98, 108
Слынько Н.М. 199
Смирнов И.В. 35, 45, 229, 230
Смирнов С.А. 38
Смирнова Д.В. 224
Смирнова Е.А. 58, 166
Смирнова И.С. 51, 56
Смирнова Л.П. 133, 180
Смирнова Л.П. 43, 44
Смолянинова Л.В. 76
Снытникова О.А. 187
Соболева А.В. 133
Соболева Н.Г. 24
Соколенко Н.И. 106
Соколов Н.Н. 13, 61, 154, 235
Соколов С.С. 53, 58, 166
Соколова Д.Ш. 202, 239
Соколова Е.А. 100
Соколова Е.Е. 42
Соколова Т.Г. 200
Соколовский И.В. 124
Сокуев Р.И. 143
Солдатенков А.Т. 143
Соловьев А.Г. 144
Соловьев А.С. 106
Соловьева А.Г. 190
Соловьева В.В. 66
Соловьева Д.О. 95
Соловьева Е.М. 121
Соловьева Е.М. 125
Соловьева Е.Ф. 192
Соловьева Т.Ф. 208
Солохина И.Ю. 214, 219
Сомма М.П. 70, 71
Сормачева Е.Д. 77
Сорокин А.В. 52, 71
Сорокин Д.Ю. 85, 87
Сорокина Е.Г. 127, 182
Сорокина С.А. 225
Сотсков В.П. 107
Софронова А.А. 100
Сошникова Н.В. 7
Спасская Д.С. 204
Спиридонова В.А. 22
Спирин П.В. 33
Спирина Л.В. 171
Спирина Ю.П. 160
Спиру М. 205
Ставровская А.В. 157
Ставровская Е.Д. 118
Ставчанский В.В. 184
Старикова Т.В. 188
Староверов Д.Б. 96
Староверов С.А. 216
Стародубцева Н.Л. 126
Стахеев А.А. 138
Стволинский С.Л. 163, 164
Стенкова А.М. 141
Степаненко Олеся В. 94
Степаненко Ольга В. 94
Степанов А.В. 145, 149, 160
Степанов Г.А. 143
Степанов С.В. 182
Степанова А.А. 230
Степанова А.В. 229
Степанова В. 4, 113
Степанова Л.А. 212
Степоява Е.А. 57, 69, 189, 191
Степченко А.Г. 77
Стефанов В.Е. 80, 133
Стеханова Т.Н. 32, 228
Стеценко Д.А. 21, 146
Стойнова Н.В. 41
Стремовский О.А. 100
Стрешинская Г.М. 244
Стройлова Ю.Ю. 225
Студенников А.Е. 216, 217
Стукачева Е.А. 177
Ступников А. 4
Субач О.М. 107
Субач Ф.В. 107
Суворова И.А. 118
Судницына М.В. 64
Суздалцева Ю.Г. 152
Сулацкая А.И. 104
Сулейманова А.Д. 232
Сулима А.С. 209
Султанов Р.И. 112
Суменкова Д.В. 46
Сумная Д.Б. 163
Сунграпова К.Ю. 143
Суплатов Д.А. 32
Супонова Н.А. 123
Супрун Е.В. 91
Суринов А.М. 65, 159, 179
Суслев Е.В. 76
Сусоров Д. 19, 26, 53
Суспицын Е.Н. 111
Сутормин Р. 4
Суханов М.В. 11
Суханова А.С. 59
Суханова М.В. 11
Сухих Г.Т. 126
Суховерков К.В. 155
Сыкулев Ю.К. 48
Сыромятникова В.Ю. 131
Сяткин С.П. 143
Тальянский М.Э. 96
Тамкович С.Н. 124
Таран О.П. 199
Таранов Е. 204
Таранова Н.А. 219
Тарантул В.З. 10, 158, 179
Тарасова И.А. 125, 127
Татарский В.В. 7
Тверской А.М. 70, 76
Творогова В.Е. 212
Тедтосева А.И. 195
Теплова В.В. 57
Теплова Ю.П. 226
Терехин Г.А. 77
Терехина Н.А. 77, 244
Терехов С.С. 229, 230
Терешкова А.В. 125
Терешенкова В.Ф. 106
Тикуннова Н.В. 166, 205, 217
Тимофеевич Е.Д. 220
Тимофеев А.В. 109
Тимофеев В.И. 36, 76, 223
Тимошенко В.В. 134
Титаева Е.В. 22
Титов В.А. 216
Тихомирова В.Е. 187, 188
Тихомирова Н.К. 67
Тихонова А.О. 54
Тихонова О.В. 123
Тихонова Т.В. 67, 80, 85, 87, 89, 200, 228
Тихонова Т.Н. 64
Тихонович И.А. 209
Тихонович И.А. 210
Тихоппав В.Ю. 60
Тишков В.И. 33, 34, 38
Тищенко С.В. 17, 48
Ткачев А.А. 150
Ткаченко Н.В. 170, 176
Ткачук В.А. 83, 143
Тойменцева А.А. 203, 234
Токарчук А.В. 147
Толкачева А.А. 10
Толкачева А.В. 66
Топоркова Я.Ю. 37
Топорова В.А. 140, 144
Топчу Ю.А. 177
Торкова А.А. 231
Тошаков С.В. 200, 206
Третьякова Д.С. 50, 92, 146
Трифопова Е.А. 145
Троицкая О.А. 170, 176
Трофимова И.Л. 19
Трофимова Н.Н. 161
Трошагина Д.С. 216
Трошин П.А. 11
Трусова И.Н. 139
Трухин В.П. 139

- Трушкин Н.А. 40, 106
Трушкина Е.А. 40
Тугаева К.В. 50
Тульская Е.М. 244
Турова Т.П. 202
Туроверов К.К. 104
Туроверов К.К. 44, 94
Туганов О.С. 124
Тутукина М.Н. 118
Тутушкина А.В. 151
Тухбатова Р.И. 205
Тягт А.В. 113
Уварова Ю.Е. 199
Угарова Н.Н. 37, 215, 224
Угрюмов М.В. 157
Украинская В.М. 145
Ульянов С.В. 3
Уляшова М.М. 133
Умнякова Е.С. 74, 101
Упоров И.В. 164, 168
Урбан А.С. 86, 87
Урусов А.Е. 220
Усачев С.А. 171
Устинникова Т.Б. 228
Устинов В.А. 216, 217
Уткин Ю.Н. 92
Утц И.А. 178
Фаворов А.В. 110, 118
Фаворова О.О. 110
Фадеев В.В. 64
Фадеев Р.С. 57
Файзуллин Д.А. 103
Файзулов Е.Б. 148
Фалетров Я.В. 50
Фатеева С.Е. 97
Фатхуллина А.Р. 194
Фахрутдинова Л.И. 184, 242
Федорова О.С. 9
Федорова Т.Н. 163, 164
Федорова Ю.А. 212
Федорченко К.Ю. 135
Федотов И.В. 96, 196
Федотова Е.Ю. 113, 157
Федотчева Н.И. 54, 57, 58
Федотчева Т.А. 57
Филатов А.В. 164
Филатова Е.В. 142, 157
Филатова И.Ю. 55
Филимонов Д.А. 156
Филимонов И.С. 40, 43, 218
Филиппенков И.Б. 18, 184
Филиппова А.А. 133
Филиппова И.Ю. 6, 106
Филоненко В.В. 172
Фисунов Г.Ю. 23, 28, 103, 118, 120
Флямер И.М. 3
Фок Е.М. 181
Фокина А.А. 21, 146
Фомин А.С. 216
Фонин А.В. 44
Формановский А.А. 153
Франк Л.А. 134
Франкевич В.Е. 126
Фридрихс П. 9
Фролов А.А. 133
Фролов Е.Н. 202
Фролова А.А. 208
Фролова Л.Ю. 80
Фурсова Н.А. 5
Фурсова Н.К. 167
Хадеева Н.В. 218
Хайнц С. 233
Хайтович Ф. 113
Халиуллин И.Г. 223
Халиф И.Л. 114
Хамон Л. 11
Хао В. 41
Хартманн Р. 15, 25
Харченко В.Д. 107
Харченко Е.Ю. 150
Хаспеков Л.Г. 158
Хашем Я. 15
Хербиг А. 205
Хивонен М.Т. 101
Хилиас И.В. 149, 168, 169
Хлебников А.И. 143
Хлебус Э.Ю. 120
Хлебцов Б.Н. 240
Хличкина А.А. 187
Хлусевич Я.А. 166
Ходак Ю.А. 141
Ходжаева З.С. 126
Ходорковский М.А. 107, 244
Ходыкина Н.Н. 98
Холявка М.Г. 214, 226
Хоменко В.А. 88, 192
Хоменко Т.М. 76
Хомутов А.Р. 33, 56, 101
Хомутов М.А. 56, 101
Храмеева Е. 3, 113
Хромов А.В. 104
Хундерякова Н.В. 54, 57
Хундерякова Н.В. 58
Хусаинов Д.Р. 155
Хусаинов И. 15
Хушпулян Д.М. 34
Цаллагов С.И. 67, 80, 87
Цветков В.Б. 89
Цветкова Е.В. 74
Центалович Ю.П. 77, 124, 187
Циглер М. 107, 244
Цидулко А.Ю. 174
Цимоха А.С. 73
Цораев Г.В. 98
Цурикова Н.В. 237
Цыбалова Л.М. 212
Цыганов М.М. 173
Цымбаленко Н.В. 59
Цымбалюк И.Ю. 61
Чаговец В.В. 126
Чайка Н.А. 72, 73
Частухина И.Б. 232
Чеботарева Е.Г. 178
Чеботарева Н.А. 46, 102
Чеботарь И.В. 159
Чекушина А.В. 233, 234
Челобанов Б.П. 21, 146
Чемерис А.В. 129
Червякова Д.Б. 12, 19
Чердынцева Н.В. 173, 174
Чердынцева Т.А. 38
Черепанова Н.А. 10
Черетаев И.В. 155
Черкасов А. 4
Черкашин А.А. 70
Черников И.В. 21
Черников О.В. 243
Чернов В.М. 2442
Чернов Н.Н. 45, 172, 175
Чернова О.А. 242
Черноловская Е.Л. 21
Чернуха И.М. 213
Черных Н.А. 202
Черткова Р.В. 40
Чертович А. 3
Чеснокова Н.Б. 150, 225
Честков И.В. 136
Чижев Ю.В. 80
Чикалов И.В. 243
Чильчигашев Р.И. 57
Чирак Е.Р. 209
Чистяков А.А. 95
Чистяков В.А. 150
Чистяков Д.В. 161, 163
Чихиржина Г.И. 6
Чмыхало В.К. 150
Чубарь Т.А. 34
Чугунова А.А. 13, 14
Чудинов М.В. 85
Чумаков Д.С. 240
Чумаков М.И. 89, 215
Чумаков П.М. 125
Чупикова Н.И. 138
Чупин В.В. 85
Шабалин К.А. 244
Шаварда А.Л. 66
Шагимарданова Е. 4
Шадрина М.И. 113, 114, 142, 157
Шадрина О.А. 20
Шакиров Е.В. 216
Шакулов Р.С. 198
Шамова О.В. 74, 165
Шандра А.А. 153
Шапина М.В. 114
Шапошников А.И. 209
Шаранова Н.Э. 66
Шарипова М.Р. 54, 149, 168, 169, 203, 216, 232, 234
Шарова Е.И. 112
Шарова Н.П. 138, 192
Шахмаева Е.Р. 175
Шахристова Е.В. 57, 69
Шашков А.С. 244
Шашков И.А. 233
Шашова Е.Е. 171
Шварц А.М. 5, 183, 185
Шварц В. 233
Шварцбург П.М. 54, 58
Шварцман А.Л. 72, 152
Швецов А.В. 5
Швецова Е.Т. 25
Швецова С.В. 46, 223
Шевелев О.Б. 179
Шевелев Ю.Я. 3
Шевкун Н.А. 143
Шевцов М.А. 66, 174
Шевченко Е.А. 85
Шевченко О.В. 193
Шемчукова О.Б. 144
Шендер В.О. 123
Шерин П.С. 77
Шеховцов С.В. 199
Шешукова Е.В. 23, 171
Шилкин Е.С. 9
Шилов И.А. 20
Шингарова Л.Н. 151, 230
Шиндяпина А.В. 52
Широкова В.А. 126
Широковских Т.С. 135
Ширшикова Т.В. 149, 168, 169
Ширшин Е.А. 64, 98
Шитиков Е.А. 122
Шичкова П. 113
Шишкин С.С. 69, 73, 213
Шлеев С.В. 134
Шмальгаузен Е.В. 72, 100, 102, 105
Шмендель Е.В. 170
Шмидт А. 160
Шохина А.Г. 96
Шпаков А.О. 83
Шрам С.И. 65, 183, 187
Штырлин Ю.Г. 175
Шувалов А.В. 19, 87
Шувалова Е.Ю. 19, 43
Шувалова П.К. 72, 152
Шульгинова А.А. 190
Шульская М.В. 113
Шумов И.Д. 121
Шумянцева В.В. 91
Шурубор Е.И. 162
Шустикова Л.А. 53
Щагина Л.В. 142
Щелчкова Н.А. 147, 195
Щепкин Д. 65, 104
Щербakov П.Л. 114
Эллидина Е.Н. 6, 106
Эль Эллак М.Х. 68
Эльбекьян К.С. 191
Эльдаров М.А. 235
Энейская Е.В. 46, 223
Эртле Т. 103, 225
Эфендиев А.М. 189
Юзбашев Т.В. 197, 204
Юзихин О.С. 209
Юминова Н.В. 49, 92
Юнусова А.Ю. 170, 205
Юрченко Е.А. 149
Юсипович А.И. 40
Юсупов М. 15
Юсупова Г. 15
Юхнев В.А. 165
Язкова А.Б. 175
Якимов А.П. 244
Яковлева Е.Ю. 218
Яминский И.А. 96
Янкаускас С.С. 181
Янkelевич И.А. 74
Яньшолё В.В. 187
Яньшолё Л.В. 187
Яровая О.В. 7, 8
Яхин И.Р. 139
Ячкула Т.В. 54, 58
Яшин Д.В. 65
Яшин К.С. 175, 195
Ячук С.В. 154
Abakumov M.A. 156
Anikeeva Nadia 192
Arkhipova I.R. 117
Artemov A. 115
Arzumanov A.A. 146
Avalle B. 29
Baklaushev V.P. 156
Bartosch B. 31, 32
Battulin N. 115
Beard W.A. 12
Berg G. 210
Bogdanov A.A. 21
Bräsen C. 200
Çağlayan M. 12
Chaaya N. 29
Chang C.-F. 88
Chang Chi-Fon 80
Chekhonin V.P. 156
Cornette R. 4
Cuneo M.J. 12
De Biase D. 32
Demenkov P.S. 116
Dontsova O.A. 21
D'Oronzo E. 34
Duponchel S. 32
Facheris S. 34
Feng Shiqing 156
Fishman V. 115
Flomenberg N. 192
Freudenthal B.D. 12

Friboulet A. 29	Kopylov K.E. 222	Odenthal M. 32	Slesarev A. 200
Gabashvily A.N. 156	Kossinova Olga 27	Osterman I.A. 21	Smirnova O. 31
Gait M.J. 146	Krasikova A. 115	Padiolleau-Lefevre S. 29	Stracke C. 200
Giovannercole F. 32	Krogh A. 207	Panin N.K. 222	Suplatov D.A. 222
Grosso Dolores 192	Krol A. 27	Peng X. 200	Švedas V.K. 222
Gubsky I.L. 156	Lê B.M. 117	Pennacchietti E. 32	Sykulev Y. 192
Gudbersdottir S.R. 207	Leonov S.V. 21	Pestell R. 30	Tatarinova T.V. 117
Hackenberg C. 18	Levy Pi. 32	Petrov K. 78	Tian Xiao 156
Hashem Y. 27	Littlechild J. 222	Phillips R.S. 31	Tsepilov Y.A. 116
Hayashi H. 30	Logrieco A.F. 211	Potapov A.S. 156	Tunitskaya V. 31
Huang T.-H. 88	Lomonosoff G.P. 212	Prokhortchouk E. 115	Tyurina D. 31
Ivanenkov Y.A. 21	Lukyanov D.A. 21	Pronin A. 83	Valuev-Elliston V. 31
Ivanisenko N.V. 116	Lushchekina S. 78	Rak A. 241	Veselov M.S. 21
Ivanisenko T.V. 116	Maalouf R. 29	Richards N. 31	Waltho J. 30
Ivanisenko V.A. 116	Malygin Alexey 27	Rodriguez F. 117	Wang G. 156
Ivanov A.r 31	Marshall J.G. 122	Rybakova D. 210	Weiss M.A. 84
Jensen K. 200	Marusich E.I. 21	Saik O.V. 116	Wiegels T. 18
Kallio J. 18	Maslova A. 115	Sassa A. 12	Wilson I. 110
Kallnik V. 200	Masson P. 78	Sastry N. 156	Wilson S.H. 12
Karpova G. 27	Mazur A. 115	Secundo F. 34	Wood M.J.A. 146
Kharlamova A. 78	McClore G. 146	Sergiev P.V. 21	Yushenova I.A. 117
Khomich O. 31	Medvedeva Yu. 115	Serov Oleg 115	Zhang Chao 156
Khven I.M. 21	Melnikov P.A. 156	Shahsavarian M. 29	Zoulim F. 32
Kikawada T. 4	Menzel P. 200, 207	Shiryaev D.I. 21	Zueva Irina 78
Kochetkov S. 31	Molle J. 32	Siebers B. 200	
Kolchanov N.A. 116	Morozova A.Y. 156	Skryabin K. 115	
Komarova E.S. 21	Murakawa T. 30	Skvortsov D.A. 21	
Konovalov A.A. 156	Nikolsky E. 78	Slepak V.Z. 83	